



# UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE  
LOS ALIMENTOS

## Utilización de residuos de la Industria Cafetera como enmiendas orgánicas de suelos para la mejora de alimentos de origen vegetal

Ana Gloria Cervera Mata

2022

Dirigida por:

Gabriel Delgado Calvo-Flores

José Ángel Rufián Henares

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Ana Gloria Cervera Mata  
ISBN: 978-84-1117-235-6  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/72882>



*A mi Tita. Te fuiste antes de lo esperado.*

*Espérame en el cielo. Te quiero.*



# AGRADECIMIENTOS

Siempre he tenido la tentación de pensar que camino sola, que me tengo que enfrentar a las dificultades de la vida sólo con mi propio esfuerzo. Sin embargo, un día te encuentras que tienes que hacer los agradecimientos de tu tesis doctoral, y te das cuenta de que eres muy afortunada por caminar siempre acompañada.

Gracias al departamento de Edafología y Química Agrícola. Gracias a mis compañeros de Ciencias. Gracias por vuestra disponibilidad y por todo lo que me habéis enseñado. Gracias a mi familia de Farmacia. Gracias a Rafa, Jesús, Juanma, María Virginia, Raúl, Rocío, Marisol y Pilar. Estando con vosotros me siento como en casa.

Gracias a mi compañero de fatigas, Alberto. Gracias por tus continuas bromas. Gracias por estar pendiente de mí. Gracias por llorar conmigo en los momentos más difíciles. Eres grande. Eres el mejor compañero de despacho que podría soñar.

Gracias a mis directores de tesis. Gracias a José Ángel. Sabes muy bien que no estaría aquí sin tu ayuda. Gracias por tus consejos. Gracias por darme caña para que diera todo de mí. Gracias a Gabriel. Qué decirte que ya no sepas. Me enamoré de esta profesión gracias a ti. Eres un excelente profesor e investigador. Eres como un padre para mí. Hemos compartido todo durante estos 6 años. Me has enseñado demasiadas cosas. Formamos un gran equipo. Sabes que cuando ya no esté aquí, te echaré demasiado de menos.

Gracias al departamento de Nutrición y Bromatología (mi segunda casa). Gracias especialmente a Miguel Navarro. Primero profesor y después compañero. He aprendido mucho de ti.

Gracias a mis compañeras Leslie y Lida. Un placer haber compartido parte del camino con vosotras. Os deseo lo mejor en vuestras tesis doctorales.

Gracias a Víctor y Paco. Sois unos excelentes compañeros de trabajo. Hemos hecho un gran equipo Granada-Jaén.

Gracias a Claudio Mondini. Mi hai aperto le porte del tuo lavoro. Mi hai insegnato il valore del lavoro rigoroso. Spero di poter lavorare di nuovo con te.

Gracias a Ana del Moral. Te conocí como profesora y decana. Hoy puedo decir que eres mi amiga. Gracias por escucharme cuando más lo necesitaba. Gracias por tu disponibilidad.

Gracias a mis abuelos. Gracias a vuestro esfuerzo, estoy hoy aquí defendiendo esta tesis doctoral.

Gracias a mis padres. Gracias por darme la posibilidad de existir. Gracias por inculcarme el valor de la disciplina. Gracias por no impedir que vuele sola. Os quiero.

Gracias a mis hermanas y cuñados. Qué deciros que no sepáis ya. Gracias por existir. Gracias por ser mis pies y mis manos. Dios nos bendijo siendo cuatro. Gracias a vosotras, cuento con dos hermanos maravillosos. Os quiero.

Gracias a mis sobrinas, Ángela, Luz y Nazaret. He aprendido a amar gracias a vuestra mirada. Habéis revolucionado mi vida. Nunca llegué a pensar que podía querer a alguien tanto.

Gracias a mi tito Ángel y a mi tita Eva. Gracias por quererme tanto. Tito, gracias por enseñarme el valor de vivir una vida sencilla. Gracias por enseñarme a vivir como un niño. Tita, gracias por tanto. Espérame en el cielo.

Gracias a mis padrinos. Gracias por estar siempre ahí. Por escucharme siempre. Siempre. Sois un regalo para mi vida.

Gracias a las hermanas de Buenafuente del Sistol. Gracias por vuestra oración. Lleváis en mi vida 20 años. Espero que sean muchos más.

Gracias a las hermanitas del Cordero. Gracias por señalarme continuamente la fuente dónde mana la Vida verdadera.

Gracias a Eduardo y Miguel. Gracias por vuestra infinita paciencia. Me habéis acompañado en los momentos más difíciles. Gracias.

Gracias a mi fraternidad y a la escuela de comunidad. Semana a semana me enseñáis quién es el verdadero Maestro. Gracias por no dejarme nunca sola.

Gracias a Julián Carrón y al movimiento de Comunión y Liberación. Desde que os conocí, mi vida tiene sentido.

Gracias a Teresa y a Belén. Dios sabe que me salvasteis la vida, me abristeis los ojos y me señalasteis el camino. Os quiero demasiado.

Y, por último, gracias a Tí. Eres lo que da sentido a Todo.

# ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
Índice de Tablas.....	5
Índice de Figuras .....	9
Abreviaturas .....	15
<b>1. Introducción .....</b>	<b>17</b>
1.1. Aspectos generales del café y los posos de café.....	19
1.2. Aplicaciones potenciales de los posos de café .....	39
1.3. Utilización de posos de café como enmiendas orgánicas de suelos .....	48
1.4. Perspectivas agro-ambientales.....	55
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>61</b>
<b>3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>67</b>
3.1. Materiales .....	69
3.2. Métodos.....	77
<b>4. Resultados y Discusión.....</b>	<b>111</b>
4.1. Ensayo 1. Efectos sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo y crecimiento de las plantas .....	113
4.2. Ensayo 2. Efectos sobre las propiedades físicas del suelo.....	133
4.3. Ensayo 3. Efectos sobre la microbiología del suelo .....	151
4.4. Ensayo 4. Efectos sobre la hidrofobicidad y la materia orgánica del suelo. Relación con la calidad del suelo.....	169
4.5. Ensayo 5. Efectos de las dosis crecientes de los SCG sobre el sistema suelo-planta.....	197
4.6. Ensayo 6. Efectos combinados de la adición de SCG con fertilizantes nitrogenados sobre el sistema suelo-planta .....	227
4.7. Ensayo 7. Efectos sobre el sistema suelo-planta de SCG transformados mediante compostaje, vermicompostaje, carbonización, lavado, hidrólisis e incubación en suelo .....	243

4.8. Ensayo 8. Bioenmiendas derivadas de los posos de café y su influencia en la dinámica del C y N .....	265
4.9. Ensayo 9. Uso potencial de los SCG y otros derivados de la bebida del café como quelatos en la biofortificación agronómica de plantas comestibles... ..	295
4.10. Síntesis de Resultados y Discusión .....	311
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>325</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>335</b>



# RESUMEN

Los posos de café (SCG) son un residuo generado a nivel mundial como consecuencia del procesamiento de la bebida del café. Actualmente, su destino principal son los vertederos provocando contaminación de acuíferos y emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. Los SCG son ricos en C en forma de carbohidratos, proteínas, grasas, polifenoles, etc., lo que les hace susceptibles de ser utilizados como enmienda orgánica de suelos. Sin embargo, algunos autores han reportado el carácter fitotóxico de los SCG. Esto unido al interés en la economía circular para los residuos, ha propiciado la búsqueda de procedimientos de transformación como son el compostaje, vermicompostaje, pirolisis (genera un residuo sólido denominado biochar), carbonización hidrotermal (genera hidrochar), etc., que bien o eliminan esa fitotoxicidad o dan lugar a productos de segunda generación con elevado valor añadido. Por otro lado, también se ha investigado la capacidad quelante de los SCG, lo que les hace aptos de ser utilizados como movilizadores de elementos en la biofortificación agronómica. Por todo esto, el objetivo general de la presente tesis doctoral fue analizar el empleo de los SCG y sus bio-productos de segunda generación (vermicompost, biochar, hidrochar, etc.) como enmiendas orgánicas de suelos y en la biofortificación de plantas comestibles, todo ello desde el punto de vista físico, químico, biológico, ambiental, etc. El método global de trabajo fue emplear todos los bio-productos citados en ensayos agronómicos *in vitro* en una cámara climática. Se mezclaron los bio-residuos antes citados con material de dos suelos agrícolas Mediterráneos (*Cambic Calcisol* y *Chromic Calcic Luvisol*). Posteriormente a su incubación se analizaron las propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas y biológicas. Los ensayos fueron en unos casos de incubación (sin planta) y en otros cultivando *Lactuca sativa* var. *longifolia*. En planta se midieron tanto parámetros fisiológicos como contenidos en elementos minerales. Se ha demostrado que la adición de SCG mejora las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo en cuanto a nivel de nutrientes esenciales como N, P y K. Además, se incrementó significativamente la cantidad de carbono orgánico en el suelo, aumentando en mayor medida las fracciones lábiles de la materia orgánica del mismo. En cuanto a las propiedades físicas, aumentó la estabilidad estructural, debido a su carácter hidrofóbico y aumentó la capacidad de retención de agua. Además, su adición acrecentó la diversidad bacteriana del suelo. En suma, la adición de SCG mejoró la calidad global de los dos suelos agrícolas Mediterráneos ensayados. La adición de SCG y sus bio-

productos derivados afectó de forma diferente a los ciclos del C y N del suelo. Así, la adición de SCG e hidrochar estimuló la actividad biológica, generando emisiones de CO<sub>2</sub>, mientras que el biochar incrementó el carbono remanente en el suelo. El vermicompost de SCG actuó como un fertilizante nitrogenado. En cuanto al efecto sobre las plantas comestibles, la adición de SCG inhibió el crecimiento de las mismas, pero actuó como un agente biofortificador debido a la capacidad movilizadora de elementos desde el suelo hacia la planta. Ambos hechos (fitotóxico y biofortificador) parecen estar relacionados con el mismo tipo de moléculas: los polifenoles. El tratamiento de los SCG que eliminó más efectivamente dicha toxicidad fue el vermicompostaje. El resto de los tratamientos (compostaje, pirolisis, carbonización hidrotermal, desengrasado, lavado con agua y etanol) no fueron efectivos para dicho fin. La generación de *bioquelatos* a partir de los SCG y melanoidinas, funcionalizados con sales de diversos elementos, fue efectivo ya que incrementó la reserva de micronutrientes en el suelo, aunque a nivel de movilización de elementos fueron menos eficaces que los quelatos comerciales. En conclusión, los SCG son un residuo con una clara vocación de economía circular, debido a la creación de productos de segunda generación y de alto valor añadido. Para la aplicación de este residuo como enmienda orgánica habría que ensayar procesos de transformación para evitar la fitotoxicidad. Por otro lado, el uso de los SCG y sus bio-productos derivados, todos ellos muy ricos en C, es muy recomendable como enmienda orgánica, dado el alto déficit de C de la mayoría de los suelos en toda el área Mediterránea. Por su carácter fitotóxico, estos bio-productos no deben ser aplicados en grandes cantidades a los suelos, sino en dosis subtóxicas a modo de abonos funcionalizados con micronutrientes (bioquelatos), asociados a fertilizantes convencionales.

# ABSTRACT

Spent coffee grounds (SCG) are a waste generated worldwide as a consequence of the processing of coffee drinks. Currently, its main destination is landfills, causing contamination of aquifers and emission of CO<sub>2</sub> into the atmosphere. SCG are rich in C in the form of carbohydrates, proteins, fats, polyphenols, etc., which makes them susceptible to being used as soil organic amendment. However, some authors have reported the phytotoxicity of SCG. This, together with the interest in the *circular economy* for waste, has led to the search for transformation procedures such as composting, vermicomposting, pyrolysis (generates a solid waste called biochar), hydrothermal carbonization (generates hydrochar), etc., which eliminate this phytotoxicity or give rise to second-generation products with high added value. On the other hand, the chelating capacity of SCG has also been investigated, which makes them suitable for being used as mobilizers of elements in agronomic biofortification. For all this, the general objective of this doctoral thesis was to analyze the use of SCG and their second-generation bio-products (vermicompost, biochar, hydrochar, etc.) as soil organic amendments and in the biofortification of edible plants, all from a physical, chemical, biological, environmental, etc., point of view. The overall working method was to use all the bio-products mentioned in *in vitro* agronomic assays in a climatic chamber. The aforementioned bio-residues were mixed with material from two Mediterranean agricultural soils (*Cambic Calcisol* and *Chromic Calcic Luvisol*). After its incubation, the physical, chemical, physicochemical, and biological properties were analyzed. The assays were in some cases of incubation (without plant) and in others cultivating with *Lactuca sativa* var. *longifolia*. In the plant, both physiological parameters and mineral element content were measured. The addition of SCG has been shown to improve the soil chemical and physicochemical properties in terms of the level of essential nutrients such as N, P and K. In addition, the amount of organic carbon in the soil was significantly increased, increasing the labile fractions of the soil organic matter to a greater extent. Regarding physical properties, the addition of SCG increased the structural stability due to its hydrophobic nature and increased water retention capacity. In addition, its addition increased the soil bacterial diversity. In sum, the addition of SCG improved the overall quality of the two Mediterranean agricultural soils tested. The addition of SCG and its by-products affected the soil C and N cycles in a different way. Thus, the addition of SCG and hydrochar stimulated biological activity, generating CO<sub>2</sub> emissions, while biochar increased the remaining carbon in the soil. Vermicompost from SCG acted as a nitrogen fertilizer. Regarding the effect on edible plants, the addition of SCG inhibited their growth, but acted as a biofortifying agent due to the

mobilizing capacity of elements from the soil towards the plant. Both events (phytotoxic and biofortifying) seem to be related to the same type of molecules: polyphenols. The SCG treatment that most effectively eliminated such toxicity was vermicomposting. The rest of the treatments (composting, pyrolysis, hydrothermal carbonization, defatting, washing with water and ethanol) were not effective for this purpose. The generation of *biochelates* from SCG and melanoidins, functionalized with salts of various elements, was effective since increased the reserve of micronutrients in the soil, although at the level of mobilization of elements they were less effective than commercial chelates. In conclusion, SCG are a residue with a clear vocation for a circular economy, due to the creation of second-generation products with high added value. For the application of this residue as organic amendment, transformation processes would have to be tested to avoid phytotoxicity. On the other hand, the use of SCG and its derivative bio-products, all of them very rich in C, is highly recommended as an organic amendment, given the high deficit of C in most of the soils of the Mediterranean area. Due to their phytotoxic nature, these bio-products should not be applied in large quantities to soils, but in subtoxic doses as functionalized fertilizers with micronutrients (biochelates), associated with conventional fertilizers.

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Variedades y características del café Arábica .....	21
<b>Tabla 2.</b> Propiedades químicas y fisicoquímicas del vermicompost de SCG (Sánchez-Hernández y Domínguez, 2017).....	48
<b>Tabla 3.</b> Propiedades químicas, fisicoquímicas y mineralógicas del suelo de Vega y suelo Rojo.....	71
<b>Tabla 4.</b> Principales propiedades fisicoquímicas de los SCG empleados en los distintos ensayos de la tesis doctoral.....	73
<b>Tabla 5.</b> Condiciones experimentales, nomenclatura y objetivos de cada tratamiento. ....	89
<b>Tabla 6.</b> Propiedades químicas y fisicoquímicas de los SCG y las mezclas suelo-SCG.....	116
<b>Tabla 7.</b> Matriz de componentes principales.....	119
<b>Tabla 8.</b> Test de comparación de medias.....	120
<b>Tabla 9.</b> Contenido de ácidos fenólicos totales y tasa de respiración en las muestras iniciales (sin cultivar). ....	121
<b>Tabla 10.</b> Propiedades físicas del suelo en relación a los distintos tratamientos. ....	136
<b>Tabla 11.</b> ANOVA de una vía y test de la t de Student.....	137
<b>Tabla 12.</b> Parámetros de la microfábrica de las muestras de suelo y de las mezclas suelo-SCG medidas con estereomicroscopio y análisis de imagen (media $\pm$ SD). ....	140
<b>Tabla 13.</b> Ratio respuesta para los posos de café y otras enmiendas orgánicas. ....	145
<b>Tabla 14.</b> Evolución de los parámetros fisicoquímicos tras la adición de SCG. ....	153
<b>Tabla 15.</b> Diversidad comunitaria de los suelos adicionados con SCG. Índices ecológicos Chao-1, Shannon-Wiener (H'), and Simpson (1-D). ....	155
<b>Tabla 16.</b> Análisis de redes microbianas de los suelos adicionados con SCG. ....	166
<b>Tabla 17.</b> Valores medios de los indicadores de la calidad del suelo y componentes de energía libre superficial para el tipo de suelo y los distintos tratamientos.....	172
<b>Tabla 18.</b> Parámetros de hidrofobicidad de las muestras de suelo y SCG. Medias $\pm$ SD (n = 5).....	174
<b>Tabla 19.</b> Matriz de correlación de Pearson entre las propiedades de hidrofobicidad y las propiedades químicas, físicas y biológicas.....	178

<b>Tabla 20.</b> Parámetros de calidad del suelo. Medias $\pm$ SD (n = 5). .....	180
<b>Tabla 21.</b> Valores de pH de los suelos agrícolas donde se cultivaron las muestras de lechugas estudiadas.....	199
<b>Tabla 22.</b> Contenido de elementos minerales esenciales y tóxicos en muestras de lechuga.....	200
<b>Tabla 23.</b> Niveles de los elementos minerales las lechugas cultivadas durante 40 días con cantidades crecientes de SCG. ....	209
<b>Tabla 24.</b> Coeficientes de correlación lineales estadísticamente significativos y niveles de significancia (en paréntesis), establecidos entre los diferentes minerales analizados.....	212
<b>Tabla 25.</b> Cantidad de los diferentes elementos aportados por una porción de lechuga (150 g) cultivada con los diferentes tratamientos. Ingestas dietéticas de referencia (IDR) y porcentaje de IDR, para hombres y mujeres adultos sanos (Instituto de Medicina, 2005) proporcionados por una porción de lechuga (150 g) cultivada con SCG (promedio entre valores SCG bajos y altos) .....	215
<b>Tabla 26.</b> Efecto de los diferentes tratamientos sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo. ....	229
<b>Tabla 27.</b> Contenido de macro y microelementos en lechuga en función de los diferentes tratamientos aplicados. ....	235
<b>Tabla 28.</b> Coeficientes de correlación de las variables seleccionadas .....	240
<b>Tabla 29.</b> Caracterización de las bio-enmiendas derivadas de los SCG. ....	246
<b>Tabla 30.</b> Efecto de los diferentes tratamientos de los SCG sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo.....	247
<b>Tabla 31.</b> Contenidos de Zn, Cu y Fe en lechugas (peso fresco) y cantidades bioamisolables de Zn, Cu y Fe en suelos cultivadas/tratados, respectivamente, con diferentes tratamientos de SCG.....	256
<b>Tabla 32.</b> Coeficientes de correlación lineal estadísticamente significativas.	263
<b>Tabla 33.</b> Propiedades composicionales y químicas de los SCG y de las bio-enmiendas derivadas de los SCG. ....	267
<b>Tabla 34.</b> Ecuación obtenida al ajustar el patrón de descomposición del C en el suelo a un modelo de dos compartimentos. Valores característicos de C.	271
<b>Tabla 35.</b> $\text{NO}_3^-$ , $\text{NH}_4^+$ and N mineral neto después de 2, 7 y 30 días de incubación. ....	275
<b>Tabla 36.</b> Contenido total de Fe y Zn en los bioquelatos de SCG y las melanoidinas .....	297
<b>Tabla 37.</b> Contenidos de Fe y Zn en lechugas (peso fresco).....	293
<b>Tabla 38.</b> Fe y Zn asimilable, pH y conductividad eléctrica ( $\text{CE}_{25}$ ) en suelo. ....	300

<b>Tabla 39.</b> Contribución del consumo de lechuga a la ingestión diaria de Fe y Zn en la dieta Española. ....	303
--	-----



# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustración de Jemes Sowerby en un libro de botánica medicinal del siglo XIX sobre la flor blanca, la semilla y la hoja del café arábica (Hoffman, 2014).....	20
<b>Figura 2.</b> Corte longitudinal de la cereza del café (Mussatto et al., 2011).....	22
<b>Figura 3.</b> Secado en mantas de los granos de café (Hoffman, 2014) .....	23
<b>Figura 4.</b> Esquema general del método húmedo y seco del procesado del café. Adaptado de Franca y Oliveira (2009) y Murthy y Madhava Naidu (2012)....	25
<b>Figura 5.</b> Tostado de café en la fábrica de la empresa Good African Coffee en Kampala (Hoffman, 2014) .....	26
<b>Figura 6.</b> Primera máquina espresso patentada por La Pavoni (Hoffman, 2014) .....	27
<b>Figura 7.</b> Cascarilla de café (Klingel et al., 2020) .....	29
<b>Figura 8.</b> Pulpa de café (Murthy y Madhava Naidu, 2012).....	29
<b>Figura 9.</b> Piel de plata (Klingel et al., 2020).....	31
<b>Figura 10.</b> Granos de café defectuosos (Casas et al., 2017).....	32
<b>Figura 11.</b> Posos de café (Klingel et al., 2020).....	33
<b>Figura 12.</b> Composición principal de los posos de café (Battista et al., 2020). .....	34
<b>Figura 13.</b> Estructura de las melanoidinas (Moreira et al., 2012) y propiedades de las mismas. ....	38
<b>Figura 14.</b> Número de artículos publicados sobre los SCG de acuerdo a la base de datos Web of Science (último acceso 25-09-2021 “spent coffee grounds”). Número de artículos publicados distribuidos en las categorías establecidas por la plataforma Web of Science. ....	40
<b>Figura 15.</b> Obtención de bioetanol a partir de SCG (adaptado de Battista et al., 2020).....	41
<b>Figura 16.</b> Fotos aéreas de lechugas cultivadas con distintas proporciones de SCG: 0% (A), 5% (B), 10% (C), 15% (D), 20% (E) (Turek et al., 2020). ....	52
<b>Figura 17.</b> Lechugas cultivadas con distintas cantidades de SCG (Cruz et al., 2015).....	53
<b>Figura 18.</b> Efecto de los SCG frescos, desengrasados y biochar, con o sin fertilizante sobre el crecimiento del sorgo (extraída de Vardon et al., 2013)...	53
<b>Figura 19.</b> Mapa del contenido de carbono orgánico en España (Rodríguez-Martín et al., 2016).....	56
<b>Figura 20.</b> Mejoras de la calidad del suelo mediante el aumento de la reserva orgánica del suelo en suelos agrícolas (adaptada de Lal, 2011).....	57

<b>Figura 21.</b> Mapa global del hambre oculta (Sight and Life).....	58
<b>Figura 22.</b> Ubicación en el mapa geográfico de la localización de ambos suelos. Fotos aéreas de cada uno de los suelos procedentes de Google Maps. ....	69
<b>Figura 23.</b> Fotografías del suelo de Vega (izquierda) y suelo Rojo (derecha) en el momento del muestreo.....	70
<b>Figura 24.</b> Procedimiento de obtención de los SCG.....	72
<b>Figura 25.</b> Procedimiento para la obtención de biochar de SCG. ....	74
<b>Figura 26.</b> Procedimiento para la obtención de hidrochar de SCG. ....	74
<b>Figura 27.</b> Lechuga <i>Lactuca sativa</i> var. <i>longifolia</i> utilizada en los ensayos. ....	77
<b>Figura 28.</b> a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 1. ....	79
<b>Figura 29.</b> a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 2. ....	80
<b>Figura 30.</b> a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 3. ....	82
<b>Figura 31.</b> a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 4. ....	83
<b>Figura 32.</b> a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 5. ....	85
<b>Figura 33.</b> a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 6. ....	86
<b>Figura 34.</b> a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 7. ....	88
<b>Figura 35.</b> a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 8. ....	91
<b>Figura 36.</b> a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 9. ....	93
<b>Figura 37.</b> Sistema automatizado de muestreo para la medición continua de CO <sub>2</sub> y N <sub>2</sub> O.....	104
<b>Figura 38.</b> Evolución de las propiedades de suelo y planta con los días de cultivo. ....	118
<b>Figura 39.</b> Imágenes SEM y espectros DRX (el asterisco blanco indica el sitio del microanálisis). Las fotos a, b y c fueron tomadas con electrones secundarios; la foto d fue tomada con electrones retrodispersados.....	122
<b>Figura 40.</b> Limitación de los SCG al crecimiento de las lechugas. A) Suelo de Vega 0% SCG. B) Suelo Rojo 0% SCG. C) Suelo de Vega 10% SCG. D) Suelo Rojo 10% SCG. ....	127

<b>Figura 41.</b> Imágenes estereomicroscópicas de los macroagregados correspondientes a muestras del suelo de Vega y resultados del análisis de imagen.....	140
<b>Figura 42.</b> Imágenes SEM con electrones secundarios y espectros DRX (el asterisco blanco indica el sitio del microanálisis).....	141
<b>Figura 43.</b> Diagrama de dispersión del análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de suelo. PC1 + PC2 + PC3 capturan el 90.5% de la varianza (suma de las puntuaciones).....	143
<b>Figura 44.</b> Retención de agua a capacidad de campo y punto de marchitamiento permanente <i>versus</i> dosis de SCG. La distancia vertical entre las dos líneas rectas es igual al AU. ....	147
<b>Figura 45.</b> Abundancia relativa de microorganismos centrales. La correlación indirecta entre la abundancia de microorganismos centrales y el porcentaje de SCG se observa en ambos suelos.....	156
<b>Figura 46.</b> Análisis cluster de las bacterias en los suelos adicionados con SCG. Solo se incluyeron OTUs pertenecientes a géneros conocidos y una abundancia relativa de > 0.5% (en al menos 1 muestra).....	158
<b>Figura 47.</b> Abundancia relativa de grupos funcionales potenciales. PGPB, bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	159
<b>Figura 48.</b> Inferencia de correlaciones bio y fisicoquímicas entre comunidades enteras en suelos de Vega (izquierda) y Rojo (derecha) usando parcelas de análisis de redundancia multivariante.....	163
<b>Figura 49.</b> Inferencia de correlaciones bio y fisicoquímicas entre comunidades enteras en suelos Vega y Red usando parcelas de análisis de redundancia multivariante.....	164
<b>Figura 50.</b> Redes de consenso de interacción microbiana. ....	166
<b>Figura 51.</b> Fraccionamiento de la materia orgánica del suelo.....	181
<b>Figura 52.</b> Imágenes SEM de muestras seleccionadas del suelo Rojo (SR) y suelo de la Vega (SV) .....	185
<b>Figura 53.</b> Tasa de respiración acumulativa (mg CO <sub>2</sub> -C g <sup>-1</sup> ) durante 30 días de incubación. a) Suelo Rojo (SR); b) Suelo de la Vega (SV).....	192
<b>Figura 54.</b> Gráfico superpuesto de las puntuaciones de las muestras obtenidas del análisis de componentes principales y cargas de cada parámetro analizado.. ..	194
<b>Figura 55.</b> Aumento relativo ( $\Delta$ ) en el contenido de elementos minerales en lechugas cultivadas durante 40 días en suelos adicionados de SCG (porcentajes altos y bajos de SCG) en comparación con otros grupos de lechugas. ....	202

<b>Figura 56.</b> Influencia del aumento de los porcentajes de SCG sobre las concentraciones de Mn (a) y Cd (b).....	210
<b>Figura 57.</b> Gráfico superimpuesto de las puntuaciones obtenidas del PCA (PC2 vs PC1) y cargas de cada elemento mineral analizado.....	214
<b>Figura 58.</b> Evolución de la densidad aparente con la adición progresiva de SCG.....	219
<b>Figura 59.</b> Porcentaje de microagregados, mesoagregados y macroagregados con la adición progresiva de SCG. ....	220
<b>Figura 60.</b> Capacidad de retención de agua a capacidad de campo ( $W_{33}$ ) y en el punto de marchitamiento permanente ( $W_{1500}$ ) versus dosis de SCG. La distancia entre ambas restas es igual al agua utilizable por las plantas (AU).....	221
<b>Figura 61.</b> Imágenes estereomicroscópicas de los macroagregados y resultados del análisis de imagen.....	223
<b>Figura 62.</b> Peso fresco de las lechugas e imágenes de las lechugas tras 40 días de cultivo.....	232
<b>Figura 63.</b> Gráfico de contorno 2 D (SCG frente a N) para los distintos elementos minerales.....	236
<b>Figura 64.</b> Gráfico de contorno 2 D (SCG frente a N) para los microelementos Cu y Zn.....	237
<b>Figura 65.</b> Gráfico superpuesto de las puntuaciones obtenidas del PCA para las muestras (PC2 vs PC1) y cargas de los parámetros del suelo y elementos minerales de las lechugas.....	238
<b>Figura 66.</b> a) Peso fresco de las lechugas (diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$ ). b) Imágenes de las lechugas después de 40 días de cultivo.....	250
<b>Figura 67.</b> Gráfico superpuesto de las puntuaciones obtenidas del PCA para las muestras (PC2 vs PC1) y cargas de los parámetros del suelo y elementos minerales de las lechugas.....	262
<b>Figura 68.</b> Imágenes SEM. a) SCG); b) Biochar a 400°C (B400); c) Hydrochar a 200°C (H200); d) Vermicompost (VC) .....	269
<b>Figura 69.</b> Emisiones de CO <sub>2</sub> de los suelos incubados. a) durante los primeros 10 días, b) *CO <sub>2</sub> acumulado a los 30 días.....	270
<b>Figura 70.</b> Fracción restante de C orgánico residual en el suelo a lo largo del tiempo con respecto al C total agregado. ....	272
<b>Figura 71.</b> Formas de C and N a 2, 7 y 30 días de incubación. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). ....	273
<b>Figura 72.</b> Diagrama Van-krevelen.....	278

<b>Figura 73.</b> Análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-R) asociado a los dos primeros componentes.....	287
<b>Figura 74.</b> Gráfico superpuesto de las puntuaciones del análisis de componentes principales obtenidas para las muestras (PC2 <i>vs</i> PC1) y cargas de los parámetros del suelo a los 2, 7 y 30 días. ....	292
<b>Figura 75.</b> A y C: eficiencia de utilización de Fe y Zn de los bioquelatos y quelatos en lechuga. B y D: eficiencia de reserva de Fe y Zn disponibles de los bioquelatos y quelatos en el suelo.. ....	301
<b>Figura 76.</b> Valores del factor de transferencia (concentración total en planta / concentración extraída del suelo) de bioquelatos y quelatos comerciales. ....	303



# ABREVIATURAS

**AF:** ácidos fúlvicos

**AH:** ácidos húmicos

**ANOVA:** análisis de la varianza

**ASI (aggregation stability index):** índice de estabilidad estructural

**AU:** agua utilizable por las plantas

**BC:** carbono de la biomasa microbiana

**BN:** nitrógeno de la biomasa microbiana

**CA (contact angle):** ángulo de contacto

**CaCO<sub>3</sub> eq.:** carbonato cálcico equivalente

**CE<sub>25</sub>:** conductividad eléctrica medida a 25°C

**CIC:** capacidad de intercambio catiónico

**CO:** carbono orgánico

**C<sub>R</sub>:** C remanente

**DA:** densidad aparente

**DH<sub>asa</sub>:** actividad deshidrogenasa

**DR:** densidad real

**EN (extractable N):** nitrógeno extraíble

**EC (extractable organic C):** carbono orgánico extraíble

**GI (germination index):** índice de germinación

**HQI (humus quality index):** índice de calidad del humus

**HTC (hydrothermal carbonization):** carbonización hidrotérmica

**HWSC (hot water soluble carbon):** carbono soluble en agua caliente

**IDR:** ingesta dietética de referencia

**K<sub>s</sub>:** conductividad hidráulica saturada

**OTU (operational taxonomic units):** unidades taxonómicas operacionales

**PCA (principal component análisis):** análisis de componentes principales

**PGPB (plant growth promoting bacteria):** bacterias promotoras del crecimiento vegetal

**PLS-R (partial least square- regression):** regresión de mínimos cuadrados parciales

**PWSOM (potential wettability of soil organic matter):** humectabilidad potencial de la materia orgánica del suelo

**RR (respiration rate):** tasa de respiración

**SCG (spent coffee grounds):** posos de café

**SEM (scanning electron microscopy):** microscopía electrónica de barrido

**SFE (surface free energy):** energía libre superficial

**SOM (soil organic matter):** materia orgánica del suelo

**TEC (total extractable carbon):** carbono extraíble total

**W<sub>1500</sub>:** capacidad de retención de agua a -1500 kPa

**W<sub>33</sub>:** capacidad de retención de agua a -33 kPa

**WDPT (water drop penetration time):** tiempo de penetración de la gota de agua

**WSC (water soluble carbon):** carbono soluble en agua

**WSN (water soluble nitrogen):** nitrógeno soluble en agua

# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. ASPECTOS GENERALES DEL CAFÉ Y LOS POSOS DE CAFÉ

### 1.1.1. Breve historia del café

La palabra café procede de la palabra italiana *caffè*, la cual procede de la palabra turca *kahve* y ésta del árabe clásico *qahwah* (Diccionario de la Real Academia Española). El café tiene su origen en Etiopía, en el cuerno de África, probablemente en la provincia de Kafka (ICO, 2020). Los primeros escritos sobre el café datan del año 575 en Yemen, pero no fue hasta el siglo XVI en Persia donde hay referencias del tostado de café para dar lugar a lo que hoy conocemos como bebida del café (Mussatto et al., 2011). La provincia de Kafka es considerada el hábitat originario del café arábica y África central del café robusta (Murthy y Madhava Naidu, 2012).

El café llegó a Europa en 1615 a través de los comerciantes venecianos. En esta época también llegaron las otras dos grandes bebidas a Europa: el chocolate procedente de las Américas en 1528 y el té, el cual se vendió en Europa en 1610 por primera vez (ICO, 2020). Alemanes, franceses e italianos buscaban una manera de desarrollar una plantación de café en sus colonias (Mussatto et al., 2011), pero fueron los holandeses los que obtuvieron las primeras plántulas y consiguieron cultivarlas en invernaderos (ICO, 2020). Luego, el alcalde de Ámsterdam les dio una planta de café a los franceses, y comenzaron a cultivar en las islas de Sandwich y Bourbon (Mussatto et al., 2011). Los holandeses empezaron a cultivar café en la India, y en 1699 llevaron algún cultivar a Java, lo que es ahora Indonesia (ICO, 2020). Unos cuantos años después, las colonias holandesas se habían convertido en la principal fuente de suministro de café a Europa. Con las experiencias holandesas y francesas, el cultivo del café fue llevado a otras colonias europeas. El crecimiento del mercado europeo favoreció la expansión de la plantación de café en los países africanos y también fue a través de los colonos europeos que

el café llegó a Puerto Rico, Cuba, Surinam, Santo Domingo y las Guayanas. A través de las Guayanas, el café llegó a Brasil (Mussatto et al., 2011), siendo este el mayor productor a nivel mundial en la actualidad (ICO, 2020).

### 1.1.2. Variedades del café

El género *Coffea*, el cual pertenece a la familia *Rubiaceae*, incluye unas 80 especies las cuales prevalecen en África y Madagascar (Murthy y Madhava Naidu, 2012). Las dos especies de planta de café más importantes son la Arábica (*Coffea arabica* L.) y la Robusta (*Coffea canephora* Pierre). Arábica es considerada la planta de café más noble y engloba el 75% de la producción mundial (**Figura 1**). Mientras que Robusta es más ácida y resistente a las plagas y engloba el 25% de la producción mundial (Mussatto et al., 2011). Las plantas de café producen flores blancas que posteriormente producen frutos rojos llamados cerezas del café (Murthy y Madava Naidu, 2012). Aunque el 3% de las variedades pertenecientes a la especie Arábica producen también cerezas amarillas. La mayoría de las especies necesitan 210 días para crecer, las enanas necesitan menos tiempo y las clasificadas como gigantes necesitan 230-240 días (Klingel et al., 2020).



**Figura 1.** Ilustración de James Sowerby en un libro de botánica medicinal del siglo XIX sobre la flor blanca, la semilla y la hoja del café arábica (Hoffman, 2014)

Debido a la importancia del café Arábica en el mercado mundial, a continuación, expondremos en un cuadro comparativo (**Tabla 1**) algunas de las variedades más importantes de este tipo de café (Hoffman, 2014).

**Tabla 1.** Variedades y características del café Arábica

Variedad	Origen	Porte	Tamaño del fruto	Rendimiento
<b>Typica</b>	Original	Alto	Medio	Medio
<b>Borbón</b>	Mutación de Typica	Alto	Medio	Alto
<b>Mundo Novo</b>	Híbrido natural de Typica y Borbón	Bajo	Medio	Bueno
<b>Caturra</b>	Mutación de Borbón	Bajo	Medio	Bueno
<b>Catuai</b>	Híbrido entre Caturra y Mundo Novo	Alto	Muy grande	Bajo
<b>Maragogipe</b>	Mutación de Typica	Alto	Grande	Muy alto
<b>SL-28</b>	Variedad resistente a la sequía	Alto	Grande	Alto
<b>Geisha</b>	Origen etíope	Alto	Medio	Medio
<b>Pacas</b>	Mutación natural de Borbón	Bajo	Medio	Bueno
<b>Villar Sarchi</b>	Mutación natural de Borbón	Bajo	Bajo	Bueno
<b>Pacamara</b>	Cruce entre Pacas y Maragogipe	Bajo	Muy grande	Bueno

### 1.1.3. Procesado del café

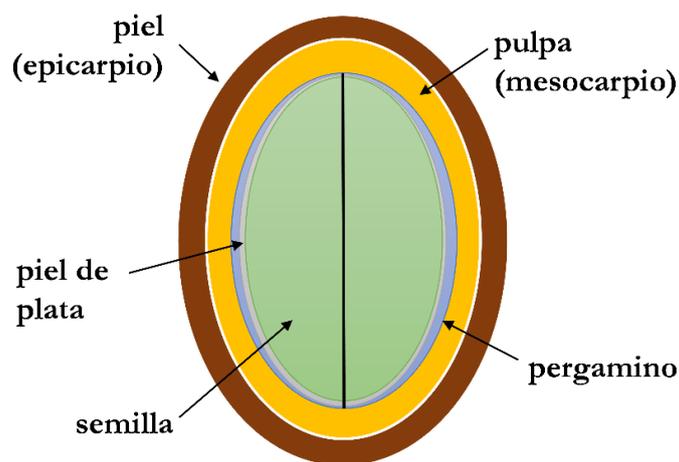
El café es una de las bebidas más populares en todo el mundo. Es el segundo producto con más valor por detrás del petróleo; para algunos países en vías de desarrollo, las exportaciones de café suponen más del 80% de sus ingresos (ICO, 2020).

Actualmente, más de 70 países son productores de café. En 2018-2019, la producción mundial de café fue de aproximadamente 171 millones de sacos (60 kg), mientras que el consumo fue de alrededor de 165 millones. Brasil es el país mayor productor de café del mundo, con aproximadamente 64 millones de sacos, seguido de Vietnam con 30 millones de sacos (ICO, 2020). Hoy, 125 millones de personas dependen de la producción de café para su subsistencia, y el café se consume en todas partes del mundo (Hoffman, 2014).

### ***Procesamiento postcosecha***

El procesamiento postcosecha ayuda a separar la semilla de las partes restantes del fruto del café para garantizar la calidad del producto final. El fruto del café tiene cinco capas, las cuales es necesario extraer en el proceso de producción y que darán lugar a los diferentes subproductos (Alves et al., 2017). De fuera hacia dentro, la cereza del café (**Figura 2**) está compuesta de:

- La piel (epicarpio o exocarpo), una capa monocelular cubierta de una sustancia cerosa. Puede ser roja, amarilla o rosa cuando está madura, dependiendo de la variedad.
- La pulpa (mesocarpo), compuesta por una pulpa carnosa y, en frutos maduros, una capa de mucílago viscoso pectináceo.
- El pergamino (endocarpo), una cubierta delgada de polisacárido.
- La piel de plata, un tegumento delgado que recubre directamente la semilla
- Dos semillas con forma elíptica



**Figura 2.** Corte longitudinal de la cereza del café (Mussatto et al., 2011)

El procesado del café puede desarrollarse por diferentes métodos en función del país productor y de las condiciones locales (p.ej. disponibilidad de

agua) (Alves et al., 2011). Así, los principales métodos empleados son el método seco y método húmedo, aunque existen también otros tipos de métodos como el semiseco y el método mecánico.

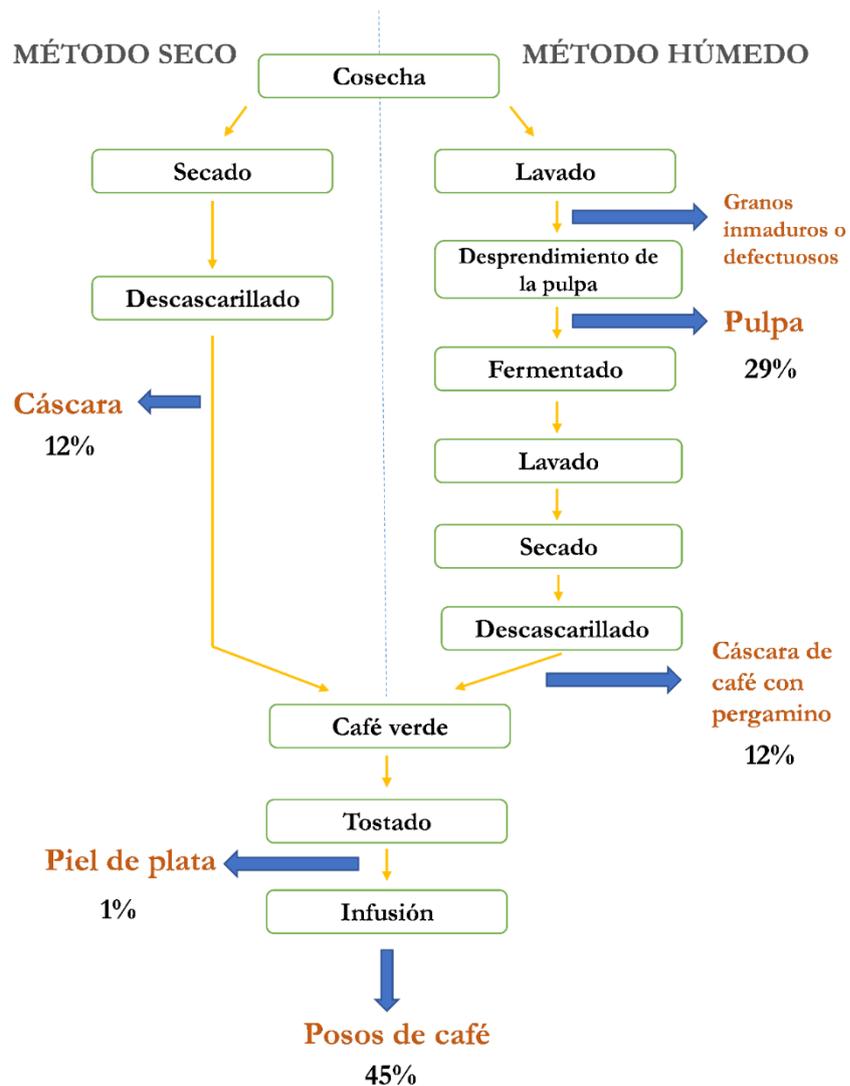
- Método seco. Este proceso es comúnmente utilizado para cafés Arábica brasileños, etíopes y haitianos, así como para café Robusta en la mayor parte del mundo (Alves et al., 2011). El proceso en seco consiste en el secado de las cerezas del café (hasta un 10-11% de humedad, Franca y Oliveira (2009)) seguido de un descascarillado mecánico. Las cerezas son recogidas y colocadas en capas finas, lo más rápidamente posible (**Figura 3**). Este paso es fundamental, junto con el mezclado para asegurar la calidad del café y evitar la descomposición por fermentado y el descoloramiento de las cerezas, debido al alto contenido en agua y azúcares en su composición. El proceso de secado puede realizarse bajo el sol o mediante secado mecánico, el cual es recomendado en las zonas de precipitaciones frecuentes. Durante el secado, las cerezas del café se desprenden del pergamino y después de 3-4 semanas se procede al proceso del descascarillado. Durante el descascarillado se desprenden la piel, la pulpa y el pergamino (Alves et al., 2017).



**Figura 3.** Secado en mantas de los granos de café (Hoffman, 2014)

- Método húmedo. Este método tiene tres etapas fundamentales: lavado y selección de las cerezas maduras, el desprendimiento de la pulpa y la fermentación (Alves et al., 2017). El café obtenido de este proceso será un café de mayor calidad que el café procesado mediante el método seco, y es utilizado para cafés Arábica de alta calidad (Alves et al., 2011). El proceso de limpieza y cribado se realiza en unos tanques con agua y esta separación se realiza por gravedad. Las cerezas maduras se quedan en la superficie y las verdes o defectuosas se van al fondo del tanque. Posteriormente tiene lugar la fase de desprendimiento de la pulpa, sin embargo, queda todavía en la superficie un mucílago responsable de características viscosas no deseables. El proceso de fermentación (24-72h) es el responsable de eliminar esta capa gelatinosa (Alves et al., 2017). Posteriormente tiene lugar el secado, hasta un 12% aproximadamente de humedad y como último paso sería el descascarillado de la cereza (Franca y Oliveira, 2009).
- Método semiseco o semilavado. Se combinan los métodos secos y húmedos anteriormente descritos. El método consiste en un lavado y cribado de las cerezas mediante gravedad, seguido de un desprendimiento de la pulpa, y posteriormente secado y descascarillado. Aquí se elimina el paso de la fermentación.
- Método mecánico. En este método existen un tipo de máquinas capaces de quitar la pulpa, el mucílago y lavar el pergamino para dejarlo listo para el secado y procesado (Ferraio, 2009).

En la **Figura 4**, podemos ver un esquema de los dos métodos principales utilizados en el procesado del café, así como los subproductos obtenidos en el mismo.



**Figura 4.** Esquema general del método húmedo y seco del procesamiento del café.  
Adaptado de Franca y Oliveira (2009) y Murthy y Madhava Naidu (2012)

### *Tostado del café*

El tostado del café (**Figura 5**) es otro de los procesos más importantes dentro de la elaboración del café debido a la formación de propiedades organolépticas específicas como el olor, sabor y el aroma, los cuales afectan a la calidad de la bebida del café (Mussatto et al., 2011). El tostado del café comprende tres fases: secado, tostado o pirolisis y enfriado. En la primera fase se libera el agua y las sustancias volátiles y el grano de café cambia de color verde a amarillo. En la segunda etapa es donde tienen lugar la denominada

reacción de Maillard en la cual se transforman componentes polifenólicos naturales en moléculas de una mayor complejidad (Murthy y Madhava Naidu, 2012), así como también la formación de compuestos orgánicos como resultado de la pirolisis (Mussatto et al., 2011). El proceso del tueste suele durar entre 8 a 15 min a una temperatura entre 180 y 240 °C (ICO, 2020). El proceso del tueste puede ser controlado para influir en tres aspectos fundamentales en el café: acidez, dulzor y amargor. Es generalmente aceptado que a mayor tueste hay menos acidez, pero mayor amargor y se obtienen granos de café más oscuros (Hoffman, 2014). Los granos de café verde están compuestos principalmente de carbohidratos (59-61%), lípidos (10-16%), proteínas (10%), y ácido clorogénico (7-10%) y por bajas cantidades de minerales (4%), ácidos alifáticos (2%) y cafeína (1-2%). Tras el tueste se reduce la cantidad de carbohidratos (38-42%), proteínas (8%), ácido clorogénico (3-4%), mientras que los lípidos (11-17%), minerales (5%), ácidos alifáticos (3%) y cafeína (1-2%) mantienen su contenido. Pero, además, como resultado de estas modificaciones se producen unos compuestos generados por la reacción de Maillard, de gran peso molecular, que son las melanoidinas (Moreira et al., 2012). De estos compuestos profundizaremos en el apartado *composición general de los posos de café*.



**Figura 5.** Tostado de café en la fábrica de la empresa Good African Coffee en Kampala (Hoffman, 2014)

## ***Bebida del café***

La preparación de la bebida del café puede realizarse mediante diferentes métodos: decocción (p.ej. café hervido, café turco, café percolado), infusión (p.ej., café filtrado, cafés napolitanos) o presión (p.ej. moka y cafés espresso) (Petracco, 2001). En la **Figura 6** se muestra la primera máquina de café espresso patentada en 1905 por *La Pavoni*, los cuales introdujeron este tipo de café en Europa y posteriormente al resto del mundo (Hoffman, 2014).



**Figura 6.** Primera máquina espresso patentada por La Pavoni (Hoffman, 2014)

El café está compuesto principalmente de agua y materia seca, como minerales, sustancias orgánicas (carbohidratos, lípidos, proteínas), alcaloides (cafeína y trigonelina), ácido fenólico y carboxílico y compuestos volátiles responsables del aroma (Torres-Valenzuela et al., 2019). La composición final de la bebida del café depende de tres factores principales: el método de preparación (p.ej. el tamaño del café, la proporción café/agua, el tiempo de extracción), la especie utilizada de café (Alves et al., 2017) y si el tueste ha sido largo o corto (Hoffman, 2014). En función de todos estos factores la bebida del café estará enriquecida en una serie de compuestos químicos y por lo tanto también se modifica la composición química de los residuos generados del procesado del café. Por lo tanto, tanto en la bebida como en los residuos resultantes de la bebida (posos de café) estarán enriquecidos de compuestos

bioactivos los cuales tienen muchas aplicaciones biotecnológicas como indicaremos en apartados posteriores.

Otro tipo de café ampliamente extendido en el mundo es el café instantáneo. El consumo de este tipo de café representa más del 70% del café consumido en Reino Unido, Irlanda y Australia, más del 50% en Japón, más del 40% en EE. UU. y Canadá, aproximadamente el 20% en España y 5% en Portugal (Alves et al., 2017). La preparación de este café consiste en la producción de la porción soluble seca de extractos acuosos de café mediante percolación, concentración y deshidratación (Alves et al., 2011). Los SCG resultantes de las industrias de café instantáneo son extraídos de una manera más exhaustiva, y por el contrario los SCG obtenidos de bares, restaurantes y casas, son más dispersos (Alves et al., 2017).

#### **1.1.4. SUBPRODUCTOS DEL CAFÉ**

##### ***Pulpa y cascarilla***

La cascarilla del café es el principal residuo obtenido durante el procesado en seco (**Figura 7**). La cascarilla representa el 12% de la cereza del café, y por cada tonelada de café cosechado, 0.18 toneladas de cascarilla de café son producidas (Murthy y Madhava Naidu, 2012).

Varios estudios han sido llevados a cabo para evaluar la composición química de la cascarilla del café. Murthy y Madhava Naidu (2012) recopilaron datos de diferentes autores, describiendo que la cascarilla del café está compuesta por 15% de humedad, 5.4-6.2% de cenizas, 7.0% de proteínas, 0.3% de lípidos, 72.3% de carbohidratos, 24.3% de celulosa, 29.7% de hemicelulosa y 23.7% de lignina. Franca y Oliveira (2009) también recopiló datos reportando que la cascarilla está compuesta de proteínas (8-11%), lípidos (0.5-3%), minerales (3-7%), carbohidratos (58-85%), azúcares reducidos (14%), cafeína (1%) y taninos (5%).



**Figura 7.** Cascarilla de café (Klingel et al., 2020)

Mediante el método húmedo se genera otro subproducto denominado pulpa de café (**Figura 8**), la cual corresponde al 40-50% del peso fresco de la cereza del café (Alves et al., 2017). Una tonelada de pulpa se produce de cada dos toneladas de café producidas (Murthy y Madhava Naidu, 2012). La pulpa de la cereza contiene 4-12% de proteínas, 1-2% de lípidos, 6-10% de minerales y 45-89% de carbohidratos (Klingel et al., 2020). Murthy y Madhava Naidu (2012) también recogen la composición de la pulpa destacando que es esencialmente rica en carbohidratos, proteínas y minerales (principalmente potasio) y también contiene polifenoles, cafeína y taninos. Los compuestos orgánicos incluyen taninos (1.80-8.56%), sustancias pépticas (6.5%), azúcares reducidos (12.4%), azúcares no reducidos (2.0%), cafeína (1.3%) ácido clorogénico (2.6%) y ácido cafeico (1.6%).



**Figura 8.** Pulpa de café (Murthy y Madhava Naidu, 2012)

Estos subproductos suponen una amenaza para el medio ambiente de los países productores de café ya que contaminan el suelo y el agua de los alrededores debido a su alto contenido en cafeína y taninos (Alves et al., 2017). Sin embargo, debido a su composición también se han sugerido numerosas aplicaciones.

Tanto la cascarilla como la pulpa de café han sido utilizadas como enmiendas orgánicas de suelos por el grupo de Kasongo. Así, Kasongo et al. (2011) adicionaron pulpa y cascarilla de café a un Arenosol del Congo para mejorar sus características fisicoquímicas. La adición de estos subproductos mejoró la capacidad de intercambio catiónico, incrementó el carbono orgánico y el nitrógeno del suelo, así como aumentó la capacidad de retención de agua del mismo. En el segundo trabajo, Kasongo et al. (2013) estudiaron el efecto de la pulpa y cascarilla sobre el crecimiento y la nutrición mineral del raigrás. Estos subproductos estimularon la absorción de Ca, Mg, K, N y P y aumentaron el rendimiento del cultivo tras tres ciclos de cultivo consecutivos. También han sido utilizados para compostaje o vermicompostaje (Shemekite et al., 2014).

Además de su reutilización en el campo de la agricultura, la pulpa y la cascarilla han sido objeto de estudio en las siguientes disciplinas: ingeniería química o medioambiental, biotecnología, microbiología, tecnología de los alimentos o combustibles energéticos. En una revisión realizada por Janissen y Huynh (2018) se recogen las principales aplicaciones tanto de la pulpa como de la cascarilla de café. Así, la cascarilla se utiliza como sustrato para la obtención de ácido cítrico, ácido clorogénico, etanol, ácido giberélico o como sustrato para el crecimiento de determinados hongos. La pulpa se usa como sustrato para la obtención de amilasa, ácido cafeico, celulosa, pectinasa o para la obtención de polifenoles.

### ***Piel de plata***

La piel de plata es una capa muy fina que se encuentra en contacto directo con el grano de café (**Figura 9**). Es el principal subproducto obtenido durante el tostado del café y de cada 120 toneladas de café tostado se obtienen 1 tonelada de piel de plata (Alves et al., 2017). Este subproducto se caracteriza por su alto contenido en fibra (86%) y su bajo contenido en humedad, lo que le hace ser un producto muy estable comparado con el resto de los subproductos (Borrelli et al., 2014). Además, la piel de plata está compuesta de carbohidratos (44%), celulosa (18%), hemicelulosa (13%), lípidos (2.2%), fibra total (62%), cenizas (4.7-7%), proteína (16.2-18.6%), nitrógeno (3%), cafeína (1.4%) y ácido clorogénico (15.82%) (Borrelli et al., 2004; Murthy y Madhava Naidu, 2012; Mussatto et al., 2011; Regazzoni et al., 2016). De la piel de plata se pueden obtener antioxidantes, ácido clorogénico, fibra dietética, fructooligosacáridos y  $\beta$ -fructofuranosidasa (Janissen y Huynh, 2018). En cuanto al contenido en elementos minerales, la piel de plata tiene un 5% de cenizas, conteniendo principalmente K, Ca, Mg, S, P y Fe (Ballesteros et al., 2014).



**Figura 9.** Piel de plata (Klingel et al., 2020)

### ***Granos de café inmaduros y defectuosos***

Los granos defectuosos son aquellos que presentan las siguientes características: son negros, inmaduros, presentan daños por insectos o tienen materiales extraños (Franca et al., 2005) (**Figura 10**). La presencia de granos de café defectuosos afecta de manera muy importante a la calidad de la bebida del

café en todo el mundo (Mendoza et al., 2008). Belay et al. (2014) recogieron de varios autores las diferencias entre los distintos tipos de granos inmaduros y defectuosos. Así los granos negros son el resultado de granos muertos dentro de las cerezas del café o de granos que caen naturalmente al suelo por la acción de la lluvia o la maduración excesiva y también debido a las enfermedades del café. La presencia de granos amargos puede estar asociada con la fermentación excesiva durante el procesamiento del café y con un secado o recolección inadecuados de cerezas demasiado inmaduras, mientras que los granos inmaduros provienen de los frutos inmaduros.



**Figura 10.** Granos de café defectuosos (Casas et al., 2017).

Si se comparan los granos de café no defectuosos con aquellos que presentan algún defecto, Mazzafera (1999) describió a los no defectuosos como granos más pesados y con mayores contenidos de humedad que los granos inmaduros o negros. Los niveles de proteínas y grasas son mayores en los granos no defectuosos, siendo los aminoácidos y los compuestos fenólicos

solubles mayores en los granos que sí lo están. Aunque también se ha reportado mayores contenidos de ácido clorogénico en los granos de café inmaduros. En cuanto al contenido en compuestos minerales, los granos de café defectuosos tienen un contenido mayor de minerales totales (6%) en comparación con los no defectuosos (5%), siendo el K el mineral predominante (Alves et al., 2017).

### ***Posos de café (spent coffee grounds, SCG)***

Los SCG (residuo de color oscuro de alta humedad, **Figura 11**) son el principal subproducto que se obtiene en el procesado de la bebida del café mediante dos vías: la preparación doméstica de la bebida (en cafeterías, restaurantes, casas) o mediante la preparación del café instantáneo en la industria. A nivel mundial se producen aproximadamente 15 millones de toneladas al año (Kamil et al., 2019). Si comparamos ambos subproductos, aquel que se obtiene de manera doméstica es más rico en compuestos químicos comparado con el instantáneo, ya que durante la obtención de este último la extracción es máxima para obtener máximos rendimientos (Alves et al., 2017).

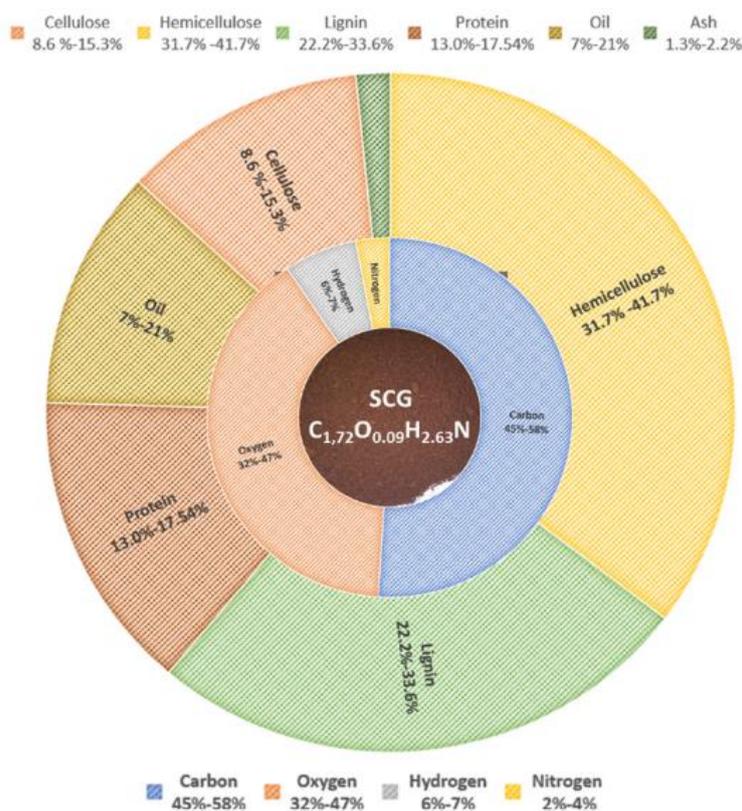


**Figura 11.** Posos de café (Klingel et al., 2020)

#### **1.1.5. Composición general de los posos de café**

La composición de los SCG es variable debido a que existen numerosos factores que intervienen en ella: método de preparación de la bebida del café,

condiciones del cultivo del mismo o tipo de café empleado. A pesar de todo ello, la mayoría de los SCG presentan una composición similar (McNutt y He, 2019). En el siguiente gráfico se resumen la composición principal de los SCG según Battista et al. (2020) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Composición principal de los posos de café (Battista et al., 2020).

### ***Lípidos***

Los lípidos de los SCG se caracterizan por su color anaranjado o de color chocolate, así como por su olor a café suave (Kovalcik et al., 2018). Han sido múltiples los trabajos que reportan el contenido de lípidos de los SCG. La mayoría de los trabajos reportan contenidos altos, de aproximadamente un 15% (Mussatto et al., 2011), incluso hasta un 20% (Campos-Vega et al., 2015), aunque Ballesteros et al. (2014) reportó contenidos más bajos de lípidos en los SCG (2.29%). La cantidad de lípidos extraíbles de los SCG depende del método de elaboración y extracción de los SCG (Kovalcik et al., 2018): la extracción con

disolventes polares tiene un rendimiento menor que la extracción con disolventes orgánicos no polares, como el hexano. Otra alternativa a los disolventes es la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico.

De acuerdo con Campos-Vega et al. (2015) los lípidos de los SCG están compuestos principalmente de ácido linoleico, palmítico, esteárico y oleico. Y clasifica a los SCG en dos grupos: aquellos con un bajo contenido en ácido palmítico (<40%) y alto contenido en linoleico (>40%) y aquellos que tienen alto contenido en palmítico (>40%) y bajo en linoleico (<40%). En este mismo sentido, Couto et al. (2009) reportaron que los principales ácidos grasos de los SCG eran el ácido linoleico y palmítico, suponiendo hasta un 35% del total de ácidos grasos de los SCG. Por otro lado, Kovalcik et al. (2018) encontraron que la composición del aceite extraído de los SCG difiere ligeramente de los granos de café crudos, pero que generalmente el aceite extraído de los SCG contiene alrededor de un 75% de triglicéridos, 14% de ésteres terpénicos, 5% de acilglicerol parciales, 1% ácidos grasos libres 1.5% de esterol libre, 1% de ésteres de esterol y 1% de lípidos polares.

### ***Carbohidratos***

Los carbohidratos son los constituyentes más importantes del café y lo mismo sucede con los SCG (Mussatto et al., 2011). El contenido de fibra dietética total es de un 62%, siendo predominante la parte insoluble: cinco veces mayor que la parte soluble (Ballesteros et al., 2014). Los principales componentes de los SCG son los polisacáridos, más específicamente celulosa y hemicelulosa, los cuales suman un total de un 50% de la masa seca de los SCG (McNutt y He, 2019). La celulosa comprende un 10% y la hemicelulosa se encuentra en mayor cantidad alcanzando un 30 o 40%, y se encuentra representada por mananos y arabinogalactanos (Campos-Vega et al., 2015).

En cuanto a la composición en azúcares, los SCG contienen un 46.8% de manosa, 30.4% de galactosa, 19% de glucosa y un 3.8% de arabinosa

(Mussatto et al., 2011). Otros valores distintos fueron reportados en el estudio de Simoes et al. (2009) para los SCG: manosa (57%), galactosa (26%), glucosa (11%) y arabinosa (6%).

La lignina, una macromolécula compuesta por una gran variedad de compuestos funcionales también está presente en cantidades significativas (24%) y es superior a la de otros materiales lignocelulósicos como la paja de arroz, la paja de cebada y el bagazo de la caña de azúcar (Ballesteros et al., 2014).

### ***Proteínas***

Los SCG también contienen un alto contenido en proteínas (13.6%), mientras que el grano de café tostado tiene un 3.1% lo que se debe a que en la preparación de la bebida del café se extraen otros compuestos y se concentran las proteínas en el residuo sólido (Mussatto et al., 2011). La aptitud de las proteínas de los SCG es pobre debido al tratamiento térmico y al alto contenido en polifenoles y melanoidinas (Alves et al., 2017). Lago et al. (2001) reportaron que los SCG contenían los siguientes aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, serina, histidina, glicina, treonina, alanina, arginina, tirosina, cistina, valina, metionina, fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina y prolina.

### ***Compuestos bioactivos***

Asociados a la fibra dietética y a las proteínas, diferentes compuestos químicos relacionadas con la salud como son los compuestos fenólicos han sido reportados en cantidades importantes en los SCG (Jiménez-Zamora et al., 2015; Kovalcik et al., 2018). Según Kovalcik et al. (2018) la cantidad de compuestos fenólicos en los SCG se encuentra entre 4.6-9.9 mg/g de SCG o 16-173.3 equivalentes de ácido gálico/g de SCG. Según Jiménez-Zamora et al. (2015) el contenido de polifenoles totales en los SCG ronda el 17.3%, siendo el 5-ácido cafeilquinico el ácido clorogénico más abundante en los SCG. Panusa et al. (2013) reportaron que el contenido total de ácido clorogénico y derivados varía

entre 1.6 y 6 mg/g de SCG. Además del ácido clorogénico, hay otros muchos compuestos fenólicos presentes en los SCG como son los ácidos ferulilquínicos, ácidos p-cumaroilquínicos y diésteres mixtos de ácido cafeico y ferúlico con ácido quínico (Alves et al., 2017). Debido a su riqueza en compuestos bioactivos, los SCG han sido estudiados como ingredientes alimentarios valorando su actividad prebiótica, antimicrobiana y antioxidante (Jiménez-Zamora et al., 2015).

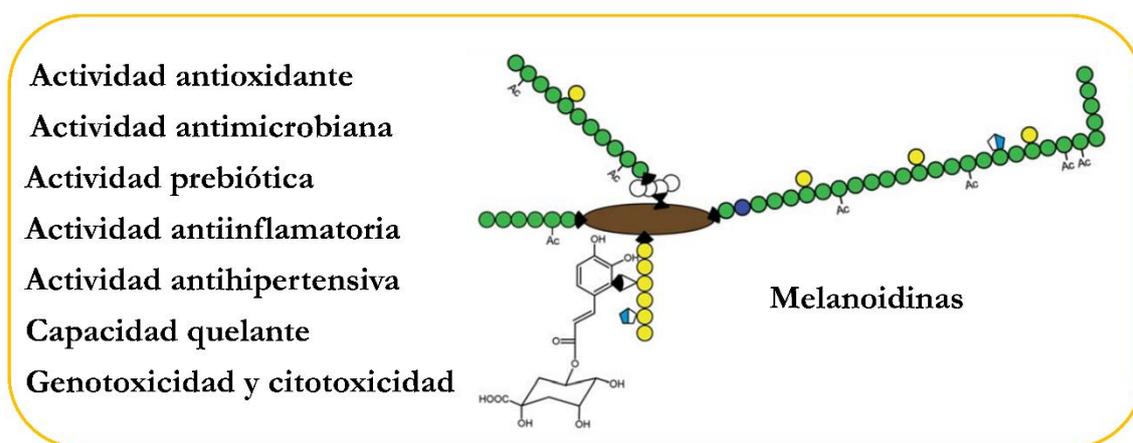
Otro compuesto bioactivo importante presente en los SCG es la cafeína encontrándose en valores entre 3.19 y 9.67 mg/g, lo cual depende de la variedad utilizada, presentando los SCG procedentes de la variedad Robusta más cafeína que la del café Arábica (Shang et al., 2017). Bravo et al. (2012) también determinaron la cafeína de los SCG procedentes de distintas cafeterías encontrando valores entre 3.59 y 8.09 mg/g atribuyendo esta variabilidad al diferente método de obtención de los SCG (filtrado, espresso, moka).

De acuerdo con Monente et al. (2015) el 54% de los ácidos fenólicos con una o más moléculas de ácido cafeico se encuentra unido a macromoléculas como son las melanoidinas las cuales describiremos más detalladamente en el siguiente apartado.

### ***Melanoidinas***

Las melanoidinas son compuestos de alto peso molecular (estimado entre 3 y 22 kDa aunque pueden llegar hasta 100kDa unidos a otras moléculas (Pastoriza y Rufián-Henares, 2014) de color marrón formados en las últimas etapas de la reacción de Maillard (Ames et al., 1999). Las melanoidinas del café son responsables del color marrón característico del café porque pueden absorber la luz en longitudes de onda altas, como 420 nm (Pastoriza y Rufián-Henares, 2014). Hay muy poca información acerca de su estructura química, aunque se forman durante el procesado térmico de un gran número de alimentos como son el café, el pan, la malta, la carne o la salsa de tomate

(Moreira et al., 2012). Se estima que suponen un 25% de los granos de café tostados y un 29% de la bebida del café (Belitz et al., 2009). En cuanto a su composición están compuestas de polisacáridos (galactomananos y arabinogalactanos), proteínas (con alta concentración de ácido aspártico y glutámico, alanina y glicina) y compuestos fenólicos, principalmente ácido clorogénico, siendo los más importantes el ácido cafeico, coumárico o el ácido ferúlico (Pastoriza y Rufián-Henares, 2014). Debido a su composición de bajo y alto peso molecular, las melanoidinas presentan beneficios para la salud como son su actividad antioxidante, antimicrobiana, prebiótica, antihipertensiva, antiinflamatoria, presentan genotoxicidad y citotoxicidad, así como capacidad quelante (Moreira et al., 2012; Rufián-Henares y de la Cueva, 2009; Pastoriza y Rufián-Henares, 2014; Wang et al., 2011) (**Figura 13**).



**Figura 13.** Estructura de las melanoidinas (Moreira et al., 2012) y propiedades de las mismas.

### ***Elementos minerales***

En cuanto a los elementos minerales, Ballesteros et al. (2014) analizaron el contenido en cenizas de los SCG, siendo un porcentaje minoritario (1.3%). El K es el macroelemento mayoritario en los SCG con 11700 mg/kg, seguido de Mg (1900 mg/kg), P (1800 mg/kg), S (1600 mg/kg) y Ca (1200 mg/kg). En

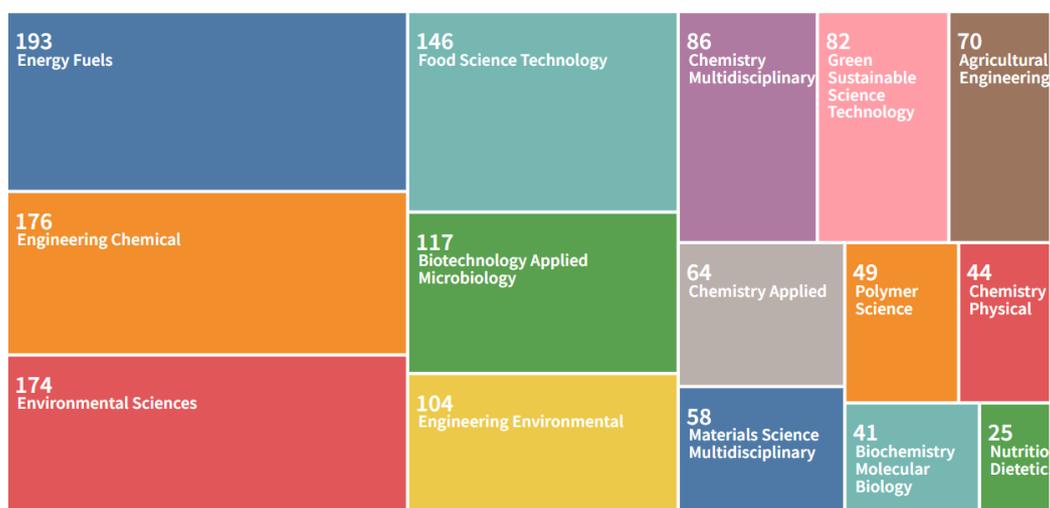
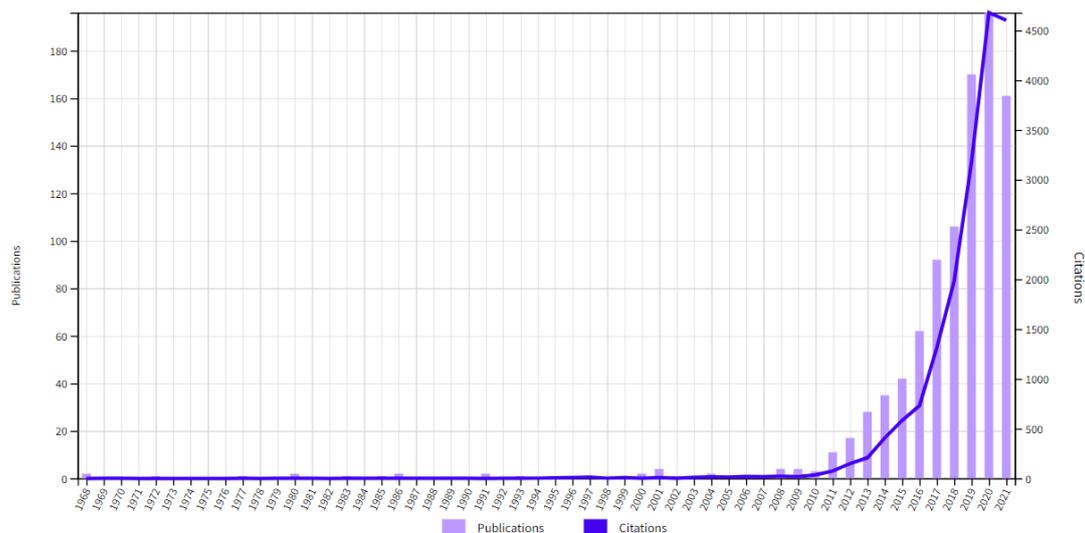
cuanto a los microelementos los SCG son ricos en Fe (52 mg/kg), Mn (29 mg/kg), Cu (19 mg/kg), Co (15 mg/kg) y Zn (8 mg/kg).

## **1.2. APLICACIONES POTENCIALES DE LOS POSOS DE CAFÉ**

La **Figura 14** demuestra el creciente interés de los SCG como residuo en los últimos años. Así también podemos observar como la mayor parte de los artículos referentes a los SCG se encuentran en el campo de los combustibles energéticos, ciencias medioambientales, ingeniería química, ciencia y tecnología de los alimentos y biotecnología aplicada a la microbiología.

Los SCG se pueden reciclar de diferentes formas para producir varios tipos de biocombustibles, como biohidrógeno, biobutanol, biodiesel, pellets de combustible, bioaceite, bioetanol, biogás y combustibles de hidrocarburos o productos de valor añadido como compuestos bioactivos, compuestos para las industrias alimentaria, farmacéutica, cosmética y química y antioxidantes y actividades antitumorales, adsorbentes, compostaje, co-compostaje, vermicompostaje, nanocomposites, biopolímeros, cremas-exfoliantes, jabones y detergentes, control de olores, textiles, tintas y pintura serigráfica, hilados y producción de pulpa y papel (Atabani et al., 2019).

En los siguientes apartados profundizaremos en las aplicaciones biotecnológicas, energéticas y medioambientales de los SCG, así como describiremos en profundidad los últimos estudios publicados acerca del compostaje, co-compostaje y vermicompostaje de los SCG.



**Figura 14.** Número de artículos publicados sobre los SCG de acuerdo a la base de datos Web of Science (último acceso 25-09-2021 “spent coffee grounds”). Número de artículos publicados distribuidos en las categorías establecidas por la plataforma Web of Science.

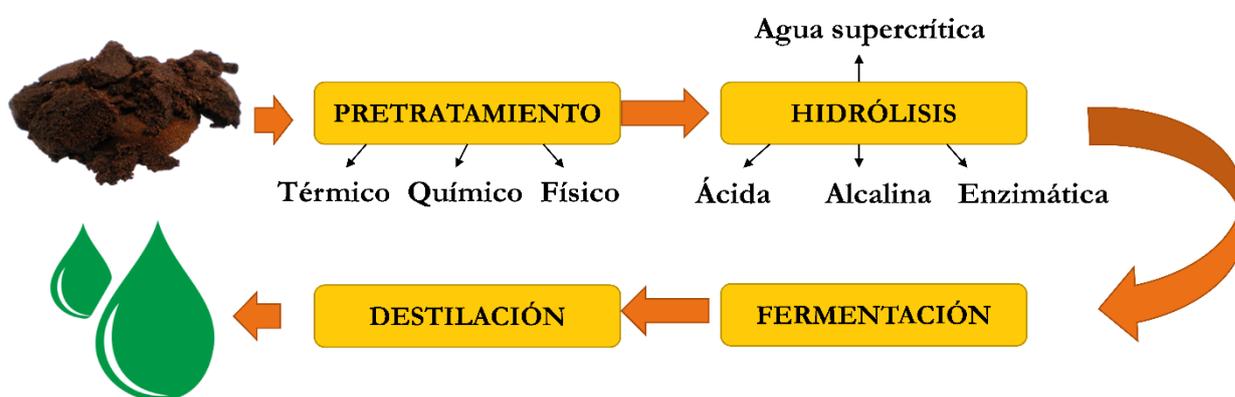
### 1.2.1. Aplicaciones biotecnológicas

Los SCG han sido también utilizados como sustratos para microorganismos para generar productos de alto valor añadido. Su rica composición en azúcares, proteínas, celulosa, hemicelulosa, ligninas y aceite les hace susceptibles de ser utilizados para la obtención de etanol, ácidos orgánicos,

compuestos volátiles aromáticos, pigmentos, biomasa microbiana y enzimas (Hikichi et al., 2017).

### ***Bioetanol***

Debido a su alto contenido en carbohidratos, los SCG son un sustrato propicio para la obtención de bioetanol. En la **Figura 15** se representan las principales etapas para la elaboración de bioetanol a partir de los SCG. El paso más importante para la obtención de etanol es la transformación de carbohidratos en azúcares fermentables (Battista et al., 2020). De acuerdo con la revisión realizada por estos mismos autores, para la conversión de azúcares fermentables en bioetanol se emplean levaduras, hongos y bacterias, destacando *Sacaromyces cerevisiae* como la levadura más empleada. Se acepta un contenido de etanol de un 4% v/v como la concentración mínima para que el proceso sea económicamente rentable. En la literatura se reportan contenidos entre 1.76% y 3.75% v/v (Battista et al., 2020).



**Figura 1.** Obtención de bioetanol a partir de SCG (adaptado de Battista et al., 2020)

### ***Compuestos aromáticos volátiles***

Sampaio et al. (2013) estudiaron los compuestos volátiles presentes en los SCG. Para ello sometieron a los SCG a una extracción térmica previa fermentación con *Sacaromyces cerevisiae*. Entre los compuestos mayoritarios presentes en los SCG se encuentra el acetaldehído, el acetato de etilo, el

metanol, destacando el alcohol isobutílico (269 mg/L) y el alcohol isoamílico (810 mg/L). Entre los compuestos volátiles minoritarios destacan el butirato de etilo, el acetato isoamílico, el ácido láurico, carproico o caprílico, entre otros.

### ***Carotenoides***

Dos ejemplos del uso de SCG para producir carotenoides son el trabajo de Obruca et al. (2015) y Petrik et al. (2014). En ambos estudios, los autores citan el uso de *Sporobolomyces roseus*, una levadura "roja" reconocida como productora de pigmentos, principalmente  $\beta$ -caroteno. Petrik et al. (2014) utilizaron también otras levaduras carotenógenas como *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. glutinis*, *Cystofilobasidium capitatum*. La producción de carotenoides y  $\beta$ -caroteno fue mayor cuando se utilizó *S. roseus*. Según los autores y asumiendo el uso de reactores de 100 m<sup>3</sup>, la producción podría rondar los 174 kg de carotenoides y 109 kg de  $\beta$ -caroteno anualmente.

### ***Producción de hongos y enzimas***

Leifa et al. (2000a) utilizaron los SCG como sustrato para el cultivo de hongos *Plentorus ostreatus* mediante fermentación en estado sólido. La eficiencia biológica de este hongo alcanzó el 96.5% en un periodo de 60 días. En otro estudio, Leifa et al. (2000b) evaluaron la eficacia de dos cepas de *Leninoula edodes* cultivada con SCG y la eficiencia biológica fue del 89%. Por el contrario, los SCG parecen tener efectos tóxicos sobre *Grifola frondosa* (Barreto et al., 2007). Montoya et al. (2012) también comprobaron que la adición de SCG disminuyó el crecimiento de hongos y de actividades enzimáticas. Murthy et al. (2009) estudiaron la producción de  $\alpha$ -amilasa utilizando el hongo *Neurospora crassa* encontrando una actividad máxima de 2844 U/g después de 5 días de cultivo.

### **1.2.2. Aplicaciones energéticas**

Las posibilidades de uso de los SCG para aplicaciones energéticas (biofuel, biodiesel), a través de procesos termoquímicos (pirolisis, gasificación, combustión, tratamiento hidrotermal) ha sido ampliamente descritos en la bibliografía (Limousy et al., 2017). El reciclado de estos residuos para la obtención de energía es una de las vías para solucionar la gran cantidad de residuos generados debido al incremento de la población, el crecimiento industrial y el consumo humano (Atabani et al., 2019).

#### ***Combustión***

La baja densidad aparente de los SCG limita su uso directo para la combustión en el mercado local. De hecho, el costo del transporte y almacenamiento de los SCG es demasiado alto para generar ganancias en el caso de la exportación. Por lo tanto, la única posibilidad de valorizar estos subproductos es realizar una densificación después del secado. Se pueden utilizar diferentes tecnologías para obtener combustibles de alta densidad a partir de los SCG como la generación de pellets o la fabricación de briquetas (Limousy et al., 2017). Limousy et al. (2013) y (2015) han investigado sobre cómo producir combustibles a partir de SCG y adaptar estos combustibles a los sistemas de combustión convencionales. Así, Limousy et al. (2013) observaron que la eficiencia de combustión de los pellets de SCG puros era bastante alta (86.3%).

#### ***Pirolisis***

La pirolisis consiste en una degradación térmica en ausencia de oxígeno. El rango de temperatura normalmente utilizado es de 400-600°C y el proceso genera gas, líquido y sólido (Limousy et al., 2017). La pirolisis se puede dividir en tres categorías dependiendo de la rampa de temperatura utilizada: lenta, rápida o flash. Vardon et al. (2013) investigaron el efecto del desengrasado de

los SCG sobre los productos de la pirolisis lenta. Debido a la extracción de lípidos el rendimiento del bio-oil disminuyó de un 27% en los SCG a un 14% en los SCG desengrasados. Los rendimientos del biochar de SCG (27-28%) y gas (21-24%) fueron bastante similares entre ambos subproductos. Por otro lado, la pirolisis rápida de los SCG ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. Bok et al. (2012) estudiaron la pirolisis rápida de los SCG concluyendo que la temperatura era el factor más importante. Estos autores reportaron un poder calorífico para los SCG de 22.74 MJ/kg. Ngo et al. (2015) también pirolizaron los SCG obteniendo un rendimiento de biochar entre el 15-23% y un rendimiento de bio-oil del 58.5%. Kelkar et al. (2015) encontraron para los SCG, rendimientos de bio-oil similares (61.8%).

### ***Torrefacción***

Otra alternativa para tratar térmicamente los SCG es mediante torrefacción, utilizando temperaturas más bajas que con la pirolisis (200-350°C). En un estudio reciente, Vakalis et al. (2019) estudiaron la torrefacción de los SCG reportando un rendimiento sólido del 78-83% y de un poder calorífico de 24-25 MJ/Kg.

### ***Gasificación***

El proceso de gasificación es una alternativa válida a los procesos termoquímicos tradicionales para la generación de energía o para la producción de biocombustibles y químicos verdes. De acuerdo con Famielec y Kepka (2019) los SCG son un material adecuado para someterlo al proceso de gasificación debido al alto contenido de materia orgánica y al calor de combustión relativamente alto. Estos investigadores comprobaron que la adición de un 20-30% de SCG a las astillas de sauce aumenta el poder calorífico del material de entrada, influye positivamente en las condiciones térmicas en el reactor y contribuye a una mayor eficiencia de la recepción de calor. La

investigación de estos autores ha confirmado la viabilidad de aplicar SCG como aditivo a la biomasa de madera en un proceso de gasificación.

### ***Carbonización hidrotermal***

La carbonización hidrotermal (“hydrothermal carbonization” = HTC) es un proceso termoquímico en agua a regímenes de temperatura moderada (180-250 °C) bajo presiones saturadas (2-40MPa), en el que se generan reacciones de deshidratación, descarboxilación y desmetanización (Xiao et al., 2012). Los SCG también se han utilizado como sustratos en el proceso HTC (Afolabi et al., 2020; Kim et al., 2017) debido a su composición: alto contenido de polisacáridos, lignina, proteínas, cafeína, compuestos fenólicos y melanoidinas (Alves et al., 2017). Ambos grupos de investigación (Afolabi et al., 2020; Kim et al., 2017) reportaron un producto resultante, denominado hidrochar, con mayor contenido de carbono y carbono fijado debido a reacciones de deshidratación y descarboxilación, ya que el 60-84% del carbono se puede retener en el hidrochar (Libra et al., 2011). El líquido obtenido del proceso HTC también se ha empleado para obtener manooligosacáridos (la mayor cantidad se obtuvo después de 60 min a 185 °C) a partir de SCG como promotor de una comunidad microbiana intestinal más saludable (Pérez-Burillo et al., 2019).

### **1.2.3. Aplicaciones medioambientales**

Entre las aplicaciones medioambientales de los SCG frescos se encuentra la absorción de un amplio rango de contaminantes. Esto se debe a que los SCG tienen una estructura microporosa con un área superficial de 300-1000 m<sup>2</sup>/g y capacidad quelante de metales (Kovalcik et al., 2018). Los SCG han sido utilizados para eliminar numerosos metales del agua, como arsénico, cobre, níquel, cadmio, plomo, mercurio y estaño (McNutt y He, 2019). Por ejemplo, Dávila-Guzmán et al. (2013) reportó una capacidad de adsorción de Cu de los

SCG tres veces superior que la del carbón activo. Aunque también se ha experimentado con modificaciones de los SCG para aumentar su capacidad de adsorción: modificación alcalina, microondas, activación con KOH, carbonización, tratamiento con polipropileno, etc. (Kovalcik et al., 2018).

#### **1.2.4. Compostaje**

El compostaje es una alternativa en el manejo de los SCG debido al carácter tóxico de los mismos. Liu y Price (2011) evaluaron dos sistemas de compostaje en el manejo de los SCG: compostaje en recipientes y compostaje en pila estática aireados (en un periodo entre 47 y 98 días), concluyendo que los SCG pueden ser compostados exitosamente en ambos sistemas alcanzando siempre una C/N en el rango óptimo de <math><25:1</math>. El grupo de Santos et al. (2017) estudió el efecto de diferentes dosis de SCG con raíces de *Acacia dealbata* L. y paja de trigo en el proceso de compostaje, emisiones gaseosas y calidad del producto final. Estos autores reportaron que los SCG pueden ser co-compostados en todas las proporciones, siendo la dosis del 40% de SCG la más favorable en cuestiones de condiciones de compostaje, bajas emisiones de gases de efecto invernadero y mejor calidad del producto final. Ronga et al. (2015) evaluaron el compost de SCG como una alternativa a la turba comercial y otros fertilizantes utilizados para la producción de plantas en macetas. De acuerdo con estos últimos autores, las características fisicoquímicas del compost de SCG lo hacían ser apropiado para ser usado como sustrato para este tipo de cultivos. Por otro lado, Hachicha et al. (2012) co-compostaron los SCG con aguas residuales de almazara, demostrando los SCG ser una materia prima altamente compostable que condujo a un compost con un mayor grado de humificación, baja relación C-N y pérdida de fitotoxicidad. Como aspecto negativo, Kopec et al. (2017) demostraron que el compost enriquecido en SCG reducía la actividad biológica del compost medida por la capacidad de germinación de las semillas.

Además del compostaje y co-compostaje de los SCG, estudios recientes han demostrado la viabilidad de los SCG como sustrato para el vermicompostaje. Este se define como un proceso bio-oxidativo en el que las lombrices interactúan intensamente con microorganismos y otra fauna dentro de la comunidad de descomponedores, acelerando la estabilización de la materia orgánica y modificando en gran medida sus propiedades físicas y bioquímicas (Domínguez y Gómez-Brandón, 2012). En un estudio reciente, González-Moreno et al. (2020) estudiaron los SCG como sustrato para el vermicompostaje junto con el estiércol de caballo, usando *Eisenia andrei* como lombriz. Los autores concluyeron que los SCG no suponían ninguna toxicidad y que una dosis del 25% de SCG era la mejor opción para obtener un vermicompost de calidad. Sánchez-Hernández y Domínguez (2017) también estudiaron los SCG como sustrato y determinaron la población de lombrices (*Eisenia andrei*) y las propiedades químicas y bioquímicas del vermicompost. Con la adición de SCG la densidad y biomasa de las lombrices aumentó continuamente entre los 14-28 días alcanzando una densidad de aproximadamente 14000 individuos/m<sup>2</sup>, lo que demuestra la viabilidad del vermicompostaje de los SCG a pesar de su alto contenido en cafeína y compuestos bioactivos. Como consecuencia de la rápida mineralización del C durante el vermicompostaje, hubo un aumento de micro y macroelementos en el vermicompostaje de SCG. Las principales propiedades fisicoquímicas de los SCG vermicompostados se muestran en la **Tabla 2** y se observa como cumplen con los criterios de calidad de un buen vermicompost. Por el contrario, en otro estudio llevado a cabo por Liu y Price (2011) con *Eisenia fetida*, encontraron que la supervivencia de las lombrices en los SCG era baja y sugerían mezclarlo con otro tipo de productos para obtener un mejor vermicompost.

**Tabla 2.** Propiedades químicas y fisicoquímicas del vermicompost de SCG (Sánchez-Hernández y Domínguez, 2017).

pH	6.34
Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	179
Humedad (%)	66.4
Materia orgánica (%)	98.7
C (%)	53.2
N (%)	2.34
C/N	22.7
P (g/kg)	1.1
K(g/kg)	3
Ca (g/kg)	1.23
Mg (g/kg)	1.4

## **1.3. UTILIZACIÓN DE POSOS DE CAFÉ COMO ENMIENDAS ORGÁNICAS DE SUELOS**

### **1.3.1. Efectos de los posos de café sobre la fertilidad del suelo**

Los SCG han sido utilizados tradicionalmente en agricultura debido a su naturaleza orgánica. Sin embargo, no ha sido hasta hace unos pocos años en los que se ha comenzado a profundizar sobre el efecto que estos residuos tienen sobre el suelo. Yamane et al. (2014) estudiaron el efecto de la adición de SCG en campos de cultivo. Los SCG incrementaron los contenidos de C y N y redujeron la relación C/N del suelo. En un trabajo más reciente, Turek et al. (2019) estudiaron el efecto de los SCG en cantidades de 0, 5, 10, 15 y 20% sobre algunas propiedades físicas e hidráulicas del suelo, como la retención de agua y la aireación. La adición de SCG incrementó la humedad a capacidad de campo y como consecuencia incrementó el agua disponible para las plantas. Como aspecto negativo, los SCG disminuyeron la porosidad de drenaje del suelo. Este incremento de la capacidad de retención de agua por los SCG también fue

encontrado por Hardgrove y Livesley (2016). Ellos adicionaron SCG en cantidades de 2.5, 5, 10 y 20% tanto a un suelo arenoso como limoso. En cuanto al efecto de los SCG sobre el pH del suelo, estos mismos autores obtuvieron resultados contradictorios: los SCG aumentaron el pH del suelo en un ensayo en invernadero, sin embargo, disminuyeron el pH en un ensayo a campo abierto. Hardgrove y Livesley (2016) lo justifican debido a que en el ensayo de invernadero no hubo suficiente percolación, lo que produciría un incremento de los cationes intercambiables, lo que podría conducir en una disminución de iones  $H^+$  y condiciones menos ácidas en el suelo. Kitou y Yoshida (1997) encontraron resultados similares (aumento del pH) en un estudio llevado a cabo en macetas.

Los SCG no solo han sido utilizados como enmiendas orgánicas de suelos, han sido también utilizados como sustratos de cultivo para reemplazar la turba. En este sentido, Cruz et al. (2015) estudiaron el efecto de diferentes cantidades de SCG (5, 10, 15, 20 y 30%) sobre turba en un estudio de invernadero. Ellos midieron pH, conductividad eléctrica, carbono orgánico y residuos de cafeína. La adición de SCG disminuyó el pH y la conductividad eléctrica de la turba, incrementó el carbono orgánico, así como aportó residuos de cafeína al sustrato que durante el tiempo de cultivo se degradaron. Estos mismos autores en otro estudio (Cruz et al., 2014b) evaluaron el efecto de los SCG sobre la nutrición mineral del sustrato analizando K, Mg, Ca, P, Na, Fe, Mn, Zn y Cu. La adición de un 10% de SCG incrementó los contenidos de K, Mg, Zn y Cu lo que atribuyen a que estos elementos se quedan en la matriz de los SCG a través de sustancias potencialmente quelantes (Morikawa y Saigusa, 2008).

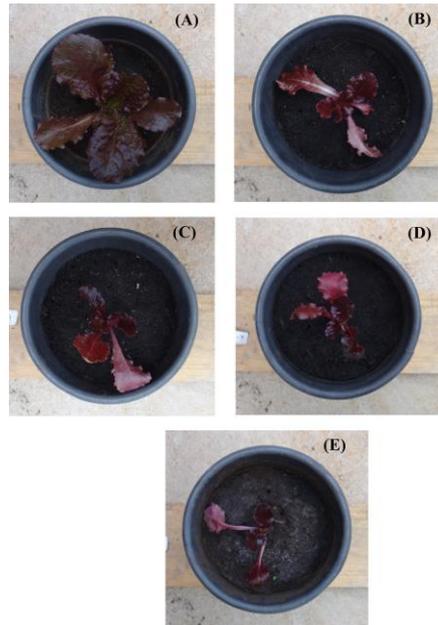
### **1.3.2. Efectos de los posos de café sobre el crecimiento y la nutrición mineral de las plantas**

Son muchos los trabajos que han reportado el efecto de los SCG sobre el crecimiento y el contenido minerales y de compuestos bioactivos de diversos tipos de plantas. Así, se ha estudiado sobre plantas alimenticias (tanto para humanos como para animales) como el frijol, la soja, el haba, la alfalfa, el trigo, el maíz, el trébol, el sorgo, el girasol, la avena, el centeno, la cebada, el trigo sarraceno, la lechuga, la albahaca, el raigrás, el tomate, zanahoria, espinaca, *Brassica* (Chrysargyris et al., 2020; Cruz et al., 2012; 2014a; 2014b; 2015; Cruz y Cordovil, 2015; Hardgrove y Livesley, 2016; Kitou y Yoshida, 1997; Ribeiro et al., 2017; Ronga et al., 2016; Vardon et al., 2013 Yamane et al., 2014), aunque también se ha estudiado plantas que no tienen carácter alimentario como el pino (Caliskan et al., 2020). Además, los SCG se han estudiado de manera fresca, es decir, sin ningún tipo de tratamiento (Cruz et al., 2012; 2014a; 2014b; 2015; Cruz y Cordovil, 2015; Hardgrove y Livesley, 2016; Kitou y Yoshida, 1997; Yamane et al., 2014), aunque también se ha estudiado su efecto en las plantas cuando se han compostado (Cruz et al., 2015; Ronga et al., 2016), carbonizado (Vardon et al., 2013) o adicionado de otro tipo de residuos (Ciesielczuk et al., 2017; Ribeiro et al., 2017).

#### ***Efectos sobre el crecimiento***

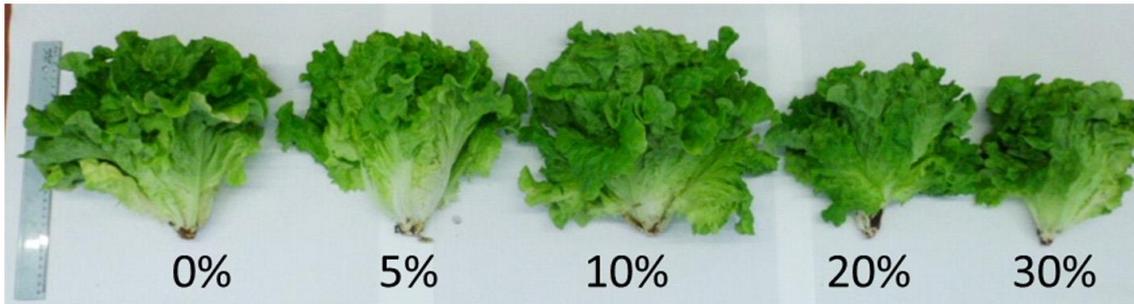
La primera referencia sobre el efecto de los SCG sobre el crecimiento de plantas la encontramos en Kitou y Yoshida (1997). En un estudio con macetas, ellos estudiaron el efecto de este residuo en una concentración del 1 y del 2% sobre el crecimiento de 12 plantas alimenticias encontrando una inhibición en la mayoría de ellas, atribuyendo este efecto a la inmovilización del N, a la multiplicación de hongos patógenos para la planta o a la liberación de fitotoxinas derivadas de la materia orgánica fresca. Posteriormente muchos autores han encontrado el mismo efecto perjudicial de los SCG sobre el

crecimiento de las plantas. Yamane et al. (2014) quisieron corroborar el efecto negativo de los SCG encontrado en ensayo con macetas, en un ensayo de campo. Los SCG mostraron tener un efecto negativo sobre las diferentes tipologías de plantas, atribuyendo esta inhibición a la presencia de cafeína, taninos y polifenoles en los SCG (Pandey et al., 2000). Estos autores también aconsejan el uso de especies leguminosas en el suelo cuando se adicionan SCG para contrarrestar la posible inmovilización del N debido a adición de un residuo sin transformar. Cruz y Cordovil (2015) también encontraron una inhibición al crecimiento de zanahoria, espinaca y lechuga. Este grupo estudió la biodisponibilidad del N y del P cuando se adicionaba SCG, concluyendo que los SCG inmovilizaban estos elementos pudiendo ser los causantes de la falta de crecimiento de los cultivos. En esta misma línea de investigación, Hardgrove y Livesley (2016), adicionaron SCG frescos aislados, y SCG frescos con un fertilizante nitrogenado para confirmar la hipótesis de la inmovilización del N. Estos autores encontraron que había limitación al crecimiento tanto con los SCG aislados como con los SCG con fertilizante nitrogenado. Por lo tanto, ellos concluían que la inhibición al crecimiento de las plantas debía de ser sólo por los compuestos fitotóxicos presentes en los SCG, o que la dosis de N empleada no era la suficiente como para superar la inmovilización microbiana. En la **Figura 16** podemos observar el efecto negativo de los SCG en diferentes proporciones sobre un tipo de lechuga (Turek et al., 2019).



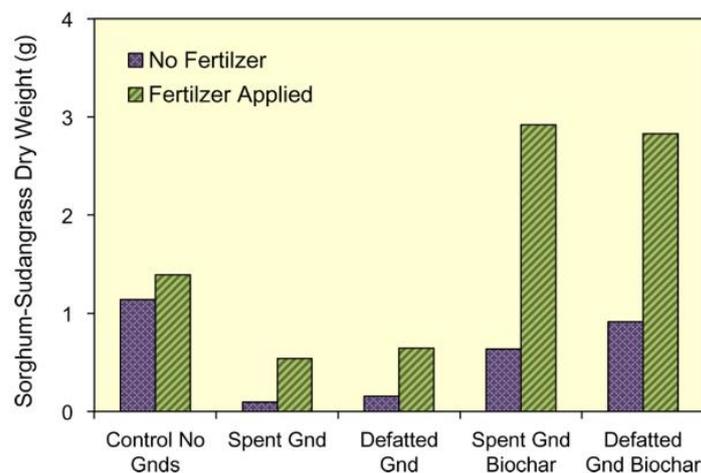
**Figura 16.** Fotos aéreas de lechugas cultivadas con distintas proporciones de SCG: 0% (A), 5% (B), 10% (C), 15% (D), 20% (E) (Turek et al., 2020).

Los SCG también limitan la germinación de semillas para la generación de plántones (Chysargyris et al., 2020), lo que es atribuido a las no adecuadas condiciones del sustrato (falta de porosidad cuando se añaden SCG). Por otro lado, los SCG redujeron la conductancia estomática de las plantas, lo que se encuentra relacionado con una estrategia para adaptarse a condiciones de estrés. Contrario a estos resultados, el grupo de Cruz reportó un aumento de la biomasa de las lechugas con concentraciones de 2.5 y 10% de SCG frescos, encontrando una inhibición con cantidades superiores (Cruz et al., 2012). En un estudio posterior (Cruz et al., 2015), dejaron a los SCG en barbecho durante 4 meses para plantar posteriormente las lechugas. En este caso, como en el anterior, los SCG incrementaron la biomasa de las lechugas hasta la cantidad de un 10%, disminuyendo el crecimiento con cantidades de 20 y 30% (**Figura 17**).



**Figura 17.** Lechugas cultivadas con distintas cantidades de SCG (Cruz et al., 2015).

Vardon et al. (2013) estudiaron qué efecto tenían distintas transformaciones (carbonización y desengrasado) de los SCG en el crecimiento del sorgo (**Figura 18**). Los SCG desengrasados tenían el mismo efecto inhibitorio que los SCG frescos, si bien cuando se adicionaba fertilizante el crecimiento aumentaba, aunque no superaba el crecimiento de la muestra control. Sin embargo, cuando los SCG tanto frescos como desengrasados se transformaron en biochar, sin fertilizante seguían limitando el crecimiento del sorgo, pero cuando se adicionó fertilizante nitrogenado, el peso seco del sorgo superó al peso seco de la muestra control con fertilizante.



**Figura 18.** Efecto de los SCG frescos, desengrasados y biochar, con o sin fertilizante sobre el crecimiento del sorgo (extraída de Vardon et al., 2013).

Otros autores investigaron la adición de cenizas junto los SCG comprobando que la combinación de ambos residuos inhibía aún más fuertemente el crecimiento de las plantas (Ribeiro et al., 2017). Los mismos resultados encontró el grupo de Ciesielczuk et al. (2017) al suplementar los SCG con cenizas, sulfato de magnesio y harina de sangre.

### ***Efectos sobre el contenido mineral y otros compuestos***

Recientemente se han realizado diferentes estudios sobre la reutilización de SCG como enmienda orgánica para mejorar la nutrición mineral de las plantas alimenticias (ya sean frescas, previamente compostadas o mediante compostaje directo sobre el suelo) (Chysargyris et al., 2020; Cruz et al., 2014, 2015). La adición de SCG frescos en los sustratos de cultivo disminuye el Mg, P, Ca, Na, Fe, Mn, Zn y Cu en la lechuga, lo que los autores atribuyen a la retención de minerales por la matriz del café a través de la presencia de sustancias potencialmente quelantes de metales o por la presencia de cafeína. Por el contrario, los SCG compostados en dosis bajas mejoraron las concentraciones de Mg, Mn, K y Na en la lechuga, debido a una mejor fitodisponibilidad de dichos elementos, así como a la degradación de la cafeína (Cruz et al., 2014b). Cuando estos autores compostaron SCG directamente en el suelo durante 4 meses, las lechugas cultivadas con 20% y 30% de SCG mostraron concentraciones más altas de elementos totales en comparación con las lechugas cultivadas con menos cantidad de SCG (Cruz et al., 2015). Otros investigadores también encontraron un aumento en el contenido de elementos (Fe, Zn y Mn) en el arroz integral, tras de la aplicación de SCG enriquecido con Fe y Zn (Morikawa y Saigusa, 2011). Chysargyris et al. (2020) utilizaron SCG frescos como sustrato de cultivo para semillas del género *Brassica* y observó cómo aumentaron los contenidos de N, P y K y disminuyeron los contenidos de Mg y Fe. Caliskan et al. (2020) en un estudio sobre el efecto de los SCG frescos sobre el crecimiento del pino, reportaron que conforme aumentaban las

cantidades de SCG adicionado, se incrementaban los contenidos de N, K, Mg y P en el pino, y disminuía la concentración de Ca y la relación C/N. Kasongo et al. (2013) también investigaron la adición de otros tipos de residuos de café (cáscara y pulpa de café) en la nutrición mineral de las plantas y encontraron que el uso de este tipo de desechos estimulaba la absorción de Ca, Mg, K, N y P, mientras disminuía la cantidad de Cu, Zn, Mn y Fe. Sin embargo, todos los autores citados anteriormente no utilizaron suelos agrícolas regulares, sino que agregaron SCG a suelos muy arenosos, contaminados o en sustratos en crecimiento, como la turba. Este es un aspecto que debe subrayarse ya que las características nutricionales de una planta dependerán de las propiedades químicas, físicas y fisicoquímicas del tipo de suelo o medio de cultivo empleado (Ceglie et al., 2015; Pinto et al., 2014).

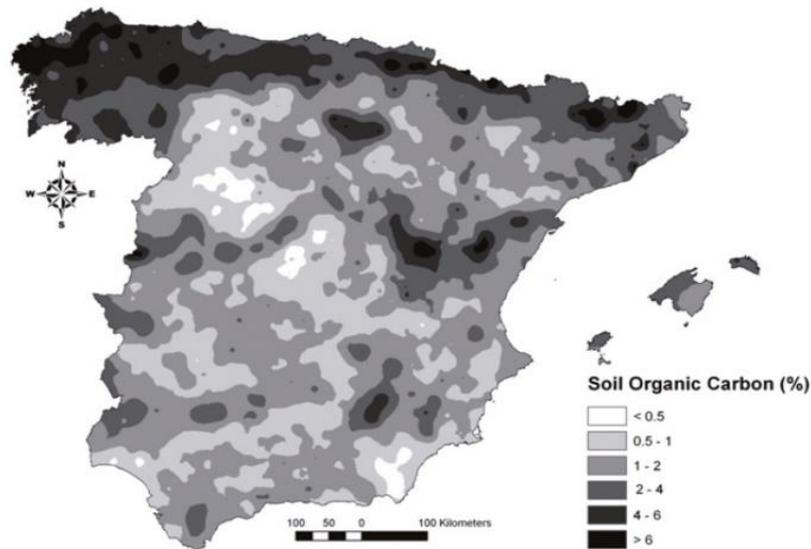
Los SCG no sólo se han utilizado para mejorar la nutrición mineral de los cultivos sino también para mejorar (en el caso de la lechuga) su contenido en carotenoides (Cruz et al., 2012) y compuestos activos, así como mejorar su capacidad antioxidante (Cruz et al., 2014a). Con la adición de SCG, la luteína y el  $\beta$ -caroteno aumentaron un 90 y un 72%, respectivamente y las clorofilas aumentaron hasta un 61%. El incremento de compuestos bioactivos se produjo con cantidades de hasta un 10% de SCG (Cruz et al., 2012). La actividad antioxidante de las lechugas aumentó linealmente con las cantidades de SCG frescos, aunque no sucedió lo mismo con las lechugas cultivadas con SCG compostados (Cruz et al., 2014b).

## **1.4. PERSPECTIVAS AGRO-AMBIENTALES**

### **1.4.1. Situación actual de los suelos agrícolas Mediterráneos**

Rodríguez-Martín et al. (2016) en su estudio “Assesment of the soil organic carbon stock in Spain”, encontraron que la mitad de las áreas españolas tenían un contenido en carbono orgánico inferior al 1%, asociándose con suelos

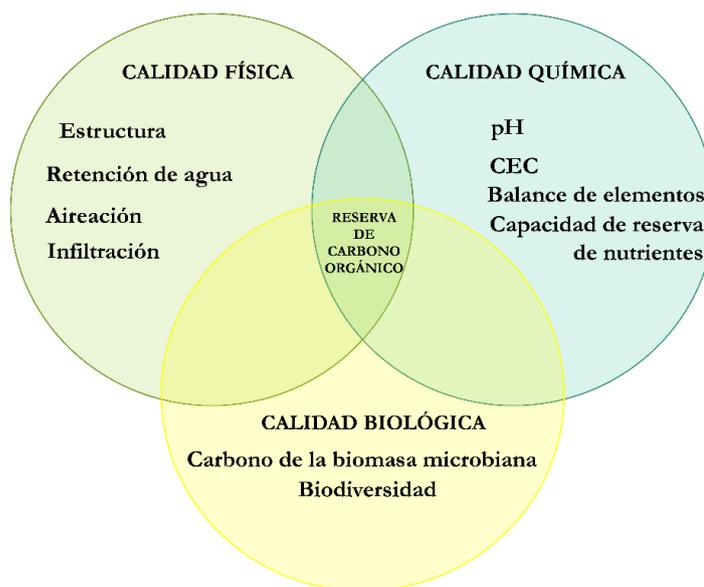
agrícolas Mediterráneos (**Figura 19**). Este hecho está en línea con la iniciativa “4 por mil” lanzada por la 21ª Conferencia de las Partes de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (COP21, 30 de noviembre al 11 de diciembre de 2015) con el fin de mejorar el contenido del carbono orgánico de los suelos en un 0.4% anualmente (Minasny et al., 2017).



**Figura 19.** Mapa del contenido de carbono orgánico en España (Rodríguez-Martín et al., 2016).

Para la producción de cultivos, el umbral crítico de concentración de carbono orgánico en la capa arable (primeros 20 cm) para la mayoría de los suelos es del 2% para las regiones templadas. Para mejorar la concentración de carbono orgánico en los suelos agrícolas es necesario mejorar la calidad del suelo a través de impactos beneficiosos en los siguientes procesos (**Figura 20**): incremento en la agregación del suelo y estabilidad de los agregados, mejoras en la porosidad total y macroporosidad, disminución de las pérdidas de agua del suelo a través del aumento de la tasa de infiltración de agua y reducción de la evaporación, mejora de la capacidad de agua disponible de la planta, reducción de la susceptibilidad a la formación de costras, compactación y erosión por agua y viento, aumento de la capacidad de intercambio catiónico y aniónico del suelo, aumento de las reservas de nutrientes de las plantas, aumento del C de la

biomasa microbiana junto con la actividad y las especies diversidad de la biota del suelo, aumento de la capacidad de oxidación del CH<sub>4</sub> y moderación de las tasas de nitrificación y desnitrificación, reducción de la lixiviación de los nutrientes vegetales solubles, y mejora en la producción agronómica, a través del aumento en la eficiencia de uso de la energía (fertilizantes, agua, pesticidas)(Lal, 2011).

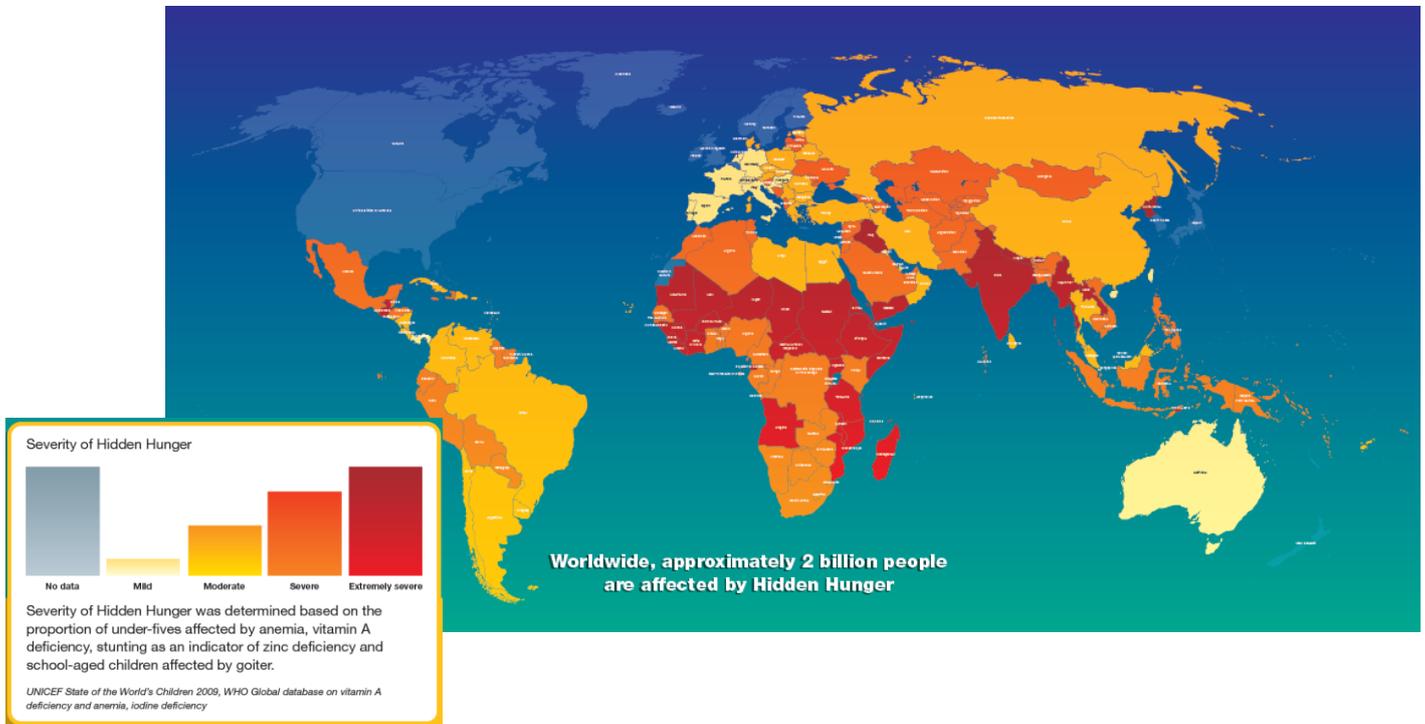


**Figura 20.** Mejoras de la calidad del suelo mediante el aumento de la reserva orgánica del suelo en suelos agrícolas (adaptada de Lal, 2011).

### 1.4.2. Biofortificación

El hambre oculta es una forma de desnutrición que tiene lugar cuando una dieta carece de micronutrientes como hierro, zinc, vitamina A, yodo (Kumar et al., 2019), que afecta a alrededor de 2 mil millones de personas en todo el mundo (von Grebner et al., 2014) (**Figura 21**). Específicamente, las deficiencias de Zn y Fe afectan a un tercio de la población mundial, particularmente en Asia y África, causando enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico y nervioso y afectando al desarrollo intelectual (Li et al., 2019). Este tipo de insuficiencias se generan por deficiencias de Fe y Zn en los suelos. Si bien la deficiencia de Zn en suelos es la más común (Alloway, 2008),

en general, el Fe es un elemento muy abundante en suelos a nivel mundial, clasificado entre macro y microelemento (Navarro y Navarro, 2013), aunque su disponibilidad es reducida en suelos alcalinos y calcáreos (Li et al., 2019).



**Figura 2.** Mapa global del hambre oculta (Sight and Life).

Se han descrito algunas soluciones para abordar el hambre oculta: diversificar las dietas, fortificar los alimentos comerciales, suplementación y biofortificación agronómica y genética (von Grebner et al., 2014). La biofortificación agronómica con quelatos y sales comerciales es una de las herramientas más utilizadas para abordar el hambre oculta generada por las deficiencias de Fe y Zn (Cakmak et al., 2018; Kozik et al., 2011; Mohammadi y Khoshgoftarmanesh, 2014). Sin embargo, la biofortificación agronómica con quelatos (DTPA, EDTA, EDDHA, etc.) y sales tiene algunas limitaciones: estas últimas son formas muy solubles que tienden a bloquearse en el suelo mediante diferentes mecanismos (Gregory et al., 2017) y los quelatos podrían tener efectos negativos en las plantas, como toxicidad y efectos secundarios, y alterar el equilibrio de nutrientes (Mohammadi y Khoshgoftarmanesh, 2014).

### 1.4.3. Uso de *Lactuca sativa* en ensayos *in vitro*

Un gran número de investigaciones con SCG se han llegado a cabo con lechugas como planta comestible. Es una planta utilizada frecuentemente para estudiar el efecto de enmiendas orgánicas en ensayos *in vitro* (Karapouloutidou and Gasparatos, 2019; Moreira et al., 2021; Yoo et al., 2021). Esto se encuentra relacionado con el hecho de que el consumo de lechugas es muy alto en todo el mundo y se ha incrementado en las últimas décadas (Heimler et al., 2012). El contenido de elementos en una lechuga es relevante desde el punto de vista de la nutrición humana ya que la lechuga contiene elementos esenciales para el cuerpo humano como K, Na, Mg, S y P, los cuales pueden estar involucrados en reacciones del organismo y actuar como cofactores de vitaminas y enzimas (Sofa et al., 2016). Además, en los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios sobre cómo compuestos presentes en la lechuga promueven la salud, como son los compuestos nutracéuticos (Heimler et al., 2012). Por otro lado, la lechuga ha sido objeto de estudio en ensayos de biofortificación agronómica y genética (Goto et al., 2000; Giordano, 2019; Kozik et al., 2011; Smolen et al., 2014; Carvalho et al., 2003) y también se ha utilizado para ver el efecto de diferentes tipos de fertilizantes (de Barros Sylvestre et al., 2019; Petek et al., 2020). En los últimos años también ha ganado en popularidad el consumo de lechugas *baby*, las cuales son especialmente ricas en vitamina C (Kim et al., 2016).



## **2. OBJETIVOS**



Previamente al planteamiento de los objetivos es necesario hacer un pequeño resumen de los aspectos de investigación más importantes relacionados con los SCG y plantear algunas hipótesis de trabajo.

Los SCG son un bio-residuo generado en grandes cantidades a nivel mundial, que se originan por la molturación de las semillas del café, previamente tostadas, con una posterior extracción de la bebida del café mediante un proceso hidrolítico a baja temperatura (100° C aprox.) y presión cercana a la atmosférica. Este origen de los SCG determina su composición, rica en proteínas, carbohidratos, polifenoles, grasas, etc., y sus posibles reutilizaciones. Por tanto, los SCG son un residuo mal gestionado si se destinan a los vertederos o se emplean directamente como combustible.

Teniendo en cuenta los altos contenidos en C que tienen los SCG, una de sus posibles reutilizaciones sería como enmienda orgánica de suelos. Este incremento en materia orgánica mejoraría las propiedades químicas (aumento de la capacidad de intercambio catiónico, incremento de macronutrientes, etc.), las propiedades físicas (aumento de la capacidad de retención de agua, estabilidad estructural, disminución de la densidad aparente), y las propiedades biológicas del suelo (aumento de la diversidad microbiana), es decir, mejoraría en su conjunto la fertilidad de los suelos. Con el empleo agronómico de los SCG, además de incrementar el carbono orgánico en los suelos agrícolas Mediterráneos mediante su fijación, se reducirían las emisiones de gases con efecto invernadero como el CO<sub>2</sub>.

El efecto de los SCG sobre la planta es controvertido en la bibliografía. Hay autores que indican que tiene un efecto fitotóxico atribuido bien a su composición bioquímica, o debido a su elevada relación C/N, a la competencia de los microorganismos por el N, dicho de otro modo, a la inmovilización microbiana del N. Sin embargo, otros investigadores reportan un estímulo al crecimiento vegetal y a la mejora de plantas comestibles. Se trata por tanto de

un tema que necesita de más investigación. Un aspecto interesante de esta cuestión es si la fitotoxicidad es un aspecto sólo cualitativo o si se puede abordar también desde un punto de vista cuantitativo. Es decir, si existe una dosis umbral de SCG a partir del cual se manifiestan los efectos fitotóxicos.

Dentro de los esquemas de economía circular, los SCG pueden generar productos de alto valor añadido (biocombustibles, azúcares, etc.) y nuevos residuos de segunda generación, cuyo uso también plantea problemas ambientales. La transformación mediante pirolisis es uno de estos procesos, que genera un nuevo residuo que se conoce como biochar. Hay mucha investigación sobre biochar derivados de residuos como madera, estiércol o residuos de cultivos, pero no hay mucha investigación sobre los biochares derivados de SCG. El carácter orgánico de los SCG garantiza un biochar con muchas posibilidades de empleo. La carbonización hidrotermal o hidrólisis a alta presión y temperatura es otro proceso empleado en la reutilización de biorresiduos y poco investigado en el caso de los SCG. La carbonización hidrotermal genera un residuo denominado hidrochar. Al igual que ocurre con los biochars, las posibilidades de los hidrochars derivados de los SCG, son interesantes desde varios puntos de vista. Además de estos procesos térmicos de transformación, hay otras posibilidades para modificar los bio-residuos y generar bio-productos reutilizables. Clásicamente se ha empleado el compostaje y en concreto el vermicompostaje, como una forma de transformación de los bio-residuos que favorece su empleo agronómico. No hay demasiada investigación con respecto al compostaje de los SCG. Otros procesos de modificación como el lavado con agua, disolventes orgánicos a distintas temperaturas o los desengrasados podrían ser también procesos interesantes desde el punto de vista de la reutilización de los SCG.

La composición de los SCG y los bio-productos derivados, rica en melanoidinas y compuestos polifenólicos plantea un posible uso de los mismos alternativo al de simple enmienda orgánica. Se ha demostrado en la bibliografía

que los citados compuestos tienen capacidad quelante y complejante, que podría ser utilizada para enriquecer plantas en elementos nutrientes, principalmente micronutrientes, y, simultáneamente, mejorar las reservas de estos elementos en el suelo. El enriquecimiento de plantas con micronutrientes a través del suelo, mediante abonos, se conoce como biofortificación. La biofortificación agronómica de plantas comestibles, permitiría corregir las patologías derivadas de la denominada “hambre oculta”. La capacidad movilizadora de los SCG y sus bio-productos derivados podría utilizarse para generar lo que hemos denominado en la presente tesis doctoral como *bioquelatos*.

Por todo ello, el **objetivo general** de la presente tesis doctoral consiste en el estudio desde diversos puntos de vista (químico, físico, biológico, etc), de la reutilización de los posos de café y de algunos de sus productos derivados, como enmienda orgánica de suelos y como posibles movilizadores de nutrientes. Se pretende analizar los efectos sobre el suelo, los cultivos y el medio ambiente.

Teniendo en cuenta el objetivo general planteado y la hipótesis de partida, los **objetivos específicos** que desarrollará esta tesis doctoral son:

1. Evaluar el efecto de la adición de SCG frescos sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas de suelos agrícolas Mediterráneos.
2. Evaluar los efectos a corto plazo de la adición de SCG frescos como enmienda orgánica sobre las propiedades físicas del suelo y estudiar cómo influyen en estas propiedades dosis secuenciales de SCG.
3. Evaluar los efectos de la adición de SCG frescos sobre la materia orgánica del suelo y los grupos microbianos principales.
4. Evaluar los efectos de la adición de SCG frescos sobre la hidrofobicidad del suelo, y en particular sobre los componentes de la energía superficial.

5. Evaluar los efectos de la adición de SCG frescos sobre algunos aspectos de la calidad del suelo.
6. Evaluar la influencia de la adición de cantidades crecientes de SCG sobre las concentraciones de elementos esenciales y tóxicos en lechugas cultivadas.
7. Seleccionar las combinaciones más apropiadas de diferentes dosis de SCG y diferentes dosis de fertilizante N para establecer si las limitaciones al cultivo se relacionan exclusivamente con la toxicidad de algunos de sus compuestos o pueden corregirse con la adición de N.
8. Seleccionar el tratamiento de los SCG (vermicompostaje, compostaje, carbonización, hidrólisis, lavado...) más apropiado, que genere un bio-producto que por un lado, supere la fitotoxicidad generada por los SCG y por el otro, aproveche la capacidad quelante de los SCG.
9. Evaluar el impacto de la adición de SCG y bio-residuos derivados de los SCG sobre la dinámica del C y N, calidad y funcionalidad del suelo.
10. Determinar el efecto de bioquelatos derivados de los SCG y de las melanoidinas de café sobre la biofortificación agronómica en Fe y Zn de lechugas y comparar su efecto con quelatos comerciales.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1. MATERIALES

#### 3.1.1. Suelos

Para el desarrollo de la presente tesis doctoral se muestrearon dos suelos agrícolas Mediterráneos (de los primeros 20 cm del suelo, lo que se denomina “capa arable”) representativos de la provincia de Granada. Un suelo llamado “suelo de Vega” tomado en la Vega de Granada, en las inmediaciones del pueblo de Pinos Puente ( $37^{\circ} 14'7.1''N$ ,  $3^{\circ}45'40.7''W$ ), y otro llamado “suelo Rojo” tomado de las inmediaciones del pueblo granadino de El Padul ( $36^{\circ} 59'2.8''N$ ,  $3^{\circ} 36'54.3''W$ ) (**Figura 22**).



**Figura 22.** Ubicación en el mapa geográfico de la localización de ambos suelos.  
Fotos aéreas de cada uno de los suelos procedentes de Google Maps.

El suelo de Vega se clasifica como un *Cambic Calcisol* (Aric, Ochric) (IUSS Working Group WRB, 2015), gris pardusco (Munsell 10YR 5.5 / 2), utilizado normalmente para cultivar maíz, alfalfa y cultivos hortícolas bajo riego (**Figura 23**). El suelo Rojo se clasifica como un *Chromic Calcic Luvisol* (Cutanic, Differentic, Hypereutric, Ochric) (IUSS Working Group WRB, 2015), rojo (Munsell 2.5YR 4/6) es utilizado para cultivos de cereales en condiciones de secano (**Figura 23**).



**Figura 23.** Fotografías del suelo de Vega (izquierda) y suelo Rojo (derecha) en el momento del muestreo.

En la **Tabla 3** se muestran las principales características de los suelos ensayados. Los suelos se diferenciaron entre sí principalmente en su contenido de carbonato cálcico equivalente ( $\text{CaCO}_3$  eq.) (mayor en el suelo de la Vega que en el suelo Rojo), lo que se relaciona con sus propiedades mineralógicas, es decir, mayor contenido de calcita y dolomita en el suelo de Vega heredado de su material geológico. Según los datos de la granulometría, ambos suelos tienen una clase textural arcillosa, aunque las partículas finas (limo + arcilla) del suelo de Vega representaron el 87.9% de la tierra fina ( $<2$  mm) mientras que en el caso del suelo Rojo el porcentaje fue del 61%. Como consecuencia de esta diferencia granulométrica, junto con la cantidad ligeramente mayor de carbono orgánico (CO) en el suelo de Vega, la capacidad de intercambio catiónico (CIC), la capacidad de retención de agua a  $-33$  kPa ( $W_{33}$ ) y  $-1500$  kPa ( $W_{1500}$ ) y el contenido de agua utilizable por las plantas (AU) fue mayor en el suelo de Vega que en el suelo Rojo, mientras que lo contrario fue observado para la densidad aparente (DA). En cuanto a la mineralogía (**Tabla 3**), la tierra fina del suelo de Vega es rica en filosilicatos y carbonatos (calcita y dolomita), mientras que el suelo Rojo estuvo compuesto por un mayor contenido de filosilicatos (principalmente illita y caolinita), cuarzo y óxidos de hierro y los carbonatos presentes estaban en cantidades inferiores al 1%. El suelo de Vega contiene una mayor cantidad de esmectitas (arcillas hinchables) en la fracción

**Tabla 3.** Propiedades químicas, fisicoquímicas y mineralógicas del suelo de Vega y suelo Rojo.

Propiedades químicas y fisicoquímicas																	
Muestra	Color seco (Munsell)	FG (%)	Arcilla (%)	Limo (%)	pH	CE <sub>25</sub> (dS m <sup>-1</sup> )	CO (%)	N (%)	C/N	CO <sub>3</sub> Ca eq. (%)	DA (g cm <sup>-3</sup> )	W <sub>33</sub> (%)	W <sub>1500</sub> (%)	AU (mm cm <sup>-1</sup> )			
Suelo Vega	10YR 5.5/2	2.0	58.0	29.9	8.2	1.3	1.36	0.11	13	39.0	1.20	26.4	15.6	1.30			
Suelo Rojo	2.5YR 4/6	6.0	43.2	18.0	7.2	0.6	1.16	0.11	10	1.6	1.27	20.0	11.7	1.05			
Propiedades mineralógicas (%)																	
Tierra fina (< 2mm)							Arcilla (< 2 μm)										
	Phy	Qz	Fd	Iron ox	Cal	Dol	Ill	Pa	Sm	Int 1-1.4 nm	Phy >1.4 nm	Ka	Qz	Fd	Iron ox	Cal	Dol
Suelo Vega	47	11	<1	<1	34	8	29	3	17	12	6	3	12	2		14	2
Suelo Rojo	63	33	2	2	<1	<1	33	2	3	5	27	11	13	1	5	<1	<1

Phy, filosilicatos; Qz, cuarzo; Fd, feldespatos; Iron ox, óxidos de hierro ( goetita y hematites); Cal, calcita; dol, dolomita; Ill, illita; Pa, paragonita; Sm, esmectitas; Int 1-1.4 nm, filosilicatos interestratificados con d<sub>001</sub> entre 1 y 1.4 nm; Phy >1.4 nm, filosilicatos con d<sub>001</sub> >1.4 nm; Ka, caolinita; FG, fragmentos gruesos (suelo total); CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C; CO, carbono orgánico; N, nitrógeno total; CO<sub>3</sub>Ca eq., carbonato cálcico equivalente; DA, densidad aparente; W<sub>33</sub> and W<sub>1500</sub>, retención de agua a -33 and -1500 kPa, respectivamente; AU, agua utilizable por las plantas; nd, no detectado.

de arcilla. El suelo Rojo contiene más filosilicatos con  $d_{001} > 1.4$  nm (como clorita) y de caolinita en la fracción de arcilla, lo que es indicativo de una mayor edad y más evolución mineralógica (Martín-García et al. 1999). El contenido de arcilla y la mineralogía pueden ser importantes en las interacciones entre la materia orgánica y la fracción mineral (Baldock y Skjemstad 2000; Six et al. 2002; Rakhsh et al. 2017).

### 3.1.2. Posos de café y bio-productos derivados

#### *Posos de café*

En la presente tesis doctoral se utilizaron dos tipologías distintas de SCG. Los primeros se obtuvieron moliendo 50 g de granos de café (PREMIUM TUESTE NATURAL, Cumbal, 100% Arábica) y mezclándolos con 1 L de agua destilada hirviendo, seguido de filtración y secado al aire. El molido de los granos de café se hizo hasta obtener un tamaño homogéneo de 1 mm. El proceso de obtención de los SCG se llevó a cabo en una cafetera tipo melita (**Figura 24**).



**Figura 3.** Procedimiento de obtención de los SCG.

La segunda tanda de SCG se recogió de la cafetería de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. No se distinguieron entre tipologías de SCG (marcas, cafeína...). Posteriormente se extendieron y se secaron al aire.

En la **Tabla 4** podemos observar las diferentes características de los dos tipos de SCG elaborados para la consecución de esta tesis doctoral. Ambos SCG se caracterizan por tener un pH ácido, alta conductividad eléctrica medida a 25 °C ( $CE_{25}$ ) y ausencia de  $CaCO_3$  eq. La principal diferencia entre ambos se encuentra en el contenido de CO y N. Los SCG hechos *ex professo* presentaban mayor cantidad de CO y menor cantidad de N, al contrario de los SCG recogidos en la cafetería de la Facultad de Farmacia. Por ello, los SCG correspondientes a la primera tanda tienen una relación C/N de 32 y los de la segunda tanda una C/N de 21.

Con respecto a otras propiedades como CIC y determinadas propiedades físicas, sólo fueron analizadas en los SCG de la primera tanda, quedando reflejadas en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Principales propiedades fisicoquímicas de los SCG empleados en los distintos ensayos de la tesis doctoral.

	SCG <sub>1</sub>	SCG <sub>2</sub>
pH	5.76	5.82
$CE_{25}$ (dS m <sup>-1</sup> )	4.5	5.7
CO (%)	59.38	46.02
N (%)	1.87	2.24
C/N	32	21
$CaCO_3$ eq. (%)	nd	nd
CIC (cmol <sub>+</sub> kg <sup>-1</sup> )	58.28	-
DA (g cm <sup>-3</sup> )	0.49	-
$W_{33}$ (%)	118.3	-
$W_{1500}$ (%)	110.4	-
AU (mm cm <sup>-1</sup> )	0.39	-

$CE_{25}$ , conductividad eléctrica medida a 25°C;  $CaCO_3$  eq., carbonato cálcico equivalente; CIC, capacidad de intercambio catiónico; DA, densidad aparente;  $W_{33}$ , retención de agua a -33kPa;  $W_{1500}$ , retención de agua a -1500kPa; AU, agua utilizable por las plantas; nd: no detectado.

### ***SCG desengrasados***

El desgrasado de los SCG se realizó mediante la extracción de lípidos durante 3 h en un aparato Soxhlet con hexano (Vardon et al., 2013).

### ***Biochar de SCG y biochar de SCG desengrasados***

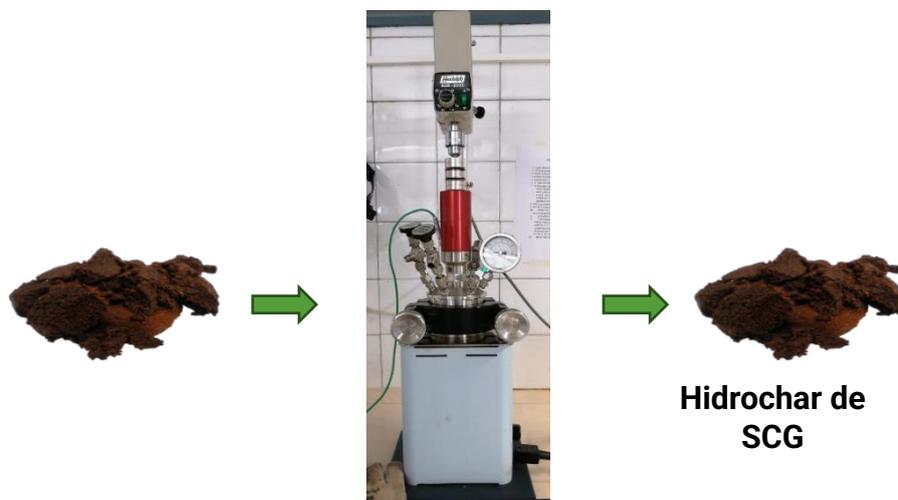
Se realizaron dos tipos de biochar de SCG y SCG desengrasados mediante pirolisis en un horno pirolítico (Navertherm GmbH, Alemania): 270 °C durante 60 min (modificado de Comino et al., 2017) y 400 °C durante 30 min (Kim et al., 2014) (**Figura 25**).



**Figura 25.** Procedimiento para la obtención de biochar de SCG.

### ***Hidrochar de SCG***

Los SCG se sometieron a un proceso de carbonización hidrotermal. Los SCG se mezclaron con agua en una proporción del 10% (p/p) en un reactor (270 ml de agua destilada y 30 g de café molido) aplicando 160, 180 y 200°C durante 60 min (**Figura 26**).



**Figura 4.** Procedimiento para la obtención de hidrochar de SCG.

### ***Compost y vermicompost de SCG***

Los diferentes compost derivados de SCG fueron suministrados por la empresa de fertilizantes naturales orgánicos AGROHULOVA S.L (Granada, España). El tratamiento de vermicompostaje de los SCG se realizó durante 8 meses con lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). El compostaje convencional de los SCG con dolomita se realizó durante 8 meses utilizando las proporciones de 28.72 kg de SCG y 8.5 kg de dolomita [CaMg (CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] para neutralizar el pH ácido de los SCG.

### ***SCG lavados con agua y etanol***

Los SCG lavados con etanol o agua desionizada caliente se realizaron en un embudo de percolación hasta la decoloración del percolado.

### ***Bioquelatos de SCG y melanoidinas***

En la presente tesis doctoral se emplearon dos tipos de bioquelatos: bioquelato de SCG y bioquelato de melanoidinas.

En primer lugar, se aislaron las melanoidinas adaptando el método descrito por Rufián-Henares y de la Cueva (2009), a partir de una infusión de café filtrada producida a partir de café tostado comercialmente (100% Arábica) suministrado por un productor nacional. La preparación de café se realizó a altas presiones y con la siguiente proporción: 62.5 g por 1000 ml de agua. Esta infusión se sometió a una concentración, filtración, dos diafiltraciones con agua desionizada (lavados del concentrado) y una concentración final del producto. La filtración se llevó a cabo con una unidad de filtración PilotUnitMulti MF/UF/NF/RO M39/M3.8 (Alfa Laval, Nakskov, Dinamarca). Posteriormente, el producto concentrado final se sometió a un proceso de secado por pulverización en un secador por pulverización modelo 4M8-TriX (ProCepT, Zelzate, Bélgica). El proceso se llevó a cabo a una temperatura de

entrada de 200 °C y una presión de atomización de la boquilla de 2 bar. Las condiciones fueron optimizadas previamente.

Posteriormente, se funcionalizaron las melanoidinas con Fe y Zn. Para este propósito, se emplearon los siguientes reactivos: sulfato de hierro (II) heptahidratado  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (MW 278.01) y sulfato de zinc heptahidratado  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (MW 287.56). En cada caso, se usaron 1.5 g del reactivo, 30 g de melanoidinas y 300 ml de agua destilada. Cada mezcla se preparó y se mantuvo bajo agitación durante 2 h, se dejó reposar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 24 h hasta alcanzar el estado estable. Cada mezcla se ultrafiltró utilizando el modelo de celda de ultrafiltración Amicon 8400 (Amicon, Beverly, MA), con una membrana de corte de masa molecular de 5000 Da. El producto retenido se lavó con 150 ml de agua destilada. Este procedimiento de lavado (diafiltración) se repitió al menos tres veces. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas y almacenadas. Los SCG también se funcionalizaron con Fe y Zn como las melanoidinas. Se probaron diferentes concentraciones de metal para evaluar la capacidad de absorción de los SCG. La cantidad final escogida fue de 9 g de reactivo, 50 g de SCG y 500 ml de agua destilada. Cada mezcla se preparó y se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 24 h. Cada muestra de mezcla se decantó y se centrifugó. El sólido obtenido se lavó con 250 ml de agua destilada, se decantó y se centrifugó. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces. Finalmente, las muestras se dejaron en la estufa a 50 °C durante un día para eliminar el contenido de agua.

### **3.1.3. Planta alimenticia *Lactuca sativa***

La lechuga fue la planta alimenticia escogida para la realización de todos los ensayos. Específicamente se utilizó *Lactuca sativa* var. *longifolia* variedad Little Gem Diente. Tienen un ciclo de crecimiento relativamente corto (máximo 60

días) y su pequeño tamaño facilita su manejo en cámaras climáticas. Son lechugas de hoja alargada y forman un cogollo compacto de unos 10-15 cm de altura y 8-10 cm de diámetro. Normalmente son de color verde medio y tienen un peso entre 125 y 190 g (**Figura 27**).



**Figura 27.** Lechuga *Lactuca sativa* var. *longifolia* utilizada en los ensayos.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Diseños experimentales y esquemas metodológicos

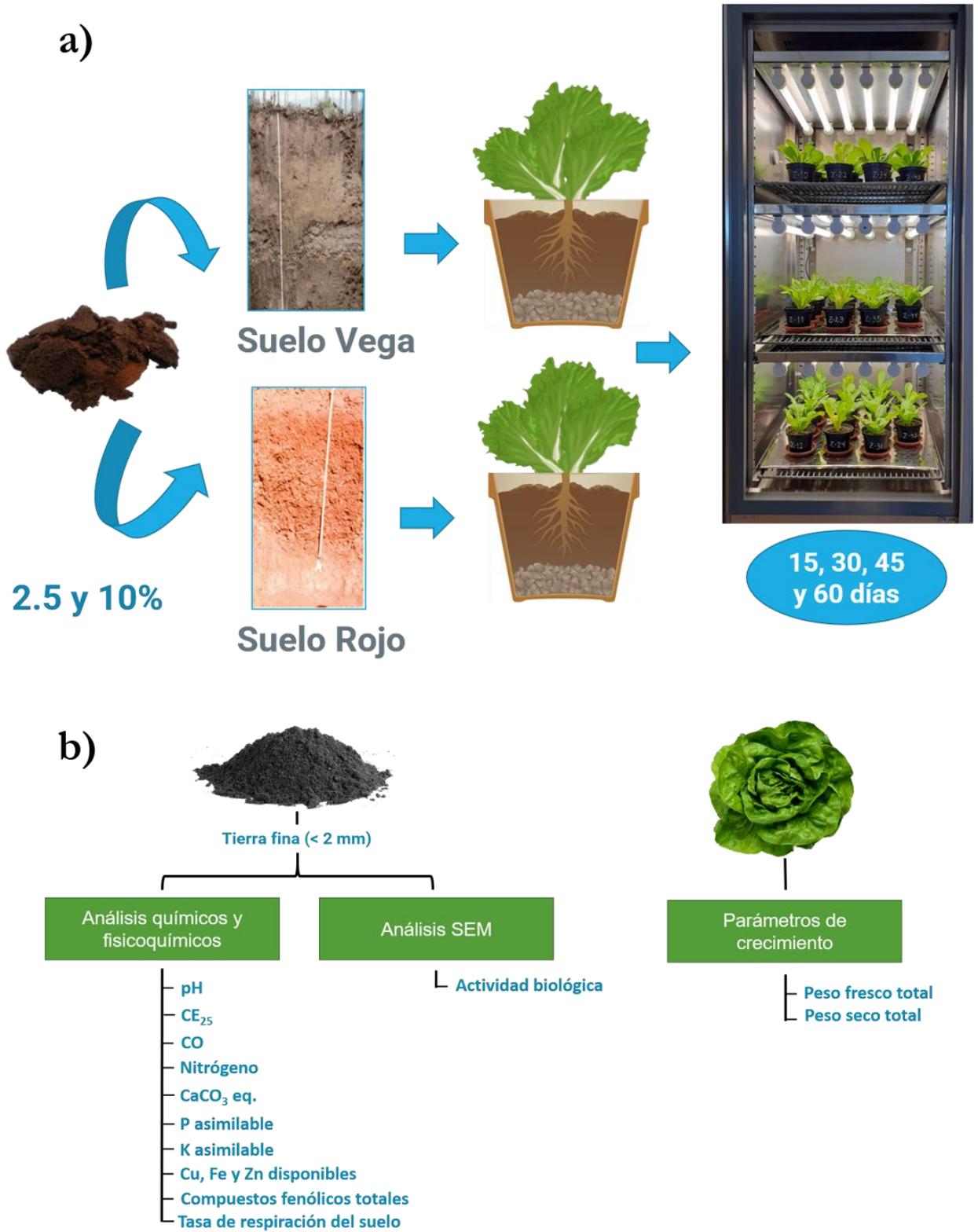
Este apartado se estructurará atendiendo a los distintos ensayos realizados para la consecución de los objetivos planteados. Se planificaron un total de nueve ensayos. La descripción de los métodos para cada ensayo se realiza, en primer lugar, mediante una figura de *diseño experimental* donde se especifica el número de repeticiones, los suelos empleados, las dosis, los tiempos de muestreo, etc. En segundo lugar, con una figura de *esquema metodológico* en la que resumen en cada una de las muestras obtenidas la analítica realizada.

### ***Ensayo 1 (efectos sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo y crecimiento de las plantas)***

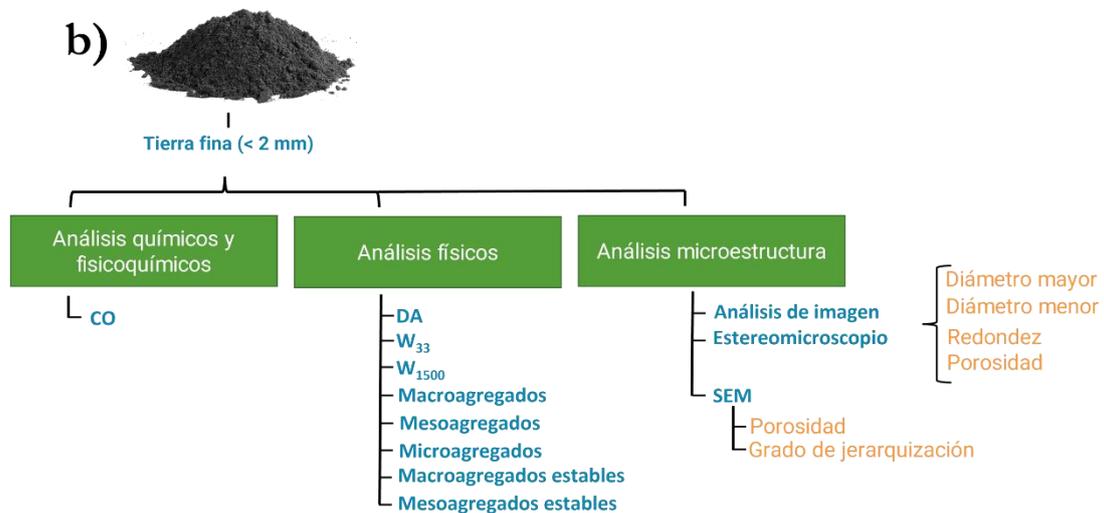
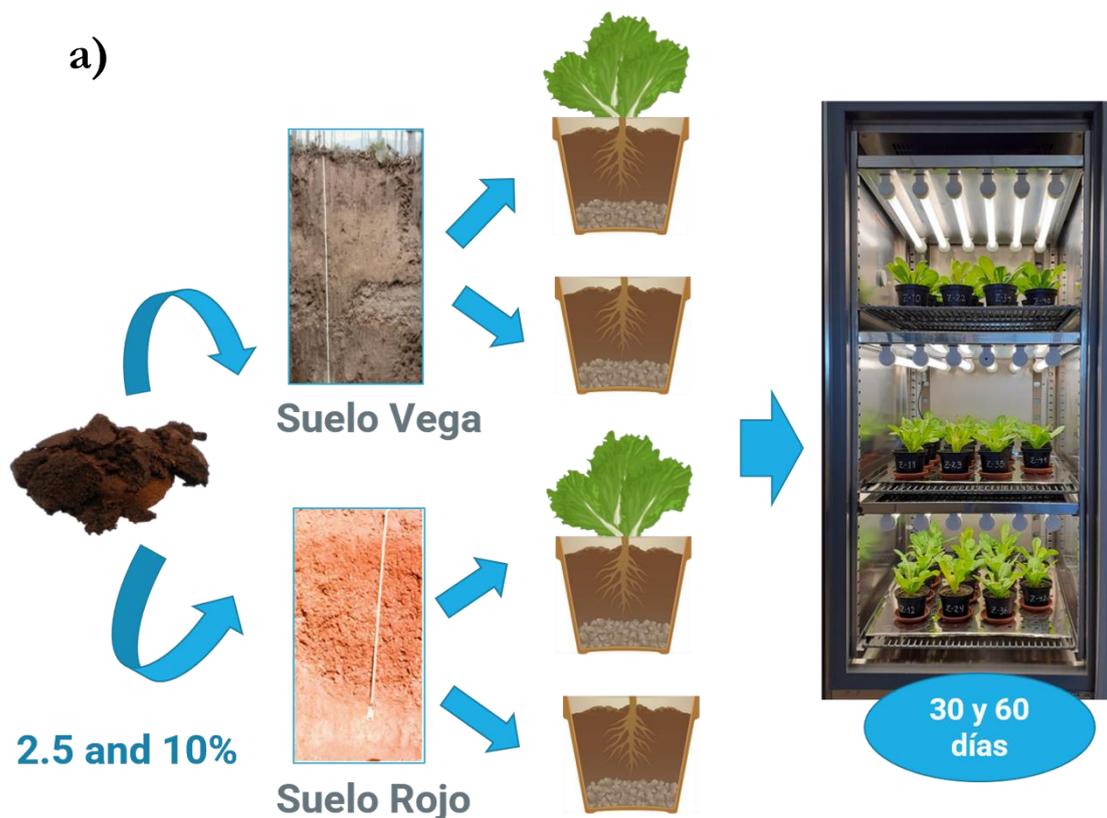
El diseño experimental correspondiente al ensayo 1 se recoge en la **Figura 28a**. El **ensayo 1** se realizó con tres réplicas, dos suelos diferentes (suelo de Vega y Rojo), dos dosis de SCG (2.5 y 10% p:p) cuatro tiempos de cultivo (15, 30, 45 y 60 días) y muestras control (0 días y 0% SCG). Se obtuvieron un total de 72 muestras. Los tipos de análisis realizados sobre las muestras finales del ensayo se recogen en la **Figura 28b**, correspondiente al esquema metodológico. Se analizaron propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo y se mostró la actividad biológica del suelo mediante imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM). En cuanto a la planta, se analizaron parámetros de crecimiento.

### ***Ensayo 2 (efectos sobre las propiedades físicas del suelo)***

El **ensayo 2** se realizó con tres repeticiones, dos suelos (suelo de Vega y suelo Rojo), dos dosis de SCG (2.5 y 10% p:p), dos tiempos de incubación (30 y 60 días) y dos modalidades de ensayo: con cultivo y sin cultivo (**Figura 29a**). Se obtuvieron un total de 72 muestras. Se usaron muestras control: 0 días y 0% SCG. En los microcosmos resultantes de la incubación, se analizaron principalmente propiedades físicas del suelo (**Figura 29b**). Se realizó, además, un análisis morfológico de la estructura del suelo mediante SEM y estereomicroscopio.



**Figura 28.** a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 1. CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C; CaCO<sub>3</sub> eq., carbonato cálcico equivalente.



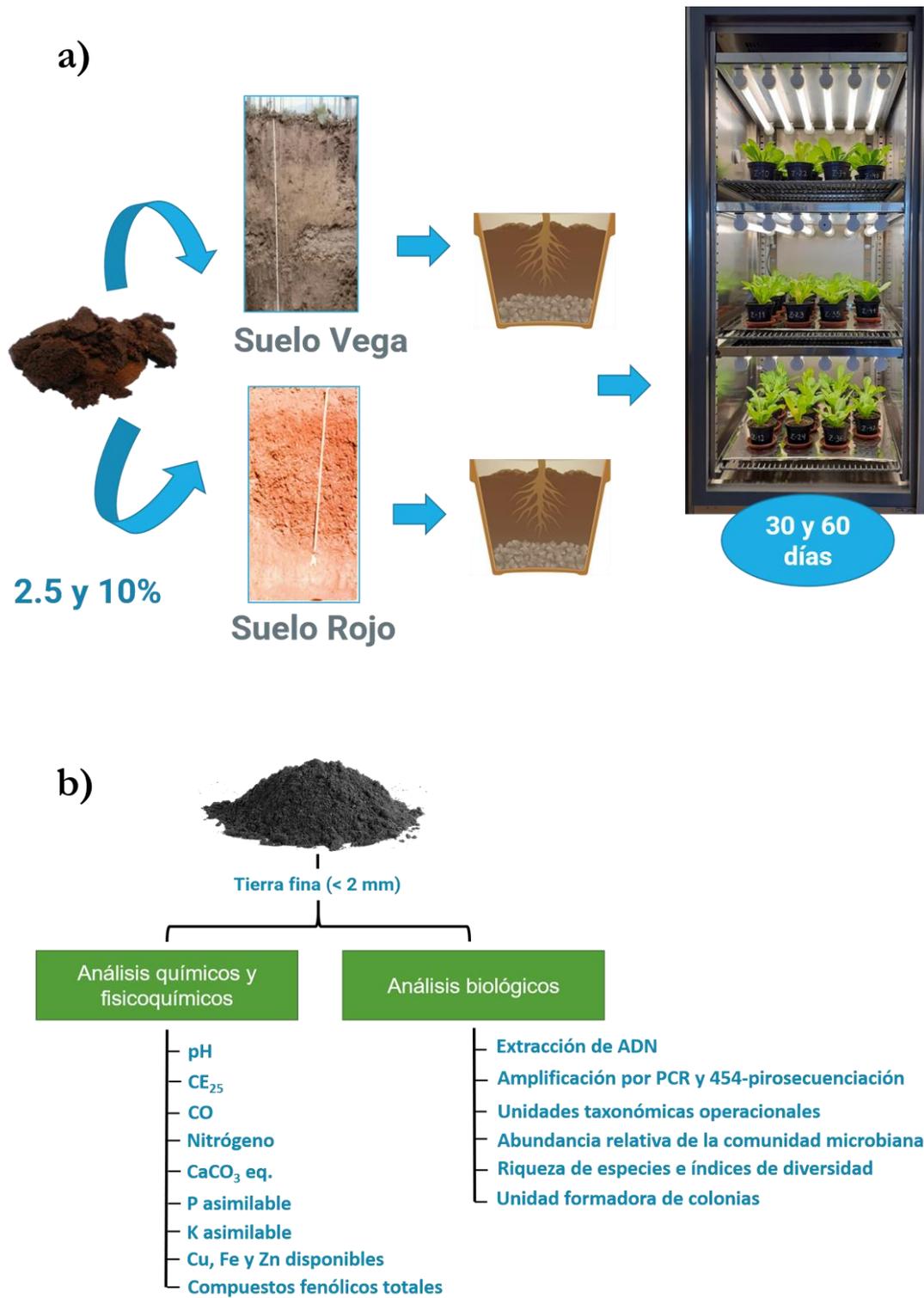
**Figura 29.** a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 2. CO, carbono orgánico; DA, densidad aparente;  $W_{33}$ , retención de agua a -33kPa;  $W_{1500}$ , retención de agua a -1500kPa; SEM, microscopía electrónica de barrido.

### ***Ensayo 3 (efectos sobre la microbiología del suelo)***

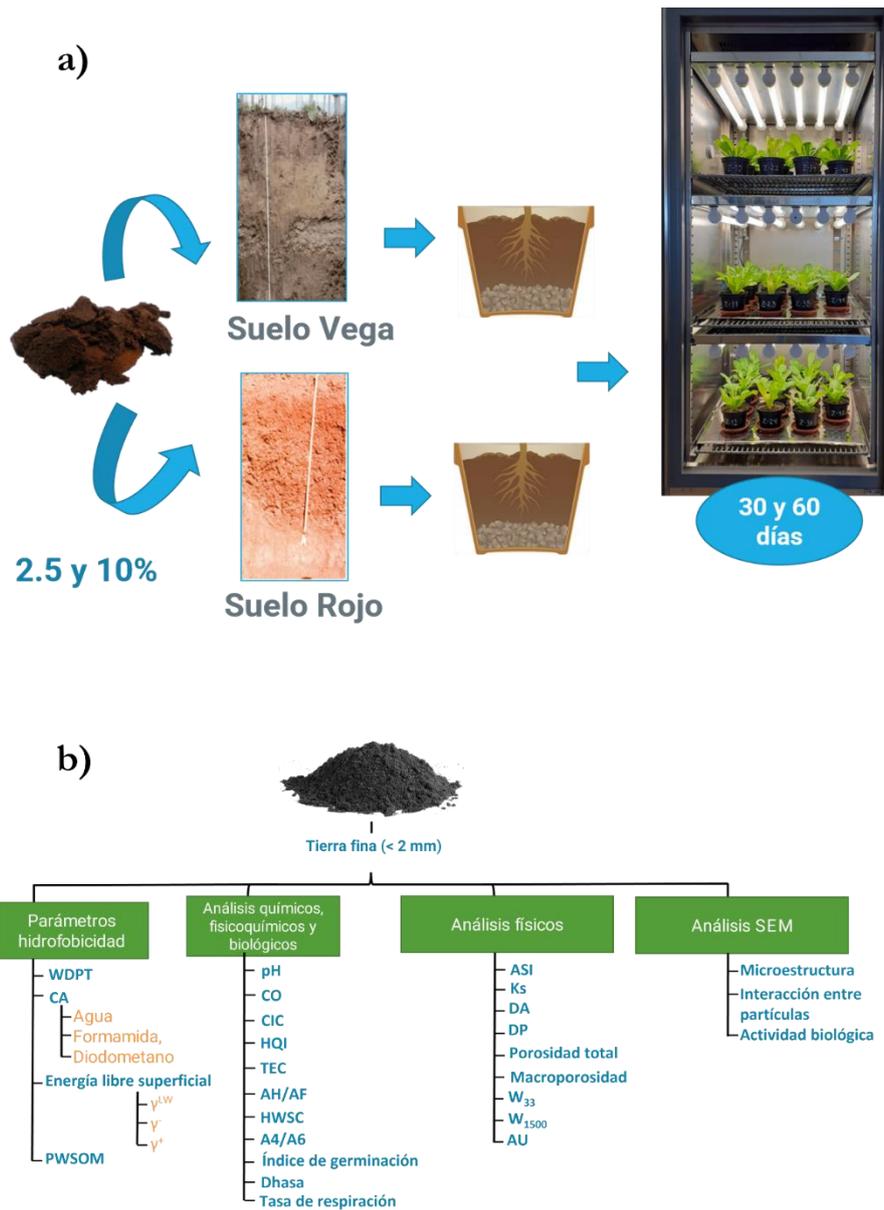
Para la realización del **ensayo 3 (Figura 30a)**, se eligieron dos dosis diferentes de SCG (2.5 y 10% p:p) y tres puntos de tiempo (0, 30 y 60 días), así como un control (0 SCG%, 0 días). Se obtuvieron un total de 36 muestras, que incluyeron muestreo a los 30 y 60 días, y tres réplicas para cada condición. También se tomaron muestras en el momento 0, las cuales sirvieron como control inicial. Al igual que en el ensayo 1, se realizó un análisis químico y fisicoquímicos de los microcosmos incubados (**Figura 30b**). Además, se analizó en profundidad la biología del suelo.

### ***Ensayo 4 (efectos sobre la hidrofobicidad y materia orgánica del suelo. Relación con la calidad del suelo)***

En el **ensayo 4** se obtuvieron un total de 90 muestras. 72 muestras correspondientes a dos tipos de suelo (Rojo y Vega), tres dosis de SCG (0, 2.5 y 10%), dos tiempos de incubación (30 y 60 días) y seis repeticiones (**Figura 31a**). 18 muestras correspondientes a las muestras de control inicial (tiempo 0): dos tipos de suelo, tres dosis de SCG y tres repeticiones. En este ensayo, se analizaron parámetros de hidrofobicidad y se realizó un fraccionamiento de la materia orgánica del suelo (**Figura 31b**). Además, la analítica se completó con análisis físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos. Por último, se realizó un análisis SEM para apoyar las anteriores analíticas.



**Figura 30.** a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 3. CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C; CaCO<sub>3</sub> eq., carbonato cálcico equivalente.



**Figura 31.** a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 4. WDPT, tiempo de penetración de la gota de agua; CA, ángulo de contacto; PWSOM, humectabilidad potencial de la materia orgánica del suelo; CO, carbono orgánico; CIC, capacidad de intercambio catiónico; HQI, índice de calidad del humus; TEC, carbono extraíble total; AH, ácidos húmicos; AF, ácidos fúlvicos; HWSC, carbono soluble en agua caliente; Dhasa, actividad deshidrogenasa; ASI, índice de estabilidad estructural; Ks, conductividad hidráulica; DA, densidad aparente; DP, densidad de partículas;  $W_{33}$ , retención de agua a -1500kPa;  $W_{1500}$ , retención de agua a -1500kPa; AU, agua utilizable por las plantas.

### ***Ensayo 5 (efectos de las dosis crecientes de SCG sobre el sistema suelo-planta)***

El **ensayo 5** se realizó con tres repeticiones y ocho dosis de SCG (1, 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15%) (**Figura 32a**). Además, se utilizaron tres muestras de control de 0% de dosis de SCG. Para comparar con la fertilización convencional, se utilizaron tres microcosmos sin SCG, pero enriquecidos con un fertilizante triple 15 (15% de N como N, 15% de P como P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 15% de K como K<sub>2</sub>O); la concentración adicionada al suelo fue de 1.75 g/kg. Se incluyó un grupo final que constó de tres muestras de lechugas *baby* para comparar el efecto de los SCG en el estado inicial de las lechugas. En este ensayo se realizó un estudio profundo de los elementos minerales esenciales y tóxicos de la planta (**Figura 32b**). Se determinó el pH del suelo, debido a la importancia de esta propiedad en la movilidad de los nutrientes en el suelo.

### ***Ensayo 6 (efectos combinados de la adición de SCG con fertilizantes nitrogenados sobre el sistema suelo-planta)***

En el **ensayo 6** se utilizaron SCG en una concentración de 1, 7.5 y 15% (**Figura 33a**). Se ensayaron además tres dosis de N: alta (3480 kg/ha), media (600 kg/ha) y baja (120 kg/ha). La fertilización nitrogenada se realizó con NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>. En las lechugas muestreadas, se realizó un estudio de los principales macroelementos en planta (Ca, K, N, K, Mg, ...) y microelementos (Cu y Zn) (**Figura 33b**). Se analizó también el peso fresco y seco de la planta. Con respecto al suelo, se analizaron nutrientes asimilables como el N, P y K.

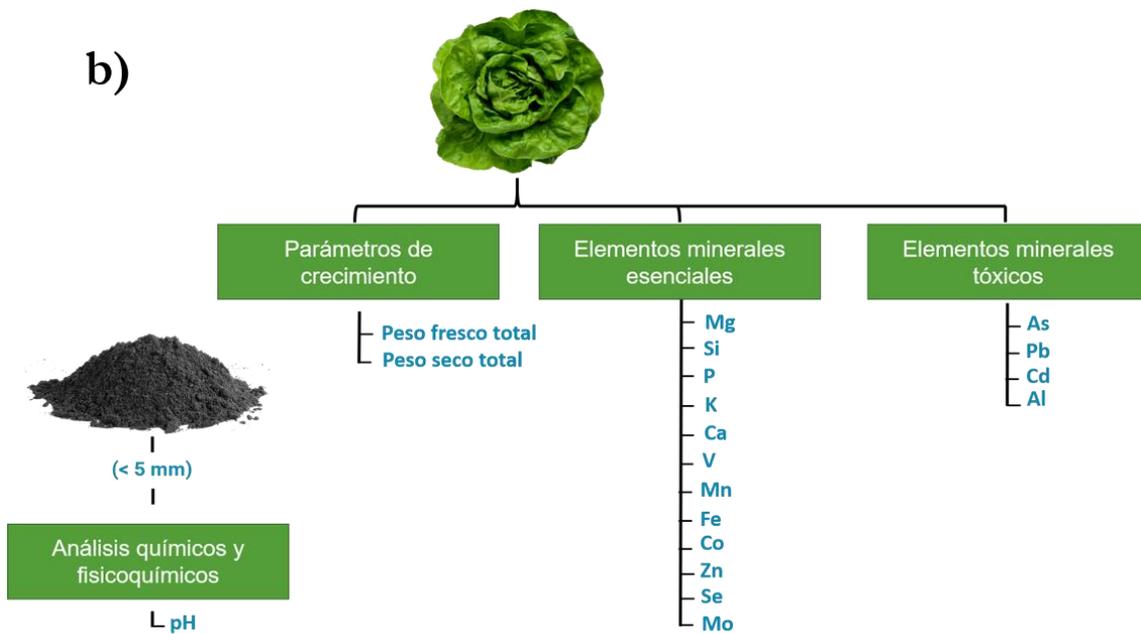
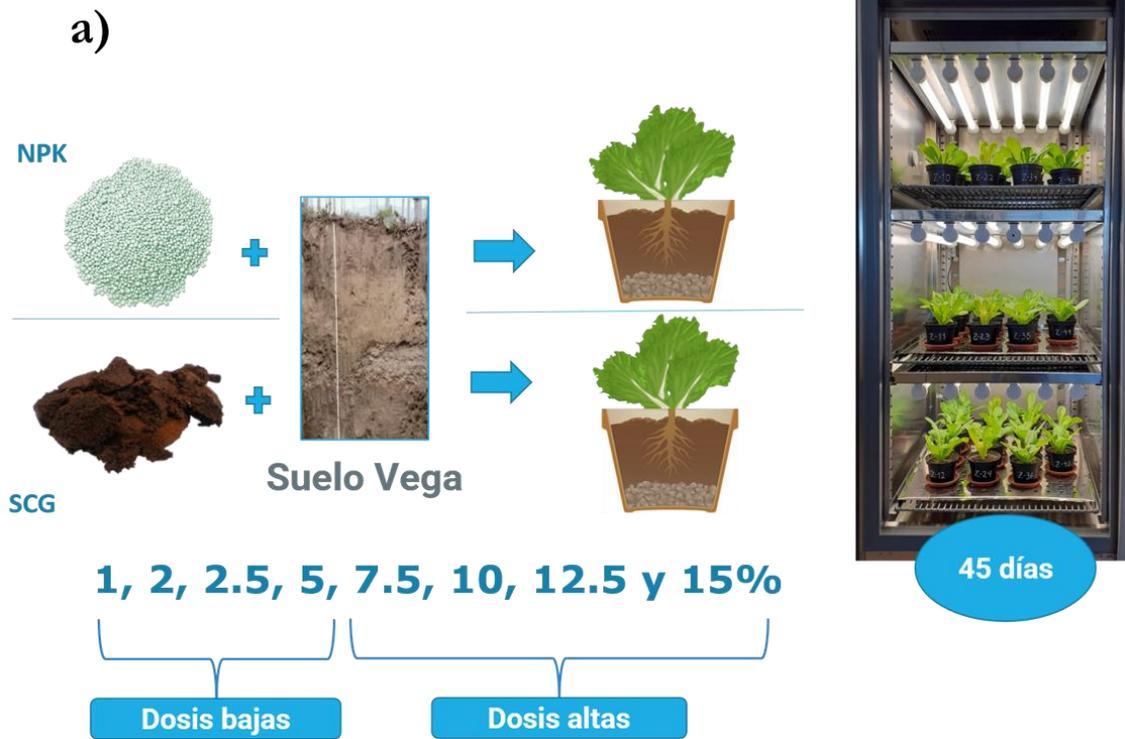


Figura 32. a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 5

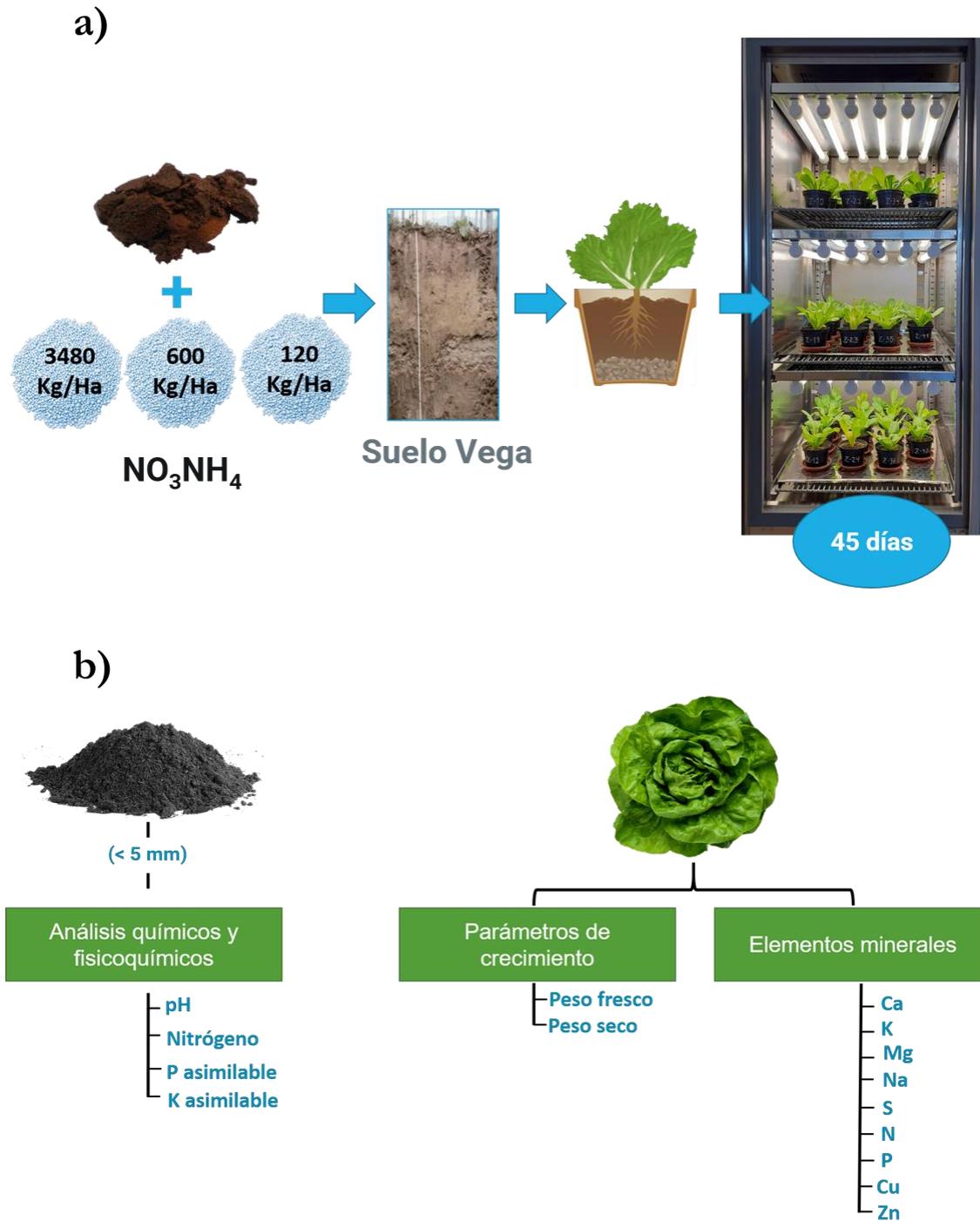


Figura 33. a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 6

***Ensayo 7 (efectos sobre el sistema suelo-planta de SCG transformados mediante compostaje, vermicompostaje, carbonización, lavado, hidrólisis e incubación en suelo)***

El diseño experimental correspondiente al **ensayo 7** se muestra en la **Figura 34a**. El ensayo se realizó por triplicado. Se utilizaron cinco controles y ocho bio-enmiendas derivadas de los SCG. Como controles se incluyó el suelo adicionado con SCG frescos, el suelo sin bio-enmienda, el suelo sin bio-enmienda previamente incubado durante 40 días, el suelo adicionado con fertilizante NPK y el suelo adicionado con vermicompost de estiércol de cabra. Como bio-enmiendas derivadas de los SCG se utilizaron vermicompost, compost, biochars (a 270 y 400°C mediante pirolisis), SCG lavados con etanol, SCG lavados con agua e hidrochar (180°C mediante carbonización hidrotermal). Los diferentes controles y tratamientos SCG y sus principales objetivos se resumen en la **Tabla 5**. La tasa de aplicación al suelo para todas las bio-enmiendas fue del 7.5% (p/p). Las muestras incubadas se incluyeron para estudiar el efecto de barbecho y consistieron en muestras sin adición de SCG o adicionadas con 7.5% de SCG; estas muestras se incubaron durante 40 días previamente al ensayo en las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente, pero no se cultivaron con lechuga. Se incluyó un grupo final que consistió en 3 muestras de lechugas *baby* para comparar el efecto de SCG en el estado inicial de las lechugas. En este ensayo se analizaron los microelementos Cu, Fe y Zn, en planta, y en suelo se analizaron las principales propiedades químicas y fisicoquímicas junto con los contenidos de Cu, Fe y Zn extraíbles con DTPA (**Figura 34b**).

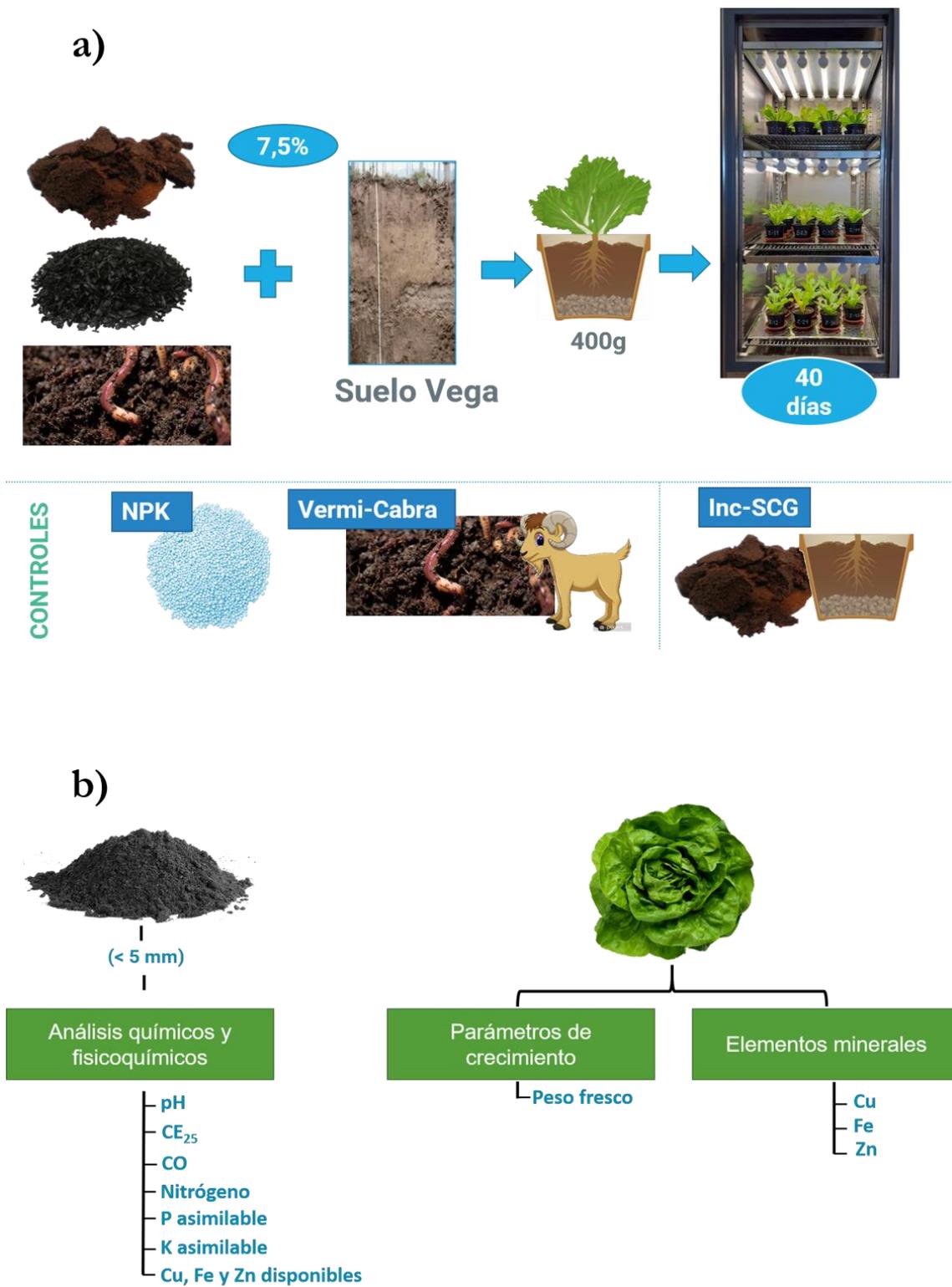


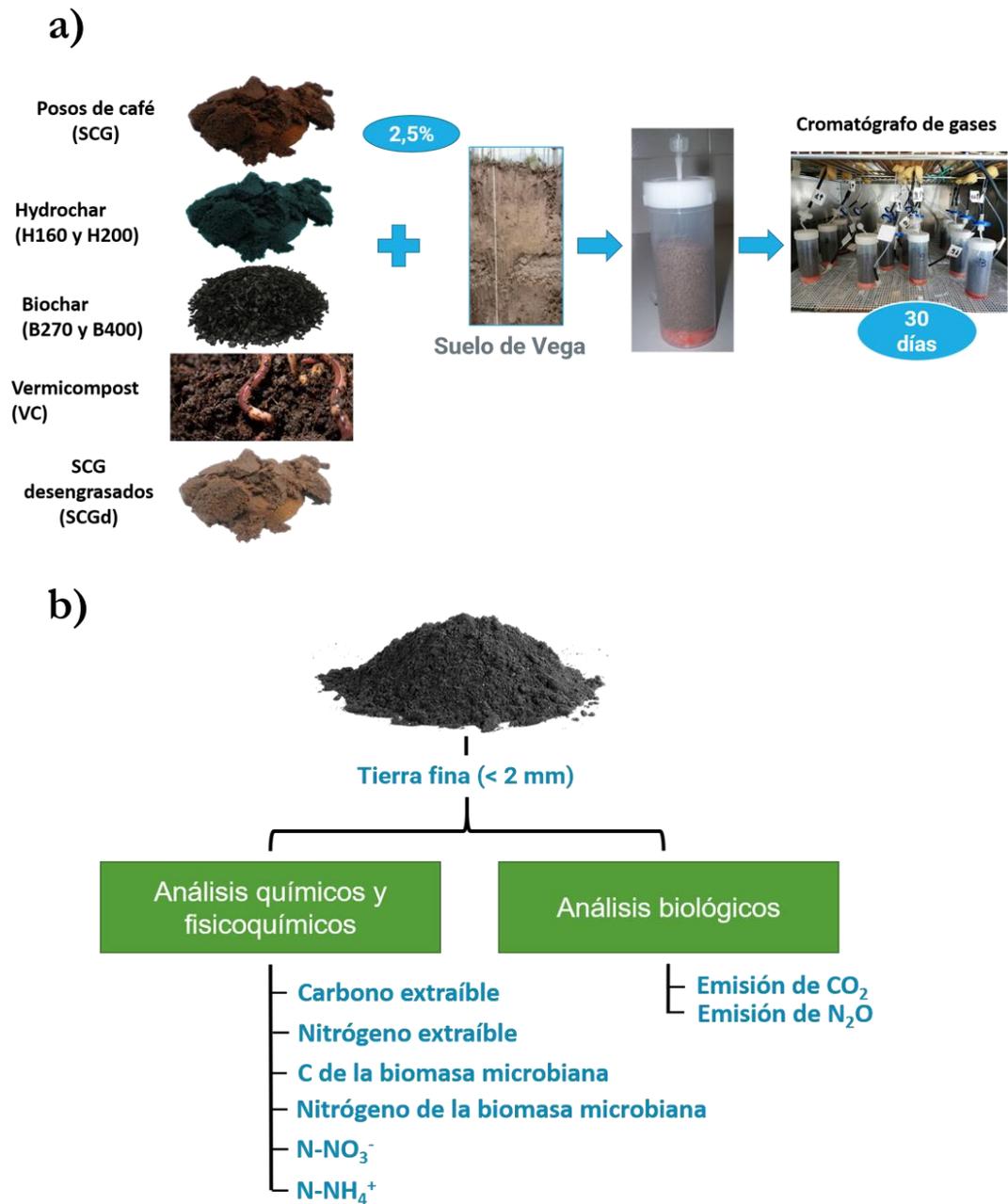
Figura 34. a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 7. CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C; CO, carbono orgánico.

**Tabla 5.** Condiciones experimentales, nomenclatura y objetivos de cada tratamiento.

	Microcosmos	Nomenclatura	Objetivo
Muestras control	Suelo de Vega con 7.5% de SCG	SCG-frescos	Comparación con el material fresco
	Suelo de Vega sin bio-enmienda	NoBE	Comparación con la muestra sin tratar
	Suelo de Vega sin bio-enmienda previamente incubado durante 40 días	NoBE-inc	Control del efecto barbecho
	Suelo de Vega con NPK (15:15:15) (1.75 g/kg suelo)	NPK	Comparación con la fertilización inorgánica
	Suelo de Vega con vermicompost de estiércol de cabra	Vermi-cabra	Comparación con la agricultura orgánica convencional
Tratamientos de los SCG para eliminar la inhibición al crecimiento de las plantas	Suelo de Vega con 7.5% SCG previamente incubado durante 40 días	SCG-inc	Efecto barbecho
	Suelo de Vega con 7.5% SCG vermicompostado	SCG-vermi	Mineralización biológica de compuestos tóxicos
	Suelo de Vega con 7.5% SCG compostado con dolomita [CaMg(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	SCG-comp	Mineralización biológica de compuestos tóxicos
	Suelo de Vega con 7.5% biochar de SCG a 270°C	SCGchar <sub>270</sub>	Pirólisis de compuestos tóxicos a baja temperatura
	Suelo de Vega con 7.5% biochar de SCG a 400°C	SCGchar <sub>400</sub>	Pirólisis de compuestos tóxicos a temperatura media
	Suelo de Vega con 7.5% SCG lavados con etanol	SCG-etanol	Lixiviado de compuestos tóxicos
	Suelo de Vega con 7.5% SCG lavados con agua caliente	SCG-H <sub>2</sub> O	Lixiviado de compuestos tóxicos
	Suelo de Vega con 7.5% SCG hidrolizados	SCG-hidro	Tratamiento con agua a alta temperatura

### ***Ensayo 8 (bio-enmiendas derivadas de los posos de café y su influencia en la dinámica del C y N)***

El ensayo de incubación correspondiente al **ensayo 8** se realizó con 60 g (peso seco) de suelo en frascos de polipropileno (**Figura 35a**). Antes del inicio del ensayo, los suelos se acondicionaron previamente al 40% de la capacidad de la capacidad de campo y 20 °C en condiciones aeróbicas durante 5 días. Posteriormente se añadieron las diferentes enmiendas en una dosis del 2.5% (p/p) y se incubaron en laboratorio durante 30 días a 20 °C. Las bio-enmiendas utilizadas fueron las siguientes: SCG, biochar de SCG a 270°C (B270), biochar de SCG a 400°C (B400), hidrochar de SCG a 160°C (H160), hidrochar de SCG a 200°C (H200), vermicompost de SCG (VC), SCG desengrasado (SCG<sub>d</sub>), biochar de SCG desengrasado a 270°C (B270<sub>d</sub>) y biochar de SCG desengrasado a 400°C (B400<sub>d</sub>). El suelo sin tratar también se incluyó como control. El ensayo se realizó por cuadruplicado. El suelo se muestreó en los días 2, 7 y 30. Los niveles de humedad en los frascos se verificaron dos veces por semana midiendo la pérdida de peso y se agregó agua desionizada cuando fue necesario para mantener una humedad constante. El esquema metodológico correspondiente al ensayo 8 se muestra en la **Figura 35b**. En este ensayo se analizaron propiedades relacionadas con el ciclo del C y N: evolución del CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O, C y N extraíbles, C y N de la biomasa microbiana y compuestos nitrogenados.

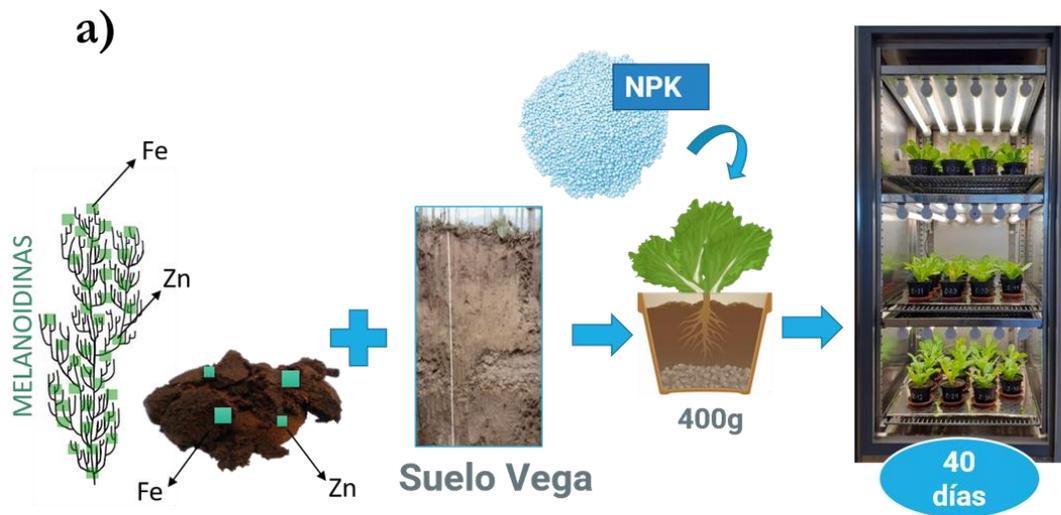


**Figura 35.** a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al

Ensayo 8

***Ensayo 9 (uso potencial de los SCG y otros derivados de la bebida del café como quelatos en la biofortificación agronómica de plantas comestibles)***

El diseño experimental correspondiente al **ensayo 9** se recoge en la **Figura 36a**. Se calculó la dosis de quelatos comerciales y bioquelatos de melanoidina añadidos a cada maceta para obtener una concentración final de Fe y Zn de 10 mg kg<sup>-1</sup> de suelo (Almendros et al., 2015; Morikawa y Saigusa, 2008). Sin embargo, la cantidad agregada del bioquelato de SCG fue de 2 g por maceta, ya que esta dosis era la mínima necesaria para obtener una mezcla homogénea, teniendo en cuenta que el tamaño medio de partícula de SCG está entre 500 y 250 µm. Además, esta dosis es la mínima que no causa fitotoxicidad en la planta. 2 g de bioquelato de SCG corresponden a 20.21 mg de Fe kg<sup>-1</sup> y 89.61 mg de Zn kg<sup>-1</sup>. Los quelatos comerciales (EDDHA-Fe y EDTA Zn) se aplicaron sobre la superficie del suelo en una sola dosis con el agua de riego. Los bioquelatos de melanodinas y SCG se mezclaron completamente con el suelo ya que se encuentran en fase sólida. Se seleccionaron dos quelatos comerciales como controles: Fe etilendiamina-N,N'-bis (EDDHA-Fe, 6% w: w) y etilendiaminotetraacetato de zinc (EDTA-Zn, 14% w: w) suministrado por TRADE CORPORATION INTERNATIONAL, S.A.U. La fertilización basal se aplicó con 100 mg de N kg<sup>-1</sup> (como HNO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>), 44 mg de P kg<sup>-1</sup> (como P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y 84 mg de K kg<sup>-1</sup> (como K<sub>2</sub>O). Como controles, se adicionaron melanoidinas y SCG no tratados con Fe y Zn en las mismas condiciones descritas anteriormente. En la **Figura 36b** se recoge el esquema metodológico seguido en este ensayo. En la planta se analizaron los microelementos Fe y Zn. En suelos se analizó el pH y la CE<sub>25</sub> y los elementos Fe y Zn extraíbles con DTPA.



CONTROLES

QUELATOS COMERCIALES



b)

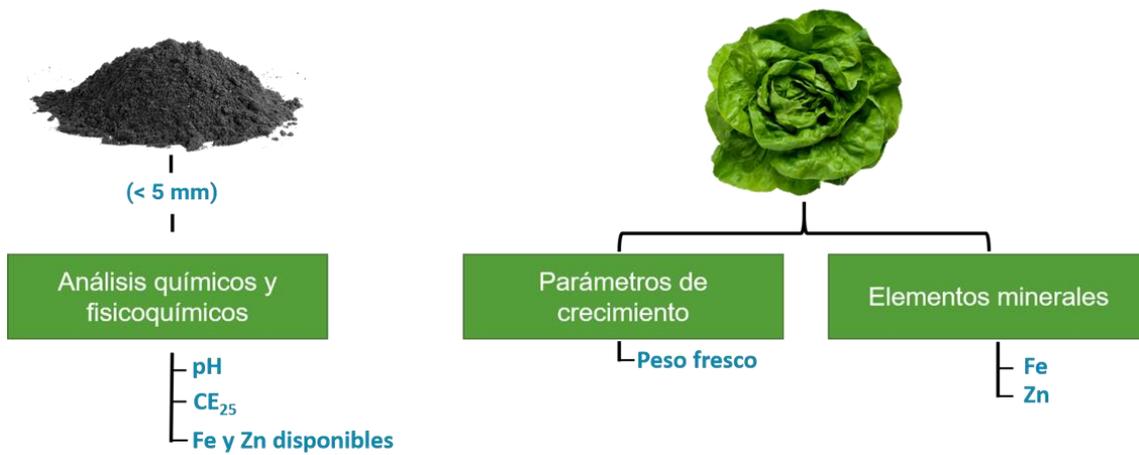


Figura 36. a) Diseño experimental y b) esquema metodológico, correspondientes al Ensayo 9. CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C.

### **3.2.2. Condiciones de cultivo comunes a todos los ensayos**

Las condiciones de cultivo descritas a continuación corresponden a todos los ensayos excepto para el ensayo 8. Para cada tratamiento, tierra fina seca al aire (<2 mm) para los ensayos 1, 2, 3, 4 y tierra tamizada a 5 mm, para los ensayos 5, 6, 7 y 9, se mezcló con las diferentes cantidades de SCG para obtener 400 g de mezcla suelo-SCG.

Las lechugas de 30 días de edad se transfirieron con la mezcla suelo-SCG a macetas de PVC de 300 ml de capacidad cerradas con una malla de fibra de vidrio en la base. Posteriormente se incubaron en una cámara climática con condiciones controladas de humedad relativa de 60-80 %, temperatura de 22/18 °C (día / noche) y fotoperíodo de 12/12 h. Para evitar la lixiviación y el estrés hídrico, la humedad de las macetas se mantuvo entre la capacidad del campo y el punto de marchitamiento permanente. Las plantas se regaron cada tres días con agua destilada (valor medio de agua añadida: 15 ml por día). Los requisitos de riego se calcularon por pesada.

En el caso de las macetas sin plántulas de lechuga, éstas se cubrieron (sin impedir el paso del aire) con un plato para evitar la germinación de las semillas que de natural podría tener el suelo.

### 3.2.3. Métodos de análisis de suelos

Los métodos de análisis de suelos fueron extraídos de los métodos de análisis de suelos de la Sociedad Estadounidense de Agronomía y Ciencia del Suelo (Soil Survey Staff, 2014) y de los métodos oficiales de análisis del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Spanish MAPA, 1994).

#### *Tratamiento de los suelos para los ensayos y para análisis*

Las muestras de suelo iniciales (Suelo de Vega y suelo Rojo) se tomaron de lo que se denomina la *capa arable* (primeros 20 cm). Las muestras de suelo fueron llevadas al laboratorio y extendidas en una lámina de unos 2 cm de espesor para su secado al aire. Transcurridas dos semanas, los suelos fueron disgregados con un rodillo de madera y tamizados a 2 mm para seleccionar la fracción “tierra fina”. Esta fracción tierra fina (< 2 mm), es la que se emplea para la elaboración de los microcosmos edáficos en los ensayos 1 a 4 y el ensayo 8. Esto se realiza para hacer comparativos los análisis obtenidos con los de la bibliografía sobre suelos. Estos ensayos, son los que tratan de la influencia de los SCG sobre las propiedades del suelo. La fracción grava real se calculó limpiando la fracción del rechazo del tamiz de 2 mm bajo un chorro de agua, eliminado de esa manera los agregados de suelo muy compactos. En los ensayos 5, 6, 7 y 9, el objetivo fue principalmente el efecto sobre planta y dado que cuando el suelo se tamiza a 2 mm existe una compactación de la maceta muy elevada, y teniendo en cuenta además que los contenidos de grava del suelo de Vega empleado en estos ensayos, son muy bajos (**Tabla 3**), se optó por emplear el suelo tamizado a 5 mm, atendiendo a que en la bibliografía este tamaño de partícula también se utiliza (Burrows y Edwards, 2004).

Los suelos fueron analizados tras los ensayos. Para su análisis, una vez terminada la incubación, los suelos fueron extendidos, secados al aire y disgregados manualmente. Una vez secos (equilibrio con la humedad ambiental) fueron embolsados y conservados en un lugar seco.

Para el análisis de la materia orgánica y la mineralogía con difracción de rayos X, una fracción de las muestras de suelo fue molida con mortero de ágata.

### ***Análisis mineralógico***

El análisis mineralógico de la tierra fina (<2 mm) y de la fracción arcilla (< 2  $\mu\text{m}$ ), se realizó por difracción de rayos X (DRX), empleando el método de polvo cristalino. En el caso de la tierra fina se emplearon porta muestras de carga frontal, pero empleando una técnica de carga lateral para asegurar la desorientación de las partículas de polvo cristalino. La determinación de la arcilla se realizó en muestras de agregado orientado. Para diferenciar la caolinita y las fases de arcillas expandibles, las muestras se calentaron a 500°C en estufa y se solvataron con etilenglicol a 50°C. Los espectros de DRX se obtuvieron usando un difractómetro Bruker D8 Advance. El porcentaje de los contenidos minerales fue estimado empleando los factores reflectantes recogidos por Delgado et al. (1982).

### ***Análisis químicos y fisicoquímicos***

pH. Fue medido en una proporción 1:2.5 (p/p) suelo-agua. El pH se determinó en un pHmetro marca Crison.

Conductividad eléctrica. Se midió a 25°C en el extracto 1:5 (p/p) de la suspensión en agua. La conductividad eléctrica se determinó con un conductímetro marca Crison.

Capacidad de intercambio catiónico. En torres de percolación, se obtuvo mediante el método del acetato de amonio (pH 7) y el método del cloruro de sodio, y luego las concentraciones se determinaron utilizando un fotómetro de llama PFP7 (JENWAY, Staffordshire, Reino Unido).

Carbonato cálcico equivalente. Fue determinado mediante el método del calcímetro de Bernard. Este método mide la cantidad de CO<sub>2</sub> desprendido al reaccionar los carbonatos del suelo con ácido fuerte (HCl 1:1).

Carbono orgánico. Se determinó de diversas formas a lo largo de la tesis doctoral. Una de ellas fue mediante digestión húmeda con  $K_2Cr_2O_7$  y  $H_2SO_4$  a  $155\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos (Mingorance et al., 2007), y una determinación adicional midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro BOECO-S200. También se determinó el CO mediante el método de Tyurin (oxidación caliente en presencia de  $K_2Cr_2O_7$  por vía húmeda) y mediante combustión con un analizador Truspec CN (LECO Corporation, Saint Joseph, MI, USA).

Nitrógeno total. Para el análisis de N se utilizaron diversas metodologías. En algunos casos el nitrógeno total se determinó mediante un analizador Truspec CN (LECO Corporation, Saint Joseph, MI, USA). En otros, el N se determinó mediante el método Kjeldahl.

Fósforo asimilable. Fue determinado mediante el método de Olsen Watanabe. Extracción del P con bicarbonato sódico y determinación mediante colorimetría mediante desarrollo de color azul (complejo fosfomolibdico). El color se midió a una longitud de onda de 825 nm con un espectrofotómetro Helios alpha (THERMO FISHER SCIENTIFIC Inc. Waltham, MA, USA).

Potasio asimilable. Fue extraído con acetato de amonio 1 N ( $pH = 7$ ) y determinado con un fotómetro de llama PFP7 (JENWAY, Staffordshire, UK).

Cu, Fe y Zn asimilables. Se determinaron mediante el método de Lindsay y Norvell (1978) (extracción con DTPA) con absorción atómica (Varian SpectraA, 140. Mulgrave Victoria, Australia).

Fe y Zn totales. Se determinaron mediante mineralización con  $HNO_3$ , HCl y HF en un digestor microondas (Multiwave 5000, Anton Para).

Compuestos extraíbles con  $K_2SO_4$ .  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ , C orgánico y N se extrajeron con  $K_2SO_4$  0.5 M en una ratio 1:4 (p/v). El  $NH_4^+$  extraíble fue determinado mediante un método colorimétrico basado en la reacción de Berthelot (Sommer et al., 1992). El  $NO_3^-$  fue determinado espectrofotométricamente a 540 nm mediante el método Griess. El C orgánico extraíble (extractable organic C, EC) y el N extraíble (extractable N, EN) fueron

medidos con un analizador TOC-TN (TOC-VCSN Shimadzu). El N y el C de la biomasa microbiana del suelo (BN y BC, respectivamente) fueron determinados mediante el método de extracción por fumigación (Vance et al., 1987). Los compuestos extraíbles fueron analizados en los tiempos de muestreo 2, 7 y 30 días.

Compuestos fenólicos totales. El ensayo Folin-Ciocalteu se usó para medir el contenido de compuestos fenólicos totales según lo descrito por Singleton et al. (1999); los compuestos fenólicos totales se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por g de suelo ( $\text{mg GAE g}^{-1}$ ).

Fraccionamiento de la materia orgánica. El fraccionamiento de la materia orgánica del suelo se realizó siguiendo el procedimiento IHSS (Swift, 1996). El carbono extraíble total (TEC) para sustancias húmicas y no húmicas se extrajo del suelo agitando mecánicamente las muestras con una solución de NaOH 0.1 M y  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (pH 14) durante 24h a 60 °C (1:10, p/v). Los extractos se centrifugaron y filtraron (Millipore 0,45 mm) separándose las fracciones de carbono extraíble total y huminas. La fracción de carbono extraíble total se separó en ácidos húmicos (AH) y ácidos fúlvicos (AF) mediante precipitación con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (para la determinación de ácidos húmicos) y purificación con polivinilpolipirrolidona para eliminar el carbono no húmico, respectivamente. Se extrajo el carbono soluble en agua caliente (HWSC) en agua destilada (1:10, p / v) durante 18h a 80 °C (Ghani et al. 2003). El contenido de C en huminas, TEC, AF, AH y HWSC se determinó mediante digestión húmeda con  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 155 °C durante 30 min (Mingorance et al., 2007) y una determinación adicional midiendo la absorbancia a 600 nm con un espectrofotómetro BOECO-S200. También se calculó la relación ácidos húmicos/ácidos fúlvicos y el grado de humificación =  $((\text{ácidos húmicos} + \text{ácidos fúlvicos}) / \text{TEC}) \times 100$ .

Índice de calidad del humus (HQI). El índice de calidad del humus, calculado como la relación CIC/CO, podría considerarse como un índice de la calidad del humus, teniendo en cuenta que la materia orgánica del suelo (SOM)

representa la mayor parte (> 70%) de la capacidad de intercambio del suelo (Stevenson, 1982). Aunque se utiliza principalmente para la evaluación de la calidad del compost, una alta relación CIC / CO podría considerarse un buen indicador de SOM bien humificada, en comparación con los tipos de humus menos evolucionados, donde la contribución a la CIC por unidad C es mucho menor (Tinoco et al., 2010).

### ***Análisis físicos***

Granulometría. El análisis de la granulometría se determinó utilizando el método de Bouyoucos (determinación de la densidad de la solución tras distintos tiempos de sedimentación).

Densidad aparente. Se determinó por el peso de la muestra de aire seco contenida en un cilindro de volumen conocido (método de Bourger).

Densidad real o densidad de partículas (DR). Se determinó mediante el método del picnómetro.

Retención de agua. La retención de agua a -33 kPa (capacidad de campo) y -1500 kPa (punto de marchitamiento permanente) se calcularon mediante el método de la membrana de Richards.

Agua utilizable por las plantas. Se calculó a partir de la diferencia entre la retención de agua en -33 y -1500 kPa, empleando el coeficiente  $C_m$  (fracción de la grava expresada de 1 a 10).

Clasificación de agregados por tamaño. La clasificación de los agregados por tamaño se realizó con tamices de 250 y 1000  $\mu\text{m}$ , diferenciando entre macroagregados (> 1000  $\mu\text{m}$ ), mesoagregados (1000-250  $\mu\text{m}$ ) y microagregados (<250  $\mu\text{m}$ ).

Estabilidad estructural. La estabilidad estructural de los macroagregados y mesoagregados se determinó utilizando el método de Kemper y Rosenau (1986), utilizando el equipo Eijkelkamp Agrisearch (Giesbeek, NL) para el

tamizado en húmedo; este análisis no se pudo realizar en los microagregados porque el tamaño mínimo del tamiz requerido por el equipo fue de 250  $\mu\text{m}$ .

Porosidad total. Se estimó a partir de la densidad aparente y la densidad real en condiciones de suelo seco al aire empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Porosidad total (cm}^3 \text{ g}^{-1}) = \frac{\text{Densidad real} - \text{Densidad aparente}}{\text{Densidad real} \times \text{Densidad aparente}}$$

Para calcular el volumen de poros en % se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de poros (\%)} = \frac{\text{Volumen de poros (cm}^3\text{)}}{\text{Volumen de suelo (cm}^3\text{)}} \times 100$$

Macroporosidad. Se calculó a partir de la porosidad total menos la microporosidad, y esta última se midió como el contenido de agua a capacidad de campo (Sánchez-Marañón et al., 2002).

Parámetros de hidrofobicidad. La prueba del tiempo de penetración de la gota de agua (Water Drop Penetration Time, WDPT) se realizó de acuerdo con Bisdom et al. (1993) y empleando las clases de repelencia: humectable ( $\text{WDTP} \leq 5$  s), ligeramente repelente al agua (5-60 s), fuertemente repelente al agua (60-600 s), severamente repelente al agua (600-3600 s) y extremadamente repelente al agua ( $> 3600$  s). Los datos de WDPT también se normalizaron utilizando la transformación  $\log(x + 1)$ . La técnica utilizada para estimar la energía libre superficial (Surface Free Energy, SFE) de los suelos en nuestros experimentos fue medir los ángulos de contacto (Contact Angle, CA) de tres líquidos (agua, formamida y diyodometano) sobre gránulos de suelo seco. La repelencia al agua del suelo ocurre si  $\text{CA} > 0^\circ$ ; Los suelos con  $0^\circ < \text{CA} < 90^\circ$  muestran una humectabilidad reducida y los valores de  $\text{CA} > 90^\circ$  indican una repelencia extrema del agua del suelo (Goebel et al., 2011). En este sentido se utilizó un goniómetro Ramé-Hart Inc., NRL C.A. (EE. UU.). De acuerdo con van Oss et al. (1988), la SFE total de un sólido se describe como una suma de dos términos, el componente Lifshitz-van der Waals  $\gamma^{\text{LWS}}$  (componente de dispersión) y la interacción ácido-base  $\gamma^{\text{ABS}}$ , que se debe principalmente al enlace de hidrógeno. En general, la interacción polar  $\gamma^{\text{AB}}$  se debe a las contribuciones

donador de electrones,  $\gamma^-$  y aceptor de electrones,  $\gamma^+$ . La relación entre el ángulo de contacto  $\theta$  y los componentes Lifshitz-van der Waals y Acid-Base del SFE del sólido (subíndice 1) y la tensión superficial del líquido se pueden escribir en el sentido del modelo van Oss como:

$$2\sqrt{\gamma_1^{LW} \gamma_{Li}^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_{Li}^-} + 2\sqrt{\gamma_1^- \gamma_{Li}^+} = \gamma_{Li} (1 + \cos \theta)$$

Donde  $\gamma_{Li}$  es la tensión superficial del líquido  $i$  formando un ángulo de contacto  $\theta$  en el sólido y  $\gamma_{Li}^{LW}$ ,  $\gamma_{Li}^+$  y  $\gamma_{Li}^-$  son los componentes de la tensión superficial del líquido.

### ***Análisis morfológicos***

Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM). Las imágenes se capturaron en agregados de suelo (1–2 mm) fijadas con cinta adhesiva de doble cara de carbono, metalizadas con carbono y analizadas con un microscopio electrónico de barrido de alta resolución y presión variable (VPESEM-FESEM) SUPRA40VP (ZEISS, Oberkochen, Alemania) equipado con un analizador elemental de rayos X de energía dispersiva (EDX).

Estereomicroscopía. Las imágenes de estereomicroscopía (Olympus SZX12) se capturaron en agregados de suelo secados al aire (aprox. 2 mm). Se realizó un análisis de imagen usando el software Image J 1.46r en una fracción de macroagregados ( $> 1000 \mu\text{m}$ ). Se cuantificaron varias características morfométricas: diámetro mayor y menor (es decir, diámetro mayor y menor de la elipse ajustada de la partícula), redondez (es decir, relación "diámetro menor": "diámetro mayor") y porcentaje de poros. Para cuantificar la porosidad, los poros se aislaron del fondo siguiendo el método de Calero et al. (2009).

### ***Análisis biológicos***

Extracción de DNA. Se utilizó un kit comercial altamente reproducible (Purswani et al. 2011) específico para la extracción de ADN del suelo (FastDNA® SPIN Kit forSoil) con el FastPrep® 24-Instrument

(MPBiomedicals, Alemania). El ADN obtenido se resuspendió en 100 µl de DES (DNasa / agua libre de pirógenos) y se almacenó a -20 ° C hasta su uso posterior.

Amplificación por PCR y 454-pirosecuenciación. Las muestras de ADN se amplificaron y secuenciaron usando datos de secuenciación de pirocódigo de genes de ARNr 16S bacterianos parciales. El 454-pirosecuenciación fue realizado por Research and Testing Laboratory (Lubbock, EE. UU.) en una plataforma GS FLX + (Roche, Branford, EE. UU.) utilizando un procedimiento descrito anteriormente (Dowd et al. 2008).

Análisis posterior a la ejecución de la pirosecuenciación. Las lecturas se recortaron y la eliminación de ruido se realizó con el algoritmo de agrupación USEARCH (Edgar, 2010). La selección de unidades taxonómicas operacionales (OTU) se realizó con el algoritmo de selección UPARSE OTU (Edgar, 2013). La afiliación taxonómica se asignó a cada OTU utilizando el clasificador RDP (Wang et al., 2007) con una confianza mínima del 80%.

Muestreo y agrupamiento de taxones bacterianos. El análisis de la abundancia relativa de la comunidad microbiana a nivel de género (> 0.5%) para todas las muestras se realizó para la caracterización de la estructura de la comunidad microbiana. Los mapas de calor se desarrollaron utilizando los paquetes R Pheatmap y RColorBrewer para representar la abundancia de cada género en la muestra.

Análisis de riqueza de especies e índices de diversidad. La afiliación taxonómica se asignó a cada OTU utilizando el clasificador RDP con una confianza mínima del 80%. Las curvas de rarefacción y los índices de diversidad alfa se calcularon utilizando el software libre PAST (Hammer et al. 2001). Con base en los datos de abundancia relativa, se usaron varios índices de diversidad, como los índices de Shannon, Simpson y Chao para describir nuestras comunidades microbianas (Hill, 1973; Chao, 1984).

Tasa de respiración (estática). Se midió la tasa de respiración (respiration rate, RR), expresada como la cantidad de CO<sub>2</sub>-C emitida por la mineralización de carbono continuamente durante 30 días de incubación (60% de capacidad de retención de agua, 25 °C y oscuridad) utilizando el método de la trampa alcalina (Anderson, 1982).

Tasa de respiración (dinámica). La evolución continua de las emisiones de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O se determinó mediante un sistema automatizado de muestreo y análisis continuo de gas (**Figura 37**, Mondini et al., 2010). El sistema funciona básicamente como un sistema de "cámara abierta" en el que las botellas de plástico que contienen la muestra de suelo se airean continuamente a un caudal constante mediante una bomba de aire. A tiempo regular, una sola botella se convierte en una "cámara cerrada" durante un período seleccionado (generalmente en el rango de 10 a 60 min) mediante dos válvulas. La concentración de gas en la cámara se mide automáticamente al principio y al final de este período de acumulación mediante un cromatógrafo de gases específicamente diseñado para mediciones de gas (Varian, CP2003) y la diferencia entre las mediciones finales e iniciales proporciona la tasa de producción de gas para el intervalo de tiempo seleccionado. El sistema puede operar con hasta 16 muestras y permite medir la tasa de evolución de gases de efecto invernadero durante períodos regulares. La evolución del CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O se determinó cada 4 horas durante la incubación.

El porcentaje de C remanente (C<sub>R</sub>) en el suelo (con respecto al total del C añadido) se ajustó a un modelo de dos compartimentos de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C_R(t) = f \times \exp(-k_1 t) + (100 - f) \times \exp(-k_2 t)$$

donde f es la fracción de C (%) de la "active pool", k<sub>1</sub> es la constante de velocidad de descomposición para la "active pool", k<sub>2</sub> es la constante de velocidad para la "slow pool" y t es el tiempo de incubación en días (Robertson y Paul, 2000). La fracción de materia orgánica exógena que permanece en el

suelo después de 1 año (el coeficiente de humificación, h), también se calculó en base a una temperatura promedio anual de 20 °C (Bradbury et al., 1993). El coeficiente de humificación da una estimación de la materia orgánica estable que permanece en el suelo (Janssen, 1984), por lo que se utilizó como indicador del potencial de secuestro de C.



**Figura 37.** Sistema automatizado de muestreo para la medición continua de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O.

Actividad deshidrogenasa (DH<sub>asa</sub>). Se determinó siguiendo el método de Casida et al. (1964) mediante la reducción de 2,3,5-trifenil tetrazolio de cloruro (TTC). El suelo (10 g) se incubó durante 24 h con TTC a 27 °C por duplicado. El trifenilformazán (TPF) formado se extrajo con acetona y se midió por espectrofotometría a 546 nm. La actividad deshidrogenasa se expresó como  $\mu\text{g TPF g}^{-1}$  suelo seco  $\text{h}^{-1}$ .

Fitotoxicidad. Se determinó siguiendo el método de Albuquerque et al. (2006) adaptado de Zucconi et al. (1981). Este método combina las medidas de germinación de semillas y el alargamiento de la raíz del berro (*Lepidium sativum* L.). Los resultados se expresaron como un porcentaje de germinación y elongación de la raíz del control de la siguiente manera:

Índice de germinación (germination index, GI) (%) = (% de germinación × % de elongación de la raíz) / 100.

### 3.2.4. Métodos de análisis de los residuos

La mayoría de los análisis realizados a las diferentes enmiendas orgánicas empleadas en la tesis doctoral (SCG, biochars, hidrochars, compost, SCG desengrasados) coinciden con los análisis realizados en suelos. En este apartado se exponen aquellos métodos que han sido modificados para el análisis de los residuos, así como otras metodologías empleadas para su caracterización.

Conductividad eléctrica y pH. La conductividad eléctrica medida a 25°C y el pH se determinaron en un extracto soluble en agua 1: 5 (p/v).

Análisis elemental (contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno). Se realizó utilizando un analizador de CNH (Thermo Scientific™ Flash 2000).

Análisis proximal. Mediante el método ASTM D1762-84 se determinó la materia volátil (a 950 °C), el contenido de cenizas (a 750 °C), el contenido de humedad (a 105 °C) y el carbono fijado, el cual se calculó a partir de los parámetros anteriores con la siguiente fórmula:

$$\text{Carbono fijado (\%)} = \frac{\text{Peso a } 105^{\circ}\text{C} - \text{Peso a } 950^{\circ}\text{C} - \text{Peso a } 750^{\circ}\text{C}}{\text{Peso a } 105^{\circ}\text{C}} \times 100$$

Elementos solubles en agua. El carbono soluble en agua (water soluble carbon, WSC) y el nitrógeno soluble en agua (water soluble nitrogen, WSN) se determinaron en extractos de agua 1:20 (p/v) usando un analizador TOC-TN (TOC-VCSN Shimadzu).

Formas de N. Las formas extraíbles de  $\text{NH}_4^+$  se calcularon usando una relación 1:20 (p / v) enmienda: KCl 1 M y se determinó mediante un método colorimétrico modificado basado en la reacción de Berthelot (Sommer et al., 1992). El  $\text{NO}_3^-$  se extrajo usando una relación 1:20 (p / v) enmienda:  $\text{H}_2\text{O}$  y se

determinó leyendo la absorbancia a 220 nm y restando la absorbancia a 275 nm causada por la materia orgánica.

### **3.2.5. Métodos de análisis de plantas**

#### ***Análisis fisiológicos***

Peso fresco y peso seco: Las plantas se extrajeron de las macetas en los diferentes tiempos de cultivo. Se separó la parte comestible de las raíces, se lavaron con agua desionizada, se secaron y se pesaron (peso fresco). Posteriormente fueron secadas en estufa a 60°C durante 24 horas (peso seco).

#### ***Análisis de elementos minerales***

Se mineralizaron 0.2 g de muestra seca mediante ataque con HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de calidad suprapura (Merck, Darmstadt, Alemania), en un digestor microondas (Milestone, Sorisole, Italia) siguiendo un protocolo previamente optimizado (Giampieri et al., 2018). La determinación de las concentraciones totales de elementos esenciales (Mg, Si, P, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Mo) y tóxicos (As, Pb, Cd y Al) en muestras de lechuga del Ensayo 5 se realizaron con un instrumento ICP-MS (Agilent 7500, Agilent Technologies, Tokio, Japón) equipado con un nebulizador tipo Meinhard (Glass Expansion, Romainmotier, Suiza) y equipado con una celda de colisión de He. Los elementos Cu, Fe y Zn de los Ensayos 7 y 9 se determinaron mediante absorción atómica (Varian SpectraA, 140. Mulgrave Victoria, Australia). Los elementos Ca, K, Mg, Na, P y S del Ensayo 6 se determinaron mediante un instrumento ICPOES (PERKIM-ELMER OPTIMA 8300). La exactitud y precisión de los procedimientos de medición se verificaron probando el estándar de referencia certificado en polvo de hojas de manzana del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) 1515 (Gaithersburg, MD, EE. UU.).

El contenido de N en las lechugas secas se determinó mediante el método de Bouat y Crouzet (1965).

### **3.2.6. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de la tesis doctoral comprende diferentes técnicas estadísticas utilizadas: análisis de la varianza, análisis de correlaciones, análisis de componentes principales, análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales y análisis de redundancia multivariante.

La homogeneidad de las varianzas se evaluó mediante la prueba de Levene y la distribución normal de las muestras con la prueba de Shapiro-Wilk. En el caso de variables paramétricas (que cumplen criterios de normalidad) y para la comparación de las medias en variables no dicotómicas se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) combinado con diferentes pruebas post hoc dependiendo del caso: prueba de Tukey, prueba T3 de Tukey, Prueba de Dunnet y prueba Fisher's LSD. Para la comparación de las medias en variables no dicotómicas y también paramétricas, se utilizó la prueba t de Student. Para analizar datos no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis combinada con la prueba U de Mann-Whitney.

Las correlaciones lineales entre las distintas variables analizadas en la tesis doctoral se evaluaron calculando el coeficiente de correlación de Pearson (para datos distribuidos normalmente) o la correlación lineal de Spearman (para datos no distribuidos normalmente).

Específicamente para el ensayo 1, se realizó un análisis de componentes principales para todas las variables estudiadas, y se seleccionaron componentes principales con eigen values superiores a 1.0.

El nivel de significancia se estableció en 5% ( $p < 0.05$ ) en todas las pruebas anteriormente descritas. Estos análisis estadísticos se realizaron con dos programas: SPSS 22.0 para Windows (IBM SPSS, Inc., Nueva York,

EEUU), Statgraphics Plus Version 3.0 (Scientific Time Sharing Corporation, Inc., Rockville, MD, EEUU) y Statgraphics Centurion XVI (Stat Point Technologies, Inc.).

Para algunos ensayos se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para reducir y explicar la variabilidad del sistema y para representar las muestras en una gráfica de componentes principales. Para este tratamiento estadístico se utilizaron dos programas: MATLAB 2008R (MathWorks, Natick, EEUU) utilizando la caja de herramientas PLS de Eigenvector Research Inc. (Wenatchee, EEUU) y Origin b9.5.5409 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EEUU).

En el ensayo 8, se realizó un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-R) para predecir las variables dependientes (X) de un gran conjunto de variables independientes (Y) utilizando el programa XLSTAT versión 2021.2.1.

En el ensayo 3 se realizó un análisis de redundancia multivariante (RDA) con el fin de establecer las relaciones entre la abundancia relativa de miembros bacterianos en los 2 suelos estudiados y los parámetros fisicoquímicos. El RDA se calculó a través de 499 simulaciones de Monte Carlo sin restricciones utilizando el software Canoco para Windows 4.5.



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 4.1. ENSAYO 1. EFECTOS SOBRE LAS PROPIEDADES QUÍMICAS Y FISICOQUÍMICAS DEL SUELO Y CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

### 4.1.1. Conocimiento previo

Las consecuencias de la adición de los SCG al sistema suelo-planta han sido previamente ensayadas teniendo en cuenta diferentes tipologías de suelo, dosis, formas de aplicación (SCG compostados *vs.* SCG frescos) y diferentes diseños experimentales (punto final *vs.* serie temporal). En el caso de las tipologías de suelo, han sido estudiados suelos artificiales (Caliskan et al., 2020; Chrysargyris et al., 2020; Cruz et al., 2012, 2014a, 2015; Ronga et al., 2016), tropicales-ácidos (Kasongo et al., 2013; Yamane et al., 2014) y suelos arenosos australianos y brasileños (Hardgrove y Livesley, 2016; Turek et al., 2019). Sin embargo, todas estas tipologías de suelos son distintas de los suelos agrícolas Mediterráneos. Cuando los SCG fueron aplicados al suelo en condiciones reales, las dosis utilizadas fueron similares a los estiércoles y otras enmiendas orgánicas (10 t ha<sup>-1</sup> máx.) (Morikawa y Saigusa, 2011; Yamane et al., 2014), mientras que en los ensayos llevados a cabo en cámara climática o invernaderos se tiende a utilizar dosis más altas (700 t ha<sup>-1</sup>) (Cruz et al., 2012, 2014a, 2014b, 2015; Hardgrove y Livesley, 2016; Kasongo et al., 2011, 2013). La forma de aplicación de los SCG también tiene diferentes efectos sobre las plantas: los SCG compostados, cuando se usan a bajas dosis, mejoran el estatus de nutrientes en la planta (Mg, Mn, K and Na), pero el uso de SCG frescos pueden provocar una disminución de los elementos minerales (Cruz et al., 2014a). Además, los SCG frescos limitan el crecimiento de las plantas (Cruz y Cordovil, 2016; Yamane et al., 2014; Hardgrove and Livesley, 2016), aunque otros investigadores han descrito un incremento del crecimiento a bajas dosis (Cruz et al., 2012). Esta limitación ha sido atribuida a la presencia de compuestos tóxicos (Hargrove y Livesley, 2016; Leifa et al., 2000; Yamane et al., 2014), pero

numerosos artículos han descrito la competencia entre los microorganismos del suelo y las raíces de las plantas por la asimilación de N (Mimmo et al., 2014). Otros autores (Ciesielczuk et al., 2017), han demostrado previamente la toxicidad de los SCG sobre diferentes plantas de cultivo, concluyendo que si los SCG son mezclados con otros productos como cenizas o fertilizantes inorgánicos podría disminuir tal toxicidad. Además, es importante señalar que la mayoría de los ensayos sobre los efectos de los SCG sobre el sistema suelo planta son estudios que sólo consideran los tiempos iniciales y finales. Sin embargo, han sido observados que diferentes parámetros analizados podrían evolucionar de manera diferente a lo largo del tiempo (Kasongo et al., 2011).

La adición de SCG modifica algunas propiedades del suelo (pH y conductividad eléctrica) (Kasongo et al., 2011) y aporta macro y micronutrientes (Cruz et al., 2012, 2014a, 2014b, 2015; Yamane et al., 2014). La disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de las plantas ha sido relacionada con la capacidad quelante de algunos componentes presentes en los SCG, como cafeína, polifenoles y melanoidinas (Kasongo et al., 2011; Morikawa and Saigusa, 2008, 2011). De acuerdo con esto, los SCG han sido utilizados como remediadores de suelos contaminados debido a su bajo contenido en metales pesados y su capacidad de adsorber algunos de estos elementos (Kim et al., 2014). La adición de SCG al suelo puede tener también consecuencias medio ambientales positivas, ya que el carbono puede ser fijado al suelo de esta manera. Además, se debe tener en cuenta que los SCG son arrojados a los vertederos, contaminando las aguas subterráneas y liberando CO<sub>2</sub> (Murthy y Madhava Naidu, 2012). Tanto EE. UU. como la Unión Europea están implementando medidas para evitar el desecho de los SCG como un bio-residuo, ya que son fuente de gases de efecto invernadero, y se propone que los SCG sean utilizados y valorizados como un recurso (EPA, 2010; OJEU, 2008).

A pesar de la gran cantidad de estudios sobre los efectos de SCG en los suelos, existe un vacío en este campo de estudio. Se han agregado SCG a

sustratos orgánicos o degradados, contaminados, arenosos, no carbonatados, a suelos desaturados y marginales para cultivo, principalmente en climas tropical/continental frío/subártico. No hay estudios sobre la aplicación de SCG a los suelos utilizados actualmente para el cultivo, donde en muchos de ellos hay una pérdida progresiva de materia orgánica y una creciente necesidad de fertilizantes inorgánicos para mantener la producción. Es el caso de los suelos agrícolas Mediterráneos (Rodríguez Martín et al., 2016), que constituyen la base de cultivos importantes como la vid, el olivo, los cereales y los cultivos hortícolas. Además, los suelos Mediterráneos (Cambisoles, Luvisoles, Regosoles, etc.) no están restringidos al área Mediterránea, sino que ocupan otras áreas de la Pedosfera (Yaalon, 1997): Europa (Sur), África (Norte y Sur), América (Norte y Sur), e incluso en Australia.

#### **4.1.2. Propiedades de las mezclas suelo-SCG**

Para identificar cada muestra se creó una nomenclatura. Por ejemplo, la muestra V-2.5-45 hace referencia a la mezcla de suelo Vega con una dosis de 2.5% SCG y 45 días de tiempo de cultivo.

La adición de SCG modifica las propiedades de los suelos analizados en proporción a las cantidades añadidas (**Tabla 6**). La tendencia de estos cambios se puede explicar mediante la comparación de las características de los suelos ensayados y de los SCG. Por lo tanto, en ambos suelos disminuye la DA, el pH, la relación C/N y el Fe asimilable, y las otras variables analizadas se incrementan. El efecto sobre la DA de los SCG no se describe en la bibliografía, pero sí se describe, por ejemplo, para el estiércol de aves de corral

**Tabla 6.** Propiedades químicas y fisicoquímicas de los SCG y las mezclas suelo-SCG.

Muestra <sup>a</sup>	pH	CE <sub>25</sub> (dS/m)	CO (%)	N total (%)	C/N	CaCO <sub>3</sub> eq. (%)	Macro y micronutrientes asimilables (mg/kg)								
							K	P	Cu	Zn	Fe	DA (g/cm <sup>3</sup> )	W <sub>33</sub> (%)	W <sub>1500</sub> (%)	H <sub>a</sub> (%)
SCG	5.8	4.5	59.38	1.867	32	nd	3072	228	47.63	14.87	8.21	0.49	118.3	110.4	54.3
V-0-0	8.2	1.3	1.36	0.105	13	39.0	453	69	4.58	0.89	6.86	1.20	15.6	15.6	4.1
R-0-0	7.2	0.6	1.16	0.113	10	1.6	248	51	3.78	1.97	4.27	1.27	20.0	11.7	3.1
V-2.5-0	7.9	1.5	2.96	0.138	21	37.6	482	79	4.95	0.96	6.89	1.15	28.9	17.6	-
V-10-0	7.6	1.6	6.18	0.286	22	35.5	688	87	5.47	1.20	6.98	1.09	32.0	22.8	-
R-2.5-0	7.1	0.7	2.31	0.148	16	0.9	324	55	5.08	2.60	4.36	1.24	22.2	12.6	-
R-10-0	6.5	0.9	6.00	0.314	19	0.8	482	64	6.74	3.38	4.63	1.17	27.5	16.9	-

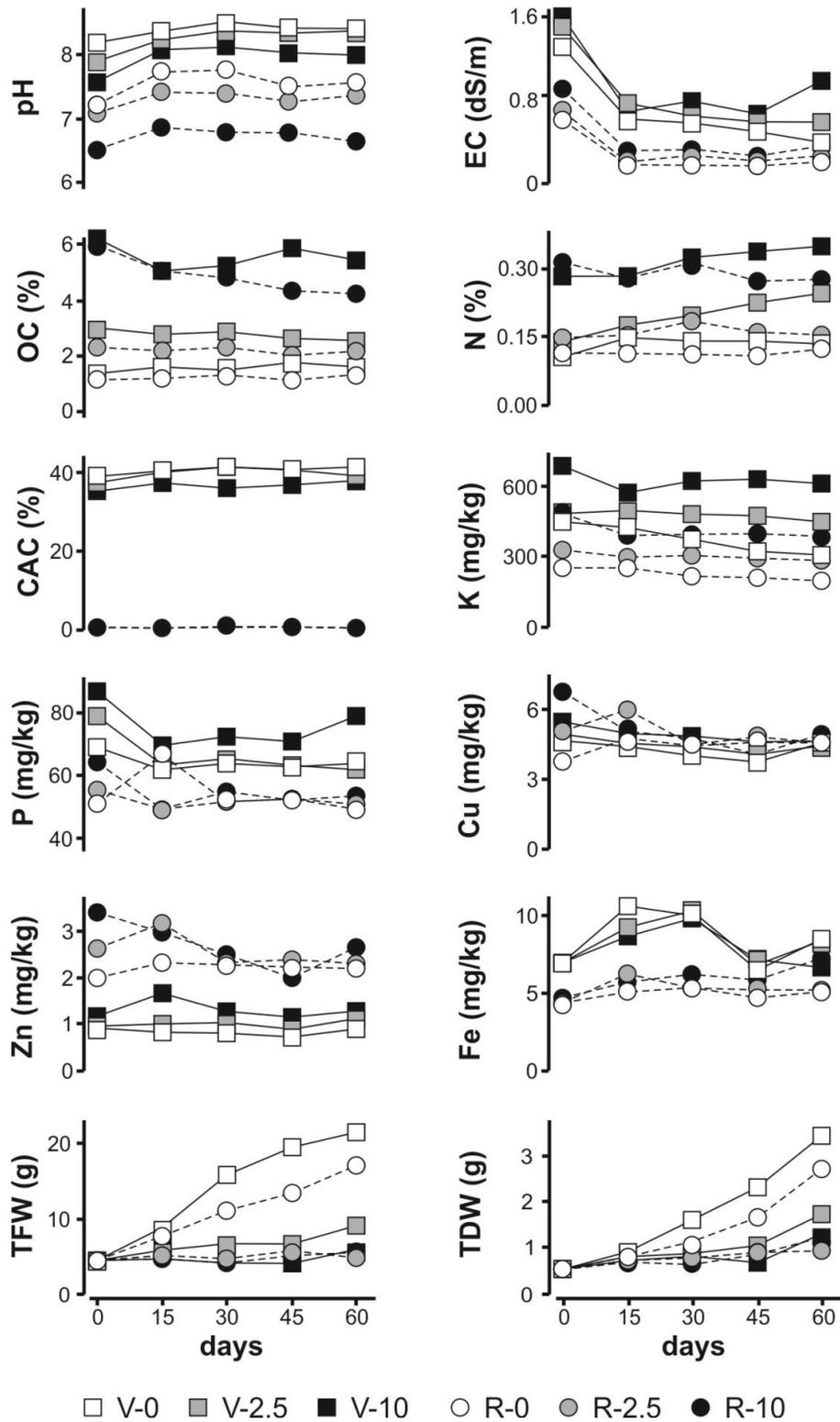
<sup>a</sup>Nomenclatura de las muestras de suelo: Tipo de suelo-%SCG-días (p. ej. V-2.5-0) = Suelo de Vega con 2.5% de SCG y 0 días de cultivo. SCG, posos de café; CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C; CO, carbono orgánico; CaCO<sub>3</sub> eq., carbonato cálcico equivalente; DA, densidad aparente; W<sub>33</sub>, capacidad de retención de agua a -33kPa; W<sub>1500</sub>, capacidad de retención de agua a -1500kPa; humedad; H<sub>a</sub>, humedad (al aire); nd, no detectado.

y la paja de trigo (Khaliq y Abassi, 2015). La adición de otros restos de café (pulpa y cáscara) aumenta la retención de agua (Kasongo et al., 2011), pero la técnica empleada en este experimento se basa en la filtración y en nuestro caso se basa en la retención a diferentes presiones (método de la membrana de Richard) y, por tanto, los resultados no son equivalentes.

#### **4.1.3. Efecto de las variables de ensayo (dosis de SCG, tipo de suelo y días de cultivo) sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo**

La adición de SCG a los suelos ensayados produce una disminución en el pH (**Figura 38**), ya que el pH de los SCG es más ácido que el pH de los suelos (**Tabla 6**). El pH está íntimamente relacionado con el tipo de suelo (de acuerdo con la matriz de componentes principales, **Tabla 7**) ya que el pH del suelo de Vega fue significativamente más alto ( $p < 0.001$ , **Tabla 8**) que el de las muestras de suelo Rojo. En la bibliografía sobre los SCG (Cruz et al., 2015; Morikawa y Saigusa, 2008), el pH incrementó con el tiempo de cultivo. En el presente estudio, este incremento puede ser atribuido a la capacidad amortiguadora de los suelos, la cual es mayor en el suelo de Vega debido a su alto contenido en carbonatos (Brady y Weil, 2002). Sin embargo, la **Figura 38** muestra que este incremento parece tener lugar en los primeros 15 días de cultivo, con una posterior estabilización e incluso disminución, aunque estos valores fueron siempre superiores a los del inicio.

La  $CE_{25}$  está estrechamente vinculada al tipo de suelo y menos relacionada con el porcentaje de SCG, de acuerdo con la matriz de componentes principales (**Tabla 7**). El sentido de estas relaciones en la  $CE_{25}$  en las macetas de suelo de Vega es significativamente mayor ( $p < 0.001$ , **Tabla 8**) que en macetas de suelo Rojo. Los SCG tienen mayor  $CE_{25}$  que los suelos



**Figura 38.** Evolución de las propiedades de suelo y planta con los días de cultivo. Nomenclatura de las muestras de suelo: Tipo de suelo- %SCG; V: Suelo de Vega; R: Suelo Rojo; EC, conductividad eléctrica medida a 25°C, OC, carbono orgánico; CAC, carbonato cálcico equivalente; TFW: peso fresco; TDW: peso seco.

ensayados, por lo tanto, su adición aumenta la salinidad en las mezclas suelo-SCG (**Tabla 6**). La  $CE_{25}$  disminuye significativamente con los días de cultivo ( $p < 0.001$ , **Tabla 8**) y sobre todo en los primeros 30 días (**Figura 38**). Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía (Cruz et al., 2015). El descenso de la  $CE_{25}$  durante el cultivo se puede atribuir a la absorción de elementos por parte de las plantas ya que las macetas son un sistema cerrado.

**Tabla 7.** Matriz de componentes principales

Variables	Componentes			
	1	2	3	4
PFT (g)	-0.819	0.381		
PST (g)	-0.679	0.342	0.487	
pH		0.901		
$CE_{25}$ (dS/m)	0.520	0.809		
CO (%)	0.908			
N total (%)	0.903			
C/N	0.816			
$CaCO_3$ eq.(%)		0.976		
K as. (mg/kg)	0.808	0.570		
P as. (mg/kg)	0.335	0.806		
Cu as. (mg/kg)	0.359	-0.531		
Zn as. (mg/kg)		-0.964		
Fe as. (mg/kg)		0.770	-0.311	
Tipo de suelo		-0.974		
Dosis de SCG	0.874			0.302
Días			0.942	
Varianza explicada (%)	35.970	30.170	13.439	5.464
Varianza acumulada (%)	35.970	66.140	79.579	85.043

PFT, peso fresco total; PST: peso seco total;  $CE_{25}$ , conductividad eléctrica medida a 25°C; CO, carbono orgánico;  $CaCO_3$  eq., carbonato cálcico equivalente; as, asimilable; SCG, posos de café. Se consideraron solo las variables con un peso superior a 0.3.

Aunque otra explicación para esta disminución podría ser la transformación de los residuos orgánicos que suponen un aumento de la capacidad de intercambio catiónico (mayor retención de iones) como se indica por otros autores en el

caso de la adición de otros residuos del café (pulpa y cáscara) en suelos arenosos tropicales (Kasongo et al., 2013).

El CO, el N total y la relación C/N se relacionan directamente con la dosis de SCG (**Tabla 7**), ya que la adición de SCG incrementó estas variables significativamente ( $p < 0.001$ , **Tabla 8**). Este hecho puede estar relacionado con el mayor contenido de CO, N y relación C/N de los SCG comparada con la de los suelos analizados (**Tabla 6**). Durante el tiempo de cultivo, el contenido de CO de las muestras adicionadas de SCG disminuyó ligeramente de manera no lineal (**Figura 38**).

**Tabla 8.** Test de comparación de medias

Variable	SCG	Tipo de suelo	Días
PFT (g)	<0.001 <sup>b</sup>		
PST (g)	<0.05*		<0.01 <sup>b</sup>
pH		<0.001 <sup>c</sup>	
CE <sub>25</sub> (dS/m)		<0.001 <sup>c</sup>	<0.05*
CO (%)	<0.001 <sup>b</sup>		
N total (%)	<0.001 <sup>a</sup>		
C/N	<0.001 <sup>a</sup>		
CaCO <sub>3</sub> eq.(%)		<0.001 <sup>c</sup>	
K as. (mg/kg)	<0.001 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>c</sup>	
P as. (mg/kg)		<0.001 <sup>c</sup>	
Cu as. (mg/kg)	<0.05 <sup>a</sup>		
Zn as. (mg/kg)		<0.001 <sup>c</sup>	
Fe as. (mg/kg)		<0.001 <sup>c</sup>	

PFT, peso fresco total; PST: peso seco total; CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C; CO, carbono orgánico; CaCO<sub>3</sub>, carbonato cálcico equivalente; as, asimilable; SCG, posos de café. <sup>a</sup>P valores resultantes del ANOVA de una vía. Las medias fueron comparadas con el test de Tukey, al ser confirmada mediante el test de Levene la homogeneidad de varianzas ( $p > 0.05$ ). <sup>b</sup>P valores resultantes del ANOVA de una vía. Las medias fueron comparadas con el test de Dunnett's T3, al no ser confirmada mediante el test de Levene la homogeneidad de varianzas ( $p < 0.05$ ). <sup>c</sup>Medias comparadas mediante el test de la t de Student, al ser confirmada la homogeneidad de varianzas por el test de Levene ( $p > 0.05$ ).

\*Datos no validados por las pruebas anteriores.

Este es un resultado esperado debido a la mineralización de los SCG durante el tiempo de cultivo. Sin embargo, otros autores han reportado un incremento en CO (Kasongo et al., 2011, 2013; Yamane et al., 2014), lo que se

atribuye al carbono insoluble generado durante la transformación de los SCG en el suelo.

Los datos de la tasa de respiración del suelo (**Tabla 9**) demuestran que los SCG estimulan la actividad global de los microorganismos del suelo. En las muestras adicionados con 2.5% de SCG, la tasa de respiración se multiplica siete veces con respecto a las muestras iniciales. En el caso de la adición de 10% de SCG, esta tasa se multiplica 12-13 veces. Hay otros residuos biológicamente activos, como el compost de lodos de depuradora (Rossini-Oliva et al., 2017), con bajos incrementos en la tasa de respiración en comparación con los SCG. Esto podría estar relacionado con una degradación de moléculas orgánicas de los SCG (Pujol et al., 2013).

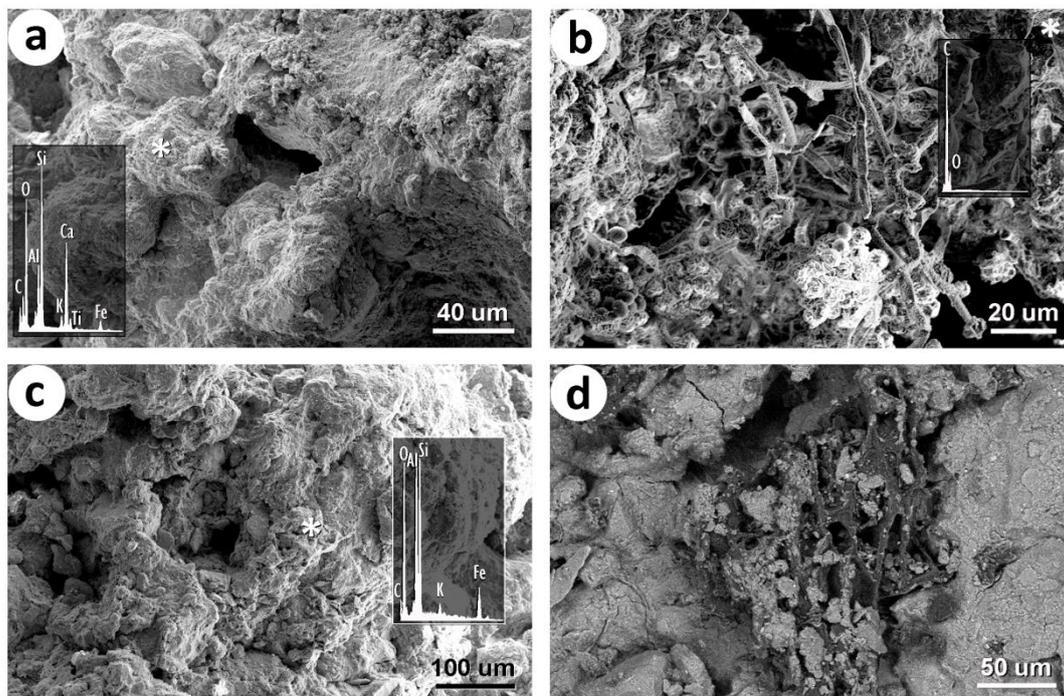
**Tabla 9.** Contenido de ácidos fenólicos totales y tasa de respiración en las muestras iniciales (sin cultivar).

Muestra <sup>a</sup>	Compuestos fenólicos totales (mg GAE/g)	Tasa de respiración del suelo (mg CO <sub>2</sub> /g día)
V-0	<0.001	0.270
V-2.5	1.066	1.852
V-10	4.122	3.309
R-0	0.353	0.248
R-2.5	2.691	1.737
R-10	6.309	3.383

<sup>a</sup>Nomenclatura de las muestras: Tipo de suelo - %SCG; V, suelo de Vega; R, Suelo Rojo; GAE, equivalentes de ácido gálico.

La observación con microscopía electrónica de barrido y el análisis elemental mediante el análisis de rayos X de energía dispersiva (**Figura 39**), muestra que las partículas de los SCG se unen a las partículas minerales del suelo formando parte de los agregados. Estas imágenes son también una evidencia del incremento en la actividad biológica en aquellas muestras adicionadas de SCG. Por otro lado, se pueden observar numerosas hifas de

hongos, originadas de las partículas de SCG y desarrollándose sobre las partículas minerales (**Figura 39b**).



**Figura 39.** Imágenes SEM y espectros DRX (el asterisco blanco indica el sitio del microanálisis). Las fotos a, b y c fueron tomadas con electrones secundarios; la foto D fue tomada con electrones retrodispersados. a) Muestra V-0-60 (Suelo de Vega sin adición de SCG y 60 días de cultivo); no se observaron microorganismos; el espectro DRX es característico de partículas minerales, particularmente silicatos y carbonato cálcico, típicos de un Calcixerept. b) Muestra V-10-60; se observan abundantes hifas de hongos con conidióforos. c) Muestra R-0-60; no se observan microorganismos; el espectro DRX corresponde a un suelo mineral, en este caso, con alto contenido en Fe ya que se trata de un Rhodoxeralf Mediterráneo rico en hematites. d) Muestra R-10-60; partícula de SCG (detectada por su color gris oscuro bajo electrones retrodispersados) unida a la superficie de la suelo y parcialmente cubierta de partículas inorgánicas (color gris claro); el espectro DRX es característico de la materia orgánica.

Por el contrario, en las muestras no adicionadas de SCG (**Figura 39 a y c**), tal actividad biológica no fue observada. Esto sugiere que los

microorganismos (hongos) degradan las partículas de los SCG y que la incorporación de los SCG ayuda a mejorar la estructura del suelo. Así, algo del carbono de los SCG puede ser incorporado en la biomasa y contar como carbono orgánico. Sin embargo, algo de este carbono puede ser perdido en forma de CO<sub>2</sub> debido al proceso aeróbico de la mineralización, ya que la humedad del suelo nunca llegó a la capacidad de campo. Esta pérdida de carbono justificaría la disminución de carbono orgánico durante el tiempo de cultivo. El incremento significativo de la actividad biológica puede tener efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas, como discutiremos más adelante.

El N total incrementó ligeramente durante el tiempo de cultivo en las macetas cultivadas con SCG (**Figura 38**). Este resultado está en línea con investigaciones previas, en las cuales este incremento fue atribuido a la acumulación de N insoluble debido a la mineralización del residuo adicionado (Kasongo et al., 2011, 2013; Yamane et al., 2014). Sin embargo, como en nuestro ensayo se ha analizado el N total, éste debería de permanecer estable o disminuir ligeramente. Por tanto, otra hipótesis es necesaria para explicar este pequeño incremento. Como se muestra en la **Figura 39b**, las partículas de los SCG parecen ser degradadas por algunos microorganismos del suelo (p.ej. hongos) cuya actividad puede generar una deficiencia en N (Kuzyakov y Xu, 2013). En respuesta a dicho déficit y a la adición de una enmienda orgánica (SCG), la actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno podría ser estimulada (Delca y Stere, 2013).

La relación C/N disminuyó durante el tiempo de cultivo debido a la disminución de CO y al incremento de N (**Figura 38**). Otros investigadores han reportado el mismo resultado (Kasongo et al., 2011, 2013; Yamane et al., 2014).

La adición de SCG disminuyó la cantidad de CaCO<sub>3</sub> eq. en las mezclas suelo-SCG debido a la ausencia de carbonatos en los SCG (**Tabla 6**). Sin embargo, el CaCO<sub>3</sub> eq. se relacionó estadísticamente con el tipo de suelo (**Tabla**

7). Así, el contenido en  $\text{CaCO}_3$  eq. en las mezclas suelo-SCG pertenecientes al suelo de Vega fueron estadísticamente mayores que las mezclas pertenecientes al suelo Rojo ( $p < 0.001$ , **Tabla 8**). En el suelo de Vega se observó un incremento del 2-3% en el contenido de  $\text{CaCO}_3$  eq. entre el tiempo inicial y final (**Figura 38**). Este incremento no pudo haber sido originado por una fuente externa ya que los microcosmos fueron regados con agua destilada. Algunos estudios han reportado la precipitación (biomineralización) de carbonatos por las bacterias del suelo (Delgado et al., 2008). Estos autores explican que esta precipitación puede estar relacionada con la presencia de iones  $\text{HCO}_3^-$  generados por la actividad microbiológica y por abundantes iones  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en los suelos estudiados (ricos en  $\text{CaCO}_3$  eq.). La abundancia de  $\text{Ca}^{2+}$  en suelos carbonatados puede explicar por qué el incremento de  $\text{CaCO}_3$  eq. fue encontrado en el suelo de Vega y no en el suelo Rojo (pobre en carbonatos). Si la hipótesis de la biomineralización fuese correcta, esto podría significar un proceso de fijación de carbono inorgánico. El tema de los carbonatos no ha sido previamente abordado en la bibliografía.

El contenido en K asimilable se relaciona con la dosis de SCG y el tipo de suelo (**Tabla 7**). La adición de SCG incrementó significativamente la cantidad de K en el suelo ( $p < 0.001$ , **Tabla 8**) debido a las altas cantidades de K en los SCG (**Tabla 6**). Este resultado está en línea con lo encontrado por otros autores previamente (Cruz et al., 2014a; Kasongo et al., 2011). Además, los niveles de K fueron significativamente más altos en las mezclas suelo-SCG procedentes del suelo de la Vega que las del suelo Rojo ( $p < 0.001$ , **Tabla 8**). Finalmente, los niveles de K disminuyeron ligeramente durante el tiempo de cultivo (**Figura 38**) lo que fue debido a la absorción de este elemento por las plantas. En otro experimento con residuos de café desarrollado sin plantas (Kasongo et al., 2011) no hubo disminución durante el tiempo de incubación.

La adición de SCG también incrementó el contenido de P asimilable, ya que este bio-residuo contiene más cantidad de P que los suelos (**Tabla 6**).

Además, el contenido de P se relaciona con el tipo de suelo (**Tabla 7**). Así, en las mezclas suelo-SCG derivadas del suelo de Vega, fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ , **Tabla 8**) que aquellas muestras derivadas del suelo Rojo. Esto es un punto a favor de la adición de SCG a suelos agrícolas ya que el P es limitado. Por otro lado, los suelos carbonatados (como el suelo de Vega) o aquellos ricos en óxidos de Fe (los suelos Rojos son ricos en hematites) tienen problemas de asimilación de P, ya que el P tiende a precipitar como fosfato cálcico o formar complejos con el hierro libre (hidróxidos). Este proceso de la inmovilización del P se le conoce como *retrogradación* (Navarro y Navarro, 2013). Por último, el contenido de P disminuyó ligeramente y no de manera lineal con el tiempo de cultivo (**Figura 38**), lo que podría estar relacionado con la absorción de este elemento por las plantas (Cruz et al., 2014a), y también al proceso de retrogradación, anteriormente mencionado.

Los contenidos de Cu, Fe y Zn disponibles se incrementaron por la adición de SCG al suelo, ya que este residuo contiene más Cu, Fe y Zn que los suelos (**Tabla 6**); este incremento fue estadísticamente significativo ( $p < 0.005$ , **Tabla 8**) para el Cu. El Cu y el Zn se relacionan inversamente con el pH (**Tabla 7**), lo que se encuentra en línea con lo reportado por Adriano (2001). Los contenidos de Cu y Zn permanecen casi constantes o disminuyen ligeramente durante el experimento (**Figura 38**), lo que está de acuerdo con ensayos previos (Kasongo et al., 2013). Esta disminución puede ser atribuida tanto a la absorción de Cu y Zn por las plantas como al descenso ligero de pH durante el tiempo (**Figura 38**).

El contenido de Fe incrementó ligeramente entre los 0 y 60 días, excepto para la muestra V-10 (**Figura 38**). El contenido de Fe incrementó entre los 0 y 30 días y posteriormente disminuyó ligeramente hasta el final del experimento, excepto para la muestra de suelo Rojo adicionada de 10% de SCG (**Figura 38**). Este comportamiento es similar al del pH y se ha comprobado que ambos parámetros se encuentran relacionados (**Tabla 7**). Sin embargo, esta relación es

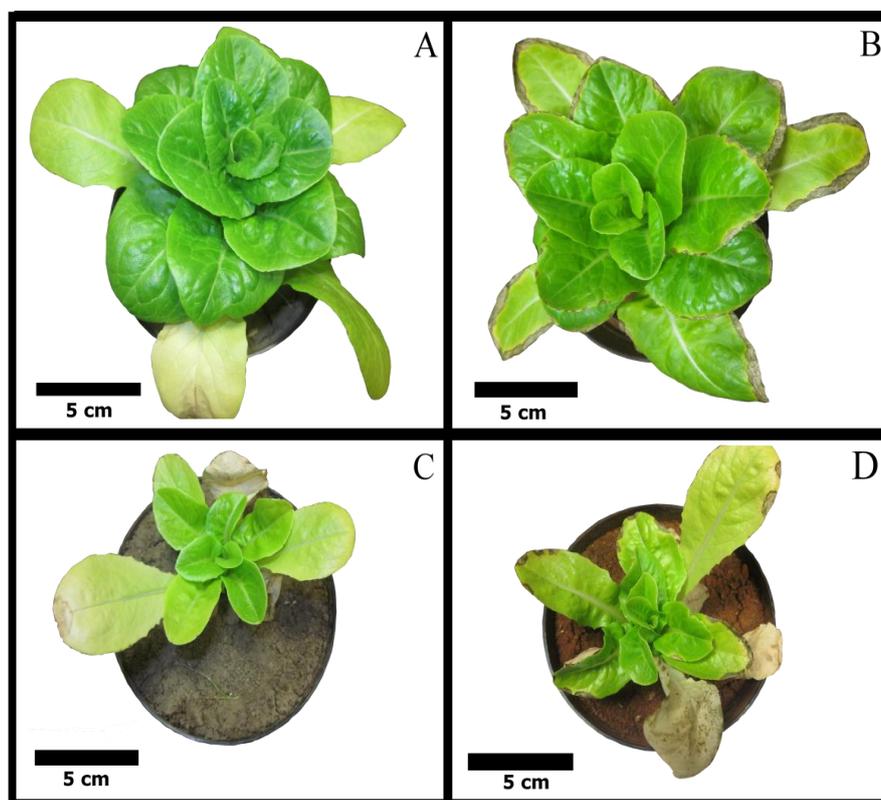
contradictoria ya que un aumento del pH se ha relacionado siempre con una disminución en la biodisponibilidad del Fe (Adriano, 2001). En los suelos para el cultivo del arroz, algunos componentes de los SCG (cafeína, polifenoles, etc.) podrían acomplejar el Fe, disminuyendo así la biodisponibilidad de este elemento, incluso en suelos calcáreos, donde el Fe es normalmente deficiente para las plantas (Morikawa y Saigusa, 2008; 2011). Otros compuestos poliméricos como son las melanoidinas tienen una fuerte capacidad quelante con respecto al ion Fe (Rufián-Henares y de la Cueva, 2009).

#### **4.1.4. Efecto de las variables de ensayo sobre el crecimiento de *L.sativa***

La adición de SCG en las dos dosis ensayadas tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento de las plantas (**Figura 38** y **Figura 40**). Los parámetros de crecimiento se relacionaron negativamente con la dosis de SCG (**Tabla 7**). La inhibición fue estadísticamente significativa para el peso fresco total ( $p < 0.001$ , **Tabla 8**). Los parámetros de crecimiento se relacionaron con otras variables de ensayo. Así, el peso fresco y el peso seco fueron mayores en las mezclas de suelo de Vega que en las del suelo Rojo (**Tabla 7**), lo que puede ser explicado por la mayor fertilidad química del suelo de Vega. El peso seco incrementó significativamente durante el tiempo de cultivo ( $p < 0.01$ , **Tabla 8**).

La limitación al crecimiento de las lechugas puede ser atribuido a la presencia de cafeína, taninos y fenoles, los cuales son tóxicos para las plantas (Ciesielczuk et al., 2017; Hardgrove y Livesley, 2016; Leifa et al., 2000; Yamane et al., 2014). Los resultados obtenidos con el test de polifenoles (**Tabla 9**) confirman que hubo un incremento significativo de estos compuestos al adicionar los SCG al suelo. Por ejemplo, en el caso del suelo de Vega adicionado con 10% de SCG, los compuestos fenólicos totales incrementaron hasta 4000 veces. Sin embargo, otros autores (Kasongo et al., 2013) han descrito efectos

positivos de residuos del café sobre el crecimiento de las plantas, debido al incremento de nutrientes en el suelo y a la mejora de la capacidad de retención de agua, ya que los suelos usados por estos autores fueron muy ácidos y arenosos (suelos con baja fertilidad).



**Figura 40.** Limitación de los SCG al crecimiento de las lechugas. A) Suelo de Vega 0% SCG. B) Suelo Rojo 0% SCG. C) Suelo de Vega 10% SCG. D) Suelo Rojo 10% SCG.

Numerosos trabajos han descrito la competencia por la asimilación de N entre los microorganismos del suelo y las raíces de las plantas, principalmente en la rizosfera (Mimmo et al., 2014). De acuerdo con esto, cuando un material orgánico es adicionado al suelo, la primera asimilación del N la llevan a cabo los microorganismos y una vez que la materia orgánica está mineralizada, las plantas comienzan a asimilar N. En el apartado sobre la dinámica del CO<sub>2</sub>, se ha discutido sobre el incremento de la actividad biológica por la adición de SCG, lo que se demuestra mediante la tasa de respiración (**Tabla 9**) y las imágenes

SEM (**Figura 39**). El incremento en la actividad biológica nos permite hipotetizar que los microorganismos limitan la disponibilidad de N para el crecimiento de las plantas. La competencia entre los microorganismos y las plantas ha sido descrita en Fitotecnia (Urbano, 2001), de acuerdo con la cual a mayor relación C/N, mayor es la limitación al crecimiento de las plantas.

Aunque Hardgrove y Livesley (2016) concluyeron que la adición de SCG limita el crecimiento de las plantas por un efecto fitotóxico, ellos también encontraron que los nitratos eran inmovilizados en el suelo. Por tanto, no está claro cuál es el efecto de la adición de los SCG sobre el crecimiento de las plantas (deficiencia de N, efecto fitotóxico o ambos).

La fuerte inhibición sobre las lechugas debido a la adición de SCG se manifestó claramente en la evolución del peso fresco y seco (**Figura 38**), donde las diferencias de peso entre las muestras adicionadas y no adicionadas de SCG son muy claras. Sin embargo, las diferencias relativas en el caso del peso fresco fueron mayores que para el caso del peso seco. Por ejemplo, la diferencia en gramos entre el peso fresco de la muestra V-10-60 y V-0-60 es proporcionalmente mayor que la diferencia entre el peso seco de V-10-60 y V-0-60 (**Figura 38**). Este cálculo indica que hay un incremento relativo de elementos minerales a pesar de las limitaciones al crecimiento de la planta. Esto podría ser atribuido a un estrés hídrico, lo cual podría forzar a la planta a acumular minerales para mejorar su capacidad de absorción de agua (Urbano, 2001). Sin embargo, el cultivo creció bajo condiciones controladas de humedad. Así, el estrés hídrico no podría ser la explicación en este caso. Otra hipótesis podría ser que los SCG tienen altos contenidos de sustancias quelantes, p.ej. polifenoles, melanoidinas, etc. (Jiménez-Zamora et al., 2015), los cuales podrían incrementar la asimilabilidad de los nutrientes del suelo. Con respecto a este aspecto, se ha mostrado la movilización de los elementos del suelo por compuestos derivados de residuos de café, los cuales pueden incrementar el

estatus de nutrientes de la planta (Kasongo et al., 2011, 2013; Morikawa y Saigusa, 2008, 2011).

Con el tiempo suficiente (al menos 120 días), el efecto limitante de los SCG sobre el crecimiento de las plantas podría desaparecer, cuando estos residuos son transformados en el suelo (Cruz et al., 2015) o adicionado como materiales compostados (Cruz et al., 2014a, 2015). En ambos casos, el efecto limitante de la actividad microbiana sería suprimido ya que el bio-residuo es previamente transformado.

#### 4.1.5. Implicaciones agrícolas y medioambientales

La adición de SCG al suelo aporta nutrientes N, P y K, reduciendo la necesidad de la adición de fertilizantes inorgánicos. El tema es más complejo para el caso del CO. Por ejemplo, el incremento de CO en el suelo de Vega para una adición de 2.5% es de 38400 kg ha<sup>-1</sup>, teniendo en cuenta que el incremento de CO fue de 1.36% a 2.96% y el suelo de Vega cuenta con una DA de 1.2 g cm<sup>-3</sup> (**Tabla 3**). De acuerdo con este incremento, la cantidad de CO que sería efectivamente incorporada al suelo como humus podría ser teóricamente calculada utilizando la siguiente ecuación (Urbano, 2001):

$$HV = R \times MS \times h$$

Donde HV es el valor humigénico (cantidad de humus generado por un residuo orgánico); R es la cantidad de residuo orgánico; MS es la materia seca; y h es el coeficiente de humificación con valores entre 0.05 y 1 (Nicolardot et al., 2001). La MS de los SCG utilizada en este ensayo fue de 0.46, calculada a 105°C. En la bibliografía no existen datos para el h correspondiente a los SCG, pero en el caso de estiércoles con una relación C/N media de 25, la h toma valores entre 0.3 y 0.4 (Thomsen et al., 2013). Así, hemos utilizado un valor de 0.3 para evaluar los SCG, para una C/N de 32 (**Tabla 6**). Aplicando la ecuación anterior, la cantidad de humus generada por 25 g kg<sup>-1</sup> de SCG sería de 5299 kg

ha<sup>-1</sup>, el cual sería el incremento real de CO en el suelo. La retención de 5299 kg ha<sup>-1</sup> de CO en forma de humus supondría una disminución de 19.426 kg de CO<sub>2</sub> (gas con efecto invernadero) emitido a la atmósfera. Para comparar estos datos con artículos previos, es mejor expresarlo como kg de CO<sub>2</sub> por tonelada de bio-residuo. Una tonelada de SCG supondría la incorporación de 1386 kg de C en el suelo, lo que daría lugar a una disminución de 506 kg de CO<sub>2</sub> emitidos a la atmósfera. Estos valores son mucho mayores que aquellos reportados para diferentes tipos de compost (2 a 79 kg de CO<sub>2</sub> por tonelada) (Boldrín et al., 2009) debido a que el anterior trabajo reportó un contenido de 1-54 kg por tonelada de producto, mientras que los SCG contienen 594 kg de CO por tonelada (correspondiente al 59.4% de CO, **Tabla 6**). Teniendo en cuenta que 5.85 millones de toneladas son producidas globalmente cada año, su incorporación al suelo daría lugar a un incremento global de 0.8 millones de toneladas de CO en la pedosfera y se evitaría la pérdida de 2.96 millones de toneladas de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. Por otro lado, la adición de 2.5% de SCG al suelo de la Vega incrementó el contenido en CaCO<sub>3</sub> eq. en un 2% aproximadamente (**Figura 38**), lo que se atribuyó previamente a la biomineralización de carbonatos. Esta captura de carbono, pero de manera inorgánica, supondría una la captura de 100 kg por tonelada de SCG, resultando en una reducción de las emisiones de CO<sub>2</sub> de 367 kg por tonelada de SCG.

#### 4.1.6. Consideraciones finales

Los efectos de la adición de SCG en los dos suelos agrícolas Mediterráneos fueron similares y proporcionales a la dosis utilizada. Sin embargo, la adición de SCG dio lugar a diferencias significativas en el pH, la CE<sub>25</sub> y en el nivel de nutrientes para ambos suelos. Por lo tanto, es necesario considerar el tipo de suelo en cada experimento realizado con SCG. La observación con SEM reveló que las partículas de SCG se incorporaron a la

masa del suelo y que los microorganismos se desarrollaron sobre las partículas. La adición de SCG limitó el crecimiento de las lechugas, aunque las causas de la limitación del crecimiento requieren más estudio. Con respecto al tiempo de cultivo, se encontró que la adición de SCG resultó en un aumento relativo en el peso seco de las lechugas (mayor grado de mineralización), lo que puede tener beneficios nutricionales. En el caso de los suelos, el tiempo de ensayo (60 días) disminuyó la  $CE_{25}$  y la relación C/N, lo que sería beneficioso desde un punto de vista agronómico. El uso de SCG en suelos agrícolas tiene claros beneficios agronómicos y ambientales.



## **4.2. ENSAYO 2. EFECTOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO**

### **4.2.1. Conocimiento previo**

Los suelos agrícolas Mediterráneos españoles tienen un bajo contenido de materia orgánica (<1%, según Rodríguez Martín et al., 2016), lo que supone un grave problema para la formación y estabilización de la estructura del suelo (Bronick y Lal, 2005). Así, una reducción en el contenido de materia orgánica implica la degradación física del suelo que conduce a una reducción de la infiltración de agua y aire y un aumento de la compactación del suelo y la escorrentía superficial del agua (Lal, 2015). Para evaluar la calidad física del suelo se utilizan comúnmente propiedades físicas como la densidad aparente, el agua disponible para las plantas, la distribución del tamaño de los agregados y estabilidad de los mismos, etc. (por ejemplo, Reynolds et al., 2008), así como el contenido de materia orgánica (por ejemplo, Dexter et al., 2004). Así, la incorporación de bio-residuos como enmiendas orgánicas podría ser una estrategia recomendable para restaurar y mejorar la calidad física de los suelos agrícolas Mediterráneos.

Hay muchos estudios que han analizado los efectos positivos de diferentes bio-residuos sobre distintas propiedades físicas del suelo como son la densidad aparente, la retención de agua, el agua disponible para las plantas, el tamaño de agregado y la estabilidad estructural (Aranda et al., 2016; Aranyos et al., 2016; Carter, 2007; Emaeelnejad et al., 2016; Ferreira de Araújo et al., 2016; Forge et al., 2016; Hernández et al., 2015; Khaliq and Abassi, 2015; Moreno et al., 2016; Omondi et al., 2016; Sall et al., 2016; Turek et al., 2019; Yazdanpanah et al., 2016). Estos autores estudiaron suelos degradados (Arenosoles, Fluvisoles, Lixisoles, en términos de la World Reference Base of Soil Resources, WRB, 2014), bajo climas tropicales o boreales, texturas arenosas y faltos de materia orgánica. Estos autores atribuyeron la mejora de las propiedades físicas

del suelo al incremento de materia orgánica, el estímulo de la actividad biológica- la cual mejoró la estructura del suelo a través de la generación de polisacáridos considerados como agentes cementantes- a la hidrofobicidad de los materiales incorporados, etc. Sin embargo, comparar los efectos de las diferentes enmiendas es difícil, debido a la enorme variabilidad de las condiciones ambientales de los lugares de estudio, las características químicas, físicas y fisicoquímicas de los residuos y los diferentes suelos estudiados, las condiciones experimentales, etc. Además, las raíces de las plantas y su rizosfera tienen muchos efectos positivos sobre la agregación del suelo, ya que las raíces y sus microorganismos asociados liberan una variedad de compuestos, los cuales tienen un efecto cementante sobre las partículas del suelo (Bronick y Lal, 2005).

El efecto de los SCG sobre las propiedades físicas del suelo no ha sido ampliamente estudiado hasta la fecha, ya que la mayoría de lo reportado sólo se centra en las propiedades químicas y fisicoquímicas de los SCG (Cruz et al., 2012, 2014a, b, 2015; Yamane et al., 2014; Hardgrove y Livesley, 2016). En cuanto a las propiedades físicas hay poca bibliografía sobre el efecto de los SCG. Así, Hardgrove y Livesley (2016) reportaron que la adición de SCG incrementaba la retención de agua en el suelo, mismo resultado encontrado por Turek et al. (2019), los cuales reportaron además un aumento del agua disponible para las plantas y una disminución de la porosidad de drenaje del suelo.

Ha sido demostrado que las variables de la microestructura del suelo son herramientas muy útiles en el estudio de la calidad física de los suelos (Calero et al., 2019; Delgado et al., 2007; Sánchez-Marañón et al., 2011). Los análisis de imágenes mediante estereomicroscopía y análisis SEM (microscopía electrónica de barrido), permite obtener datos precisos sobre la porosidad del suelo (forma, tamaño, área, etc.) y microestructura del suelo (Calero et al., 2009; Delgado et al., 2007). Abera et al. (2017) destacaron la importancia del *thresholding* en el estudio de imágenes de suelo en 2D y 3D.

La región Mediterránea presenta condiciones irregulares de temperatura y precipitaciones, lo que hace necesario el uso de ensayos de microcosmos de suelo exploratorios como reportó Esmaelnejad et al. (2016). En estos ensayos, todos los factores independientes del suelo, los cuales tienen una influencia sobre la materia orgánica del suelo, como la temperatura, la humedad, los cambios biológicos, etc. (Sonnleitner et al., 2003) pueden ser controlados.

#### 4.2.2. Propiedades físicas y químicas

En este capítulo se ha utilizado una nomenclatura específica para las muestras: “Dosis + tiempo de incubación + presencia o no de planta”. Para poder comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con los de la bibliografía las dosis utilizadas de SCG (2.5 y 10% p:p) se expresaron en  $\text{Mg ha}^{-1}$ : 60 y 240, respectivamente.

La adición de SCG incrementó significativamente las cantidades de CO (**Tabla 10** y **Tabla 11**). La mayor dosis de SCG incrementó el CO en un 313 y 339% (suelo de Vega y suelo Rojo, respectivamente) con respecto a la muestra control ( $0 \text{ Mg ha}^{-1}$  SCG + 0 días). No se observaron ningunas diferencias estadísticamente significativas entre el CO y otras variables de ensayo, aunque fue observado un ligero incremento de CO durante la incubación en las muestras adicionadas de SCG (**Tabla 10**).

La DA de los suelos disminuyó con la dosis de SCG, excepto para la muestra  $60 \text{ Mg ha}^{-1}$  SCG + 30 días + sin planta (SP), la cual incrementó en el suelo de Vega y permaneció estable en el suelo Rojo (**Tabla 10**). El porcentaje de disminución fue notablemente variable y osciló de un máximo de 31% para la muestra  $240 \text{ Mg ha}^{-1}$  SCG + 60 días + SP en el suelo de Vega (DA de 1.20 a

**Tabla 10.** Propiedades físicas del suelo en relación a los distintos tratamientos.

	Dosis (Mg ha <sup>-1</sup> SCG)	Muestra 'Tiempo cero'			Sin planta						Con planta					
		0	60	240	0		60		240		0		60		240	
		0	0	0	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
CO (%)	SV	1.36	2.96	6.18	1.39	1.40	2.58	2.37	5.66	5.51	1.52	1.66	2.88	2.50	5.27	5.49
	SR	1.16	2.31	6.00	1.03	1.19	2.49	2.08	5.40	5.54	1.38	1.39	2.36	2.20	4.22	4.28
DA (g cm <sup>-3</sup> )	SV	1.20	1.15	1.09	0.98	0.97	0.99	0.93	0.96	0.96	1.10	1.11	1.03	1.02	1.01	0.95
	SR	1.27	1.24	1.17	1.07	1.15	1.07	1.08	1.03	1.01	1.13	1.14	1.06	1.06	1.03	0.97
W <sub>33</sub> (%)	SV	26.4	28.9	32.0	28.6	28.3	30.0	29.6	33.7	35.7	28.2	28.7	29.9	29.3	34.2	35.0
	SR	20.0	22.2	27.5	20.7	19.3	22.2	21.5	30.8	30.1	20.6	19.8	22.0	22.2	30.0	28.2
W <sub>1500</sub> (%)	SV	15.6	17.7	22.8	15.2	15.3	16.5	16.7	27.0	29.6	14.7	15.9	18.7	18.4	29.5	32.7
	SR	11.7	12.6	16.9	11.5	11.1	13.9	14.3	25.0	28.7	11.8	12.1	15.2	15.4	26.0	26.0
AU (mm cm <sup>-1</sup> )	SV	1.30	1.28	1.22	1.32	1.27	1.34	1.20	0.65	0.59	1.48	1.43	1.14	1.11	0.47	0.22
	SR	1.05	1.03	0.99	0.98	0.95	0.89	0.78	0.60	0.12	0.99	0.88	0.73	0.72	0.41	0.21
Macroagregados (%)	SV	25	25	25	85	79	39	89	32	68	90	47	38	74	47	41
	SR	22	22	22	76	40	55	67	39	69	57	43	52	53	40	80
Mesoagregados (%)	SV	48	48	48	14	19	50	11	51	30	9	36	55	24	41	49
	SR	45	45	45	22	40	40	31	50	25	33	45	40	37	52	18
Microagregados (%)	SV	27	27	27	1	2	11	0	17	3	1	17	7	2	12	10
	SR	33	33	33	2	20	5	2	11	6	10	13	8	10	8	2
Macroagregados estables (%)	SV	62	62	62	49	52	61	73	77	92	45	56	57	64	76	91
	SR	64	64	64	42	50	69	88	86	94	53	62	65	81	79	94
Mesoagregados estables (%)	SV	32	32	32	51	54	76	82	93	94	59	62	68	76	90	96
	SR	56	56	56	64	46	70	86	94	96	67	78	66	85	98	97

SCG, posos de café; SV, suelo de Vega; SR, suelo Rojo; DA, densidad aparente; W<sub>33</sub>, retención de agua a -33 kPa; W<sub>1500</sub>, retención de agua a -1500 kPa; AU, agua utilizable.

0.96 g cm<sup>-3</sup>) a un mínimo de 8% para la muestra 0 Mg ha<sup>-1</sup> SCG + 60 días+ con planta (CP), también en el suelo de Vega (DA de 1.20 a 1.11 g cm<sup>-3</sup>). La DA disminuyó significativamente con el tiempo (**Tabla 11**), de acuerdo con la ecuación 'DA (g cm<sup>-3</sup>) = 1.145 - 0.002 × tiempo (días)' ( $r = -0.587$ ;  $p < 0.001$ ). Esta propiedad fue significativamente mayor en el suelo Rojo que en el suelo de Vega ( $p < 0.05$ ; **Tabla 11**). No se encontró ninguna relación entre esta propiedad y la presencia de planta.

**Tabla 11.** ANOVA de una vía y test de la t de Student.

Variable	ANOVA		Test de la t de Student
	SCG	Tiempo	Tipo de suelo
CO	<0.001*		
DA		<0.001*	<0.05+
W <sub>33</sub>	<0.01***		<0.001+
W <sub>1500</sub>	<0.001***		<0.05+
AU	<0.001**		<0.05+
Macroagregados		<0.001**	
Mesoagregados		<0.05**	
Microagregados		<0.01**	
Macroagregados estables	<0.001*		
Mesoagregados estables	<0.01*	<0.001*	

SCG, posos de café; CO, carbono orgánico; DA, densidad aparente; W<sub>33</sub>, retención de agua a -33 kPa; W<sub>1500</sub>, retención de agua a -1500 kPa; AU, agua utilizable.

\* P valores procedentes de un ANOVA de una vía. Las medias fueron comparadas por el test de Tukey, ya que la homogeneidad de varianzas fue confirmada por el test de Levene ( $p > 0.05$ ).

\*\* P valores procedentes de un ANOVA de una vía. Las medias fueron comparadas por el test de Dunnett's T3 ya que la homogeneidad de varianzas no fue confirmada por el test de Levene ( $p < 0.05$ ).

\*\*\*P valores de un ANOVA de una vía por rangos. Las medias fueron comparadas por el test de Kruskal-Wallis, ya que la normalidad de los datos no fue confirmada por el test de Shapiro-Wilks ( $p < 0.05$ ).

+Las medias fueron comparadas por el test de la t de Student, ya que la homogeneidad de varianzas no fue confirmada por el test de Levene ( $p > 0.05$ ). No se incluyeron los resultados de la variable planta ya que no fueron significativos.

La adición de SCG incrementó la retención de agua en ambos potenciales: -33kPa y -1500 kPa (**Tabla 10**). La adición de 60 Mg ha<sup>-1</sup> de SCG incrementó la W<sub>33</sub> y la W<sub>1500</sub> un 11% y un 19% con respecto a la muestra control. La adición de 240 Mg ha<sup>-1</sup> de SCG incrementó la W<sub>33</sub> y la W<sub>1500</sub> un 40% y un 108% con respecto a la muestra control. La influencia de la dosis de SCG fue significativa sobre la retención de agua y también sus correlaciones; 'dosis de

SCG' *versus* 'W<sub>33</sub>' ( $r = 0.672$ ;  $p < 0.001$ ) y 'dosis de SCG' *versus* 'W<sub>1500</sub>' ( $r = 0.892$ ;  $p < 0.001$ ). La W<sub>33</sub> incrementó más en el suelo de Vega que en el suelo Rojo y la W<sub>1500</sub> incrementó más en el suelo Rojo que en suelo de Vega. Estos incrementos fueron significativos en ambos casos:  $p < 0.001$  para el W<sub>33</sub> y  $p < 0.05$  para W<sub>1500</sub> (**Tabla 11**). No hubo relaciones estadísticamente significativas entre la retención de agua y el tiempo.

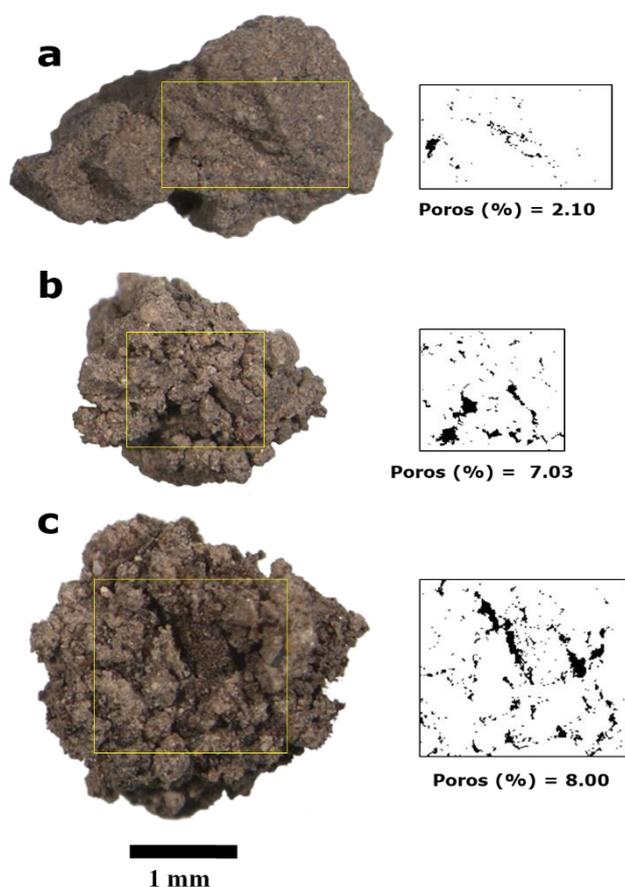
La adición de SCG disminuyó el contenido de AU en ambos suelos. En el suelo de Vega, el valor de 1.30 mm cm<sup>-1</sup> en la muestra control alcanzó un mínimo valor de 0.20 mm cm<sup>-1</sup> en la muestra 240 Mg ha<sup>-1</sup> SCG + 60 días + CP (**Tabla 10**). En el suelo Rojo, valores de 1.05 mm cm<sup>-1</sup> para la muestra control alcanzaron un valor mínimo de 0.12 mm cm<sup>-1</sup> en la muestra 240 Mg ha<sup>-1</sup> SCG + 60 días + SP. La dosis de SCG y el tipo de suelo influyeron significativamente en el AU ( $p < 0.001$  y  $p < 0.05$ , respectivamente, **Tabla 11**). El efecto significativo de los SCG es también corroborado por la correlación de 'dosis de SCG' *versus* 'AU' ( $r = -0.711$ ;  $p < 0.001$ ).

El porcentaje de macroagregados incrementó durante el tiempo de cultivo en las muestras adicionadas de SCG (excepto para la muestra 240 Mg ha<sup>-1</sup> SCG + CP en suelo de Vega), incrementando durante los primeros 30 días y disminuyendo en las muestras sin adición de SCG (**Tabla 10**). Hubo una relación significativa entre el porcentaje de macroagregados y el tiempo, pero no la hubo con los SCG (**Tabla 11**). La ecuación que muestra la relación entre el porcentaje de macroagregados y el tiempo es la siguiente: 'macroagregados (%) = 29.834 + 0.591 × tiempo (días)' ( $r = 0.619$ ;  $p < 0.001$ ). Por el contrario, el porcentaje de meso y microagregados disminuyó durante el tiempo de incubación en las muestras adicionadas de SCG (**Tabla 10**). La relación entre los SCG y estas propiedades fue altamente significativa (**Tabla 11**): 'mesoagregados (%) = 23.644 - 0.322 × tiempo (días)' ( $r = -0.456$ ;  $p < 0.001$ ); 'microagregados (%) = 46.530 - 0.269 × tiempo (días)' ( $r = -0.696$ ;  $p < 0.001$ ).

El porcentaje de macro y mesoagregados estables incrementó por la adición de SCG y el tiempo de incubación alcanzando valores máximos de 94% (macroagregados) y 98% (mesoagregados) cuando se adicionó 240 Mg ha<sup>-1</sup> SCG (**Tabla 10**). Las correlaciones de ‘dosis de SCG’ *versus* ‘macroagregados estables’ ( $r = 0.741$ ;  $p < 0.001$ ) y ‘dosis de SCG’ *versus* ‘macroagregados estables’ ( $r = 0.554$ ;  $p < 0.01$ ) fueron altamente significativas. También se observó una correlación significativa y positiva entre el tiempo de experimentación y el porcentaje de mesoagregados estables ( $r = 0.589$ ;  $p < 0.001$ ).

### 4.2.3. Morfología

Las imágenes de los agregados con distintos tratamientos (como ejemplo el suelo de Vega, **Figura 41**) tomadas con un estereomicroscopio, indican que son, según los términos de la Soil Science Division Staff (2017), de tipo granular en las muestras control y migajosas (más porosas) en las muestras incubadas o cultivadas con o sin SCG. Para el estudio de los parámetros de redondeamiento y porosidad, mediante análisis de imagen con Image J, se han elegido la fracción macroagregados (>1000  $\mu\text{m}$ , **Tabla 12**). La adición de SCG y el tiempo de incubación incrementaron el redondeamiento y la porosidad, aunque estas tendencias fueron solo significativas para el caso de la porosidad ( $p < 0.001$ ). El incremento en la porosidad puede ser observado en la **Figura 41b** y **c** y fue corroborado mediante el análisis de imagen (**Tabla 12**). La porosidad se incrementó de 2.10% en las muestras control a 7.03 y 8.00% en las muestras 0 Mg ha<sup>-1</sup> + 60 días y 240 Mg ha<sup>-1</sup> + 60 días, respectivamente (**Figura 41**). Con el tiempo de incubación, se observó una jerarquización de los agregados en micropeds menores de 1 mm (**Figura 41b** y **c**). La incorporación de los SCG parece producirse en grietas intra-ped (**Figura 41c**).



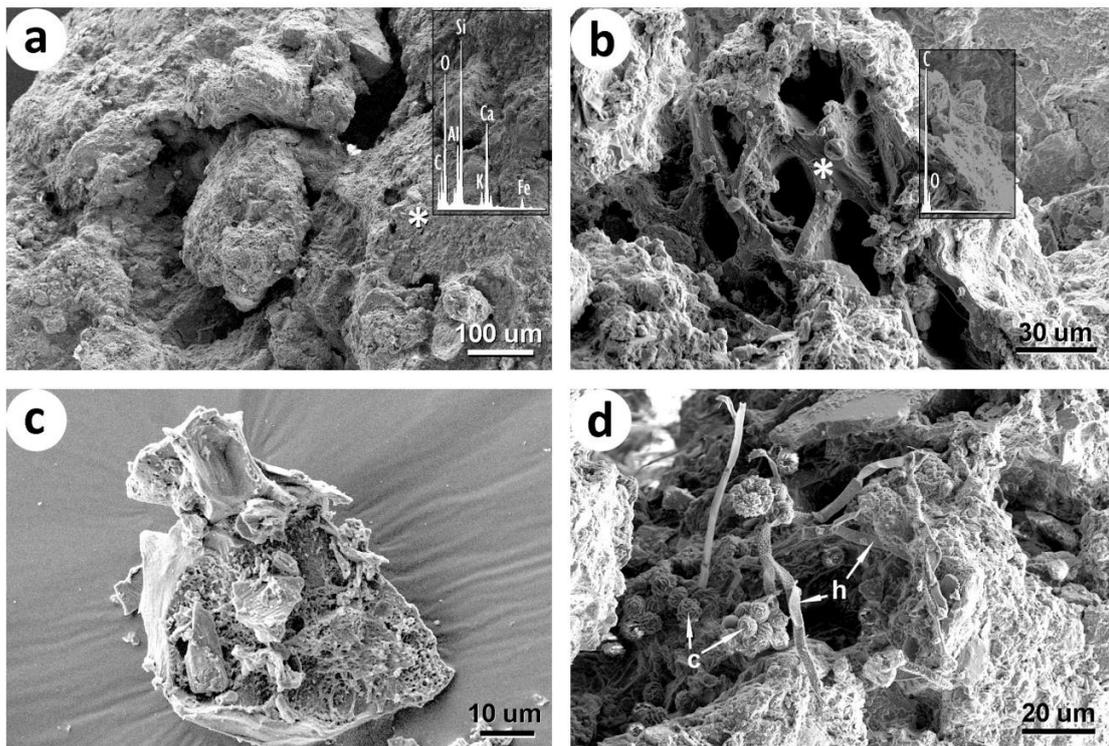
**Figura 41.** Imágenes estereomicroscópicas de los macroagregados correspondientes a muestras del suelo de Vega y resultados del análisis de imagen. a) 0 Mg ha<sup>-1</sup> SCG + 0 días. b) 0 Mg ha<sup>-1</sup> SCG + 60 días + sin planta. c) 240 Mg ha<sup>-1</sup> SCG + 60 días + sin planta.

**Tabla 12.** Parámetros de la microfábrica de las muestras de suelo y de las mezclas suelo-SCG medidas con estereomicroscopio y análisis de imagen (media  $\pm$ SD).

Suelo	SCG (Mg ha <sup>-1</sup> )	Tiempo (días)	Diámetro mayor (mm)	Diámetro menor (mm)	Redondez	Poros (%)
Suelo de Vega	0	0	2.55 $\pm$ 0.814	1.75 $\pm$ 0.515	0.69 $\pm$ 0.132	2.29 $\pm$ 1.166
	0	60	2.37 $\pm$ 0.353	1.84 $\pm$ 0.256	0.78 $\pm$ 0.082	6.61 $\pm$ 0.931
	240	60	2.42 $\pm$ 0.315	1.99 $\pm$ 0.508	0.82 $\pm$ 0.115	10.33 $\pm$ 2.218
Suelo Rojo	0	0	2.66 $\pm$ 0.532	1.89 $\pm$ 0.271	0.71 $\pm$ 0.078	2.72 $\pm$ 1.047
	0	60	2.99 $\pm$ 0.551	2.26 $\pm$ 0.453	0.76 $\pm$ 0.099	7.45 $\pm$ 0.727
	240	60	2.45 $\pm$ 0.377	1.83 $\pm$ 0.330	0.75 $\pm$ 0.115	10.34 $\pm$ 2.114

SCG, posos de café. Estos valores corresponden a la media de las muestras con planta y sin planta. La diferencia de medias para los parámetros 'diámetro mayor', 'diámetro menor' y 'redondez' no fueron significativas, solo fueron significativas para el caso del parámetro 'porcentaje de poros' ( $p < 0.001$ ).

El estudio con SEM (**Figura 42**) también corrobora algunas de las evidencias anteriores. Se observa una relativa porosidad y cómo el agregado se va jerarquizando en este nivel de observación, en microped (del orden de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro) para la muestra 0  $\text{Mg ha}^{-1}$  SCG + 60 días + SP del suelo de Vega. Su espectro EDX es característico de partículas minerales, particularmente silicatos, carbonato cálcico, típicos de un Cambic Calcisol.



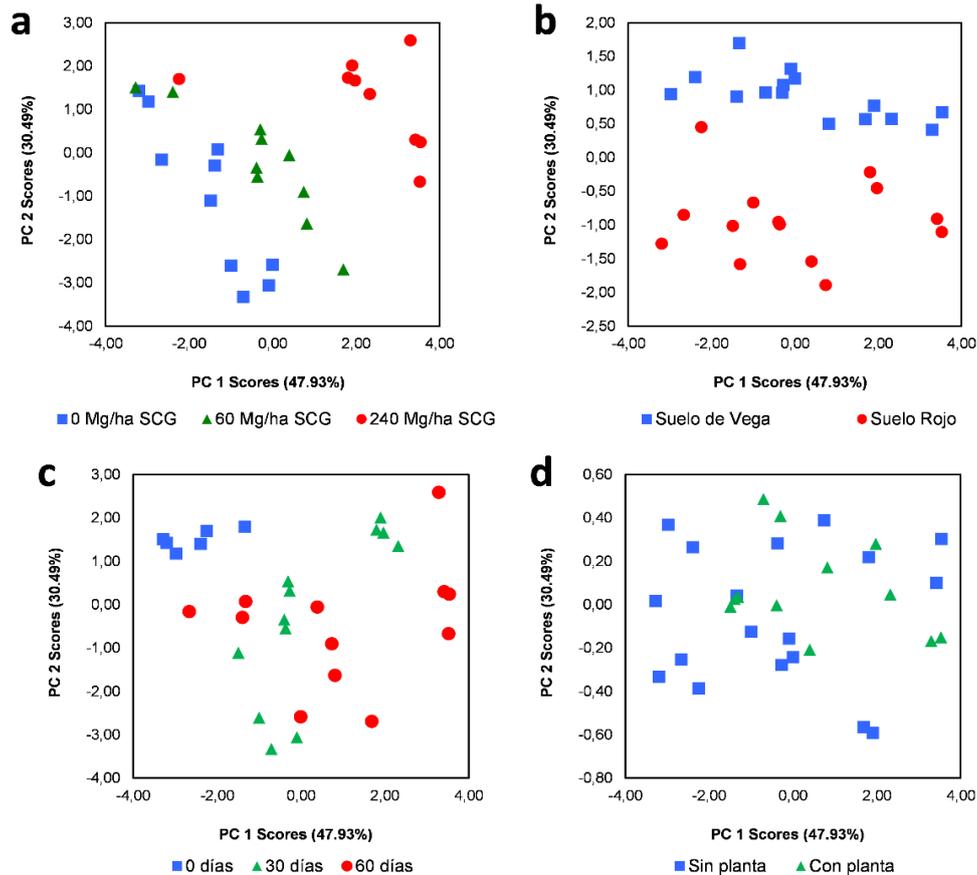
**Figura 42.** Imágenes SEM con electrones secundarios y espectros DRX (el asterisco blanco indica el sitio del microanálisis). a) ‘Suelo de Vega’ 0  $\text{Mg ha}^{-1}$  SCG + 60 días + sin planta. b) ‘Suelo de Vega’ 240  $\text{Mg ha}^{-1}$  SCG + 60 días + sin planta. Partícula de SCG unida a la la superficie del suelo y parcialmente cubierta de partículas inorgánicas. c) Partícula de SCG. d) ‘Suelo de Vega’ 240  $\text{Mg ha}^{-1}$  SCG + 60 días + sin planta. Se observan hifas de hongos (h) con conidióforos (c).

La **Figura 42b** muestra como la partícula de SCG es incorporada a la masa de suelo, con apariencia de recubrirse de partículas minerales. Interesante es destacar el aspecto vacuolar de los SCG (**Figura 42 b y c**) debido al proceso de tostado que genera cavidades en el interior del grano de café por el

desprendimiento de CO<sub>2</sub>, mientras que su cutícula se mantiene inalterada (Fadai et al., 2017). Muchas de las partículas de SCG incorporadas al suelo se encuentran colonizadas por hifas de hongos (**Figura 42d**).

#### **4.2.4. Influencia de las variables de ensayo: análisis de componentes principales**

Un PCA fue llevado a cabo para evaluar la influencia de las variables de ensayo sobre el sistema: ‘dosis de SCG’, ‘tipo de suelo’ y ‘planta’. Se extrajeron 3 componentes los cuales explicaron el 90.5% de la varianza del sistema (**Figura 43**). En la **Figura 43a** se muestran los valores de puntuación de las muestras en el espacio definido por el PC1 y el PC2. Las muestras con 240 Mg ha<sup>-1</sup> SCG están claramente diferenciadas de las muestras con 0 Mg ha<sup>-1</sup> y entre ellas se encuentran aquellas con 60 Mg ha<sup>-1</sup> SCG. En el espacio definido por PC1 y PC3 (**Figura 43b**), las muestras fueron claramente separadas por el tipo de suelo. Sin embargo, PC1 *versus* PC2 separó las muestras con respecto al tiempo de experimentación (**Figura 43c**), con una clara separación entre las muestras control y las muestras incubadas; no se observó discriminación entre las muestras correspondientes a los 30 y 60 días. La variable planta no discriminó entre muestras (**Figura 43d**). En conclusión, se observaron grupos claramente diferenciados con respecto a la dosis de SCG, el tipo de suelo y el tiempo de experimentación. En la bibliografía referente a otras enmiendas orgánicas, la dosis de residuo (p. ej. Omondi et al., 2016) y el tiempo de incubación (p.ej. Diacono y Montemurro, 2009) fueron las variables que presentaron una mayor influencia sobre el resultado final.



**Figura 43.** Diagrama de dispersión del análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de suelo. PC1 + PC2 + PC3 capturan el 90.5% de la varianza (suma de las puntuaciones. a) PC2 *versus* PC1: separación por ‘dosis de SCG’. b) PC2 *versus* PC1: separación por ‘tiempo de experimentación’. c) PC3 *versus* PC1: separación por ‘tipo de suelo’. d) PC2 *versus* PC1: separación por ‘presencia o no de planta’.

#### 4.2.5. Comparación de los efectos de los SCG con los de otras enmiendas orgánicas reportadas en la bibliografía

Hasta la fecha hay pocos estudios específicos sobre la influencia de los SCG sobre las propiedades físicas del suelo, pero sí los hay (en mayor cantidad) para otras enmiendas orgánicas. Para comparar los resultados obtenidos del presente estudio con los de la bibliografía, la ‘ratio respuesta’ (RR) fue estimada utilizando la siguiente fórmula (Omondi et al., 2016):  $RR = X_t / X_c$ ; siendo  $X_t$  la media del grupo tratado con enmienda orgánica y  $X_c$  la media para el grupo control para un experimento dado. Por tanto, la RR indica el incremento o la

disminución con respecto al nivel de referencia ( $RR = 1$ ). Para el presente ensayo, la media de la RR a 60 días fue calculada; la RR calculada para el presente ensayo y aquellas calculadas con los datos de la bibliografía se muestran en la **Tabla 13**.

La disminución de la DA debido a la adición de SCG y al tiempo de experimentación (**Tabla 10**) fue corroborada con los datos de la RR (**Tabla 13**). Esta disminución coincide con trabajos previos para otras enmiendas orgánicas. Las RR calculadas con los datos de estos autores están entre 0.96 y 0.85 (**Tabla 13**). Resultados similares se obtuvieron en el presente ensayo con tiempos de experimentación más cortos, pero con una dosis más alta de residuo; por tanto, es erróneo establecer que los SCG son mejores que otras enmiendas orgánicas en los que se refiere a la disminución de la DA. En otros trabajos, la DA se atribuye directamente a un incremento de la materia orgánica en el suelo (Aranyos et al., 2016; Khaliq y Abassi, 2015) lo que incrementa a su vez la porosidad de acuerdo con lo establecido por Moreno et al. (2016). El aumento de la porosidad, en nuestro caso, se ha comprobado con la observación en lupa binocular (**Figura 41**), pero no puede ser atribuido exclusivamente al incremento de CO por adición de SCG (**Tabla 10**), sino también al tiempo (**Figura 41b**). El efecto del tiempo puede ser atribuido a las oscilaciones de humedad que tienen lugar durante el ensayo y también a la actividad biológica (Bronick y Lal, 2005). Los cambios de humedad, de acuerdo con estos autores, tienen un efecto en el incremento de la porosidad del suelo y también en la incorporación de materiales orgánicos particulados (como los SCG, **Figura 41c**) dentro de los agregados.

El aumento de la  $W_{33}$  y  $W_{1500}$  con la adición de SCG y el tiempo (**Tabla 10**) se refleja en RR mayores de 1 (**Tabla 13**). Pero de acuerdo con los valores de RR, el aumento relativo de  $W_{1500}$  es mayor que el correspondiente a  $W_{33}$ . Las RR para ambos potenciales, calculadas con los datos de Carter (2007) son muy parecidos entre sí (**Tabla 13**), lo que difiere de nuestros resultados. Por el

**Tabla 13.** Ratio respuesta para los posos de café y otras enmiendas orgánicas.

Propiedad	Ratio Respuesta	Referencia
DA	<1	Omondi et al. (2016) <sup>a</sup>
	0.96	Aranyos et al. (2016) <sup>b</sup>
	0.95	Moreno et al. (2016) <sup>c</sup>
	<b>0.94</b>	Datos propios <sup>d</sup>
	0.92	Carter (2007) <sup>e</sup>
	0.90	Khaliq and Kaleem Abassi (2015) <sup>f</sup>
	<b>0.90</b>	Datos propios <sup>g</sup>
	0.89	Forge et al. (2016) <sup>h</sup>
	0.88	Aranda et al. (2016) <sup>i</sup>
	0.85	Ferreira de Araújo et al (2016) <sup>j</sup>
W <sub>33</sub>	<b>1.37</b>	Datos propios <sup>g</sup>
	1.30	Aranda et al. (2016) <sup>i</sup>
	1.33	Turek et al. (2019) <sup>n</sup>
	1.17	Carter (2007) <sup>e</sup>
W <sub>1500</sub>	<b>1.08</b>	Datos propios <sup>d</sup>
	2.31	Aranda et al. (2016) <sup>i</sup>
	<b>2.19</b>	Datos propios <sup>g</sup>
	1.44	Forge et al. (2016) <sup>h</sup>
	<b>1.20</b>	Datos propios <sup>d</sup>
AU	1.11	Carter (2007) <sup>e</sup>
	0.96	Moreno et al. (2016) <sup>c</sup>
	>1	Omondi et al. (2016) <sup>a</sup>
	1.40	Turek et al. (2019) <sup>n</sup>
Tamaño de agregado (µm)	1.16	Moreno et al. (2016) <sup>c</sup>
	0.90	Forge et al. (2016) <sup>h</sup>
	<b>0.84</b>	Datos propios <sup>d</sup>
	<b>0.25</b>	Datos propios <sup>g</sup>
	>2000	7.14 Sall et al. (2016) <sup>k</sup>
	2000-250	0.61 Sall et al. (2016) <sup>k</sup>
	250-50	0.83 Sall et al. (2016) <sup>k</sup>
	<50	0.55 Sall et al. (2016) <sup>k</sup>
	>1000	<b>1.40</b> Datos propios <sup>d</sup>
	>1000	<b>1.33</b> Datos propios <sup>g</sup>
1000-250	<b>0.71</b> Datos propios <sup>d</sup>	
1000-250	<b>0.99</b> Datos propios <sup>g</sup>	
<250	<b>0.25</b> Datos propios <sup>d</sup>	
<250	<b>0.64</b> Datos propios <sup>g</sup>	
Agregados estables (us)	>1	Omondi et al. (2016) <sup>a</sup>
	1.91	Hernández et al. (2016) <sup>l</sup>
	1.62	Ferreira de Araújo et al. (2016) <sup>j</sup>
	1.38	Yazdanpanah et al. (2016) <sup>m</sup>
	1.26	Khaliq and Kaleem Abassi (2015) <sup>f</sup>
	1.07	Carter (2007) <sup>e</sup>
	1.06	Forge et al. (2016) <sup>h</sup>
Macroagregados estables	<b>1.40</b>	Datos propios <sup>d</sup>
	<b>1.70</b>	Datos propios <sup>g</sup>
Mesoagregados estables	<b>1.43</b>	Datos propios <sup>d</sup>
	<b>1.66</b>	Datos propios <sup>g</sup>

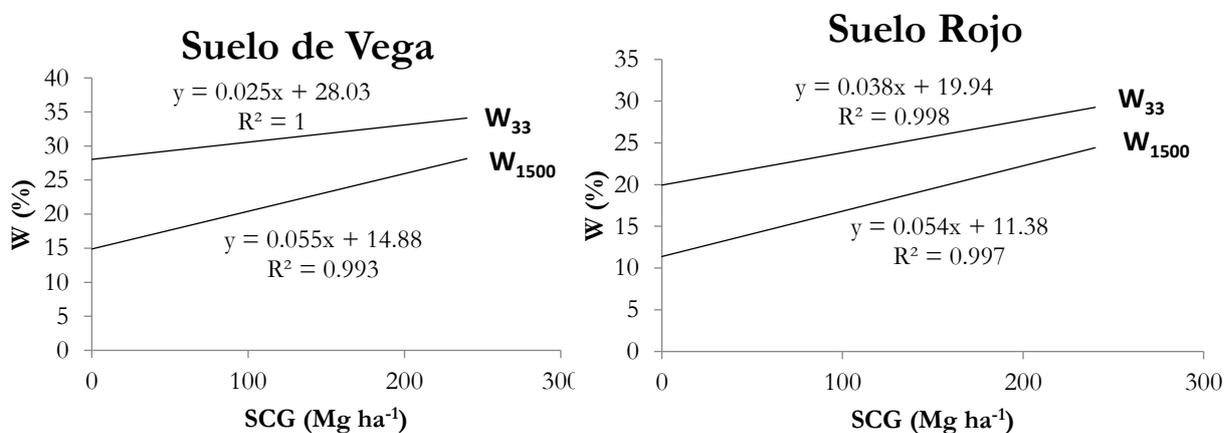
<sup>a</sup>Biochar (a diferentes temperaturas y tamaño de partícula) (20-80 Mg/ha); <sup>b</sup>Compost de lodos de depuradora (27 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 1-4 años en un Arenosol (Dystric Lamellic Arenosols); <sup>c</sup>Cáscara de aceituna compostada (30 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 5 años; <sup>d</sup>Posos de café(60 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 60 días (suelo de Vega y suelo Rojo); <sup>e</sup>Compost (patata, serrín, estiércol, en un ratio de volumen de 3:3:1) (13-17 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 12 años en un un suelo franco arenoso fino (OrthicHumo-Ferric Podzol); <sup>f</sup>Estiércol de ave y paja de trigo (11 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 3 años en un Humic Lithic Eutrudepts (Inceptosols); <sup>g</sup>Posos de café (240 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 60 días (Suelo de Vega y suelo Rojo); <sup>h</sup>Compost y estiércol de ave (290 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 1 año en un Orthic Humo-Ferric Podzol; <sup>i</sup>Co-Compost de alpeorujó (6-10 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 17 años en suelos calcáreos y silíceos; <sup>j</sup>Compost de lodo de curtiduría (20 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 6 años en un Neossolo Fluvico; <sup>k</sup>*Zea mays* y *Crotalaria retusa* (5 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 120 días en un suelo Deck-dior, arena fina, Haplic Ferric Lixisol mezclado; <sup>l</sup>Compost de residuos urbanos (450 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 5 años en un suelo semiárido degradado; <sup>m</sup>Compost de residuos municipales urbanos y residuo de alfalfa (30 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 2 años en un suelo arcilloso limoso y arenoso limoso; <sup>n</sup>Posos de café (663 Mg ha<sup>-1</sup>) durante 30 días en un Entisol. us, tamaño inespecifico; SCG, posos de café; DA, densidad aparente; W<sub>33</sub>, retención de agua a -33 kPa; W<sub>1500</sub>, retención de agua a -1500 kPa.

contrario, los resultados de Aranda et al. (2016) son similares a los nuestros en cuanto al incremento relativo entre ambos potenciales (mayores en el caso del  $W_{1500}$ ). Turek et al. (2019) encontraron un aumento progresivo de la  $W_{33}$  con la adición progresiva de SCG, obteniendo una RR de 1.33 al adicionar  $663 \text{ Mg ha}^{-1}$  de SCG. Se puede afirmar que el tipo de residuo tiene influencia sobre los incrementos relativos de la retención de agua a distintos potenciales y que en general, los SCG, con respecto a otras enmiendas orgánicas, incrementan más la retención de agua a  $W_{1500}$ .

El AU muestra RR menores de 1 (**Tabla 13**) ya que, como vimos anteriormente, la adición de SCG conduce a una disminución del AU, como se aprecia en la **Figura 44** (la distancia entre las rectas representadas equivale al AU), hecho que coincide con los resultados de Forge et al. (2016) y Aranda et al. (2016) (**Tabla 13**). El último autor lo atribuye a la hidrofobicidad de la enmienda empleada (co-compost de alpeorujó). Sin embargo, Turek et al. (2019) encontró resultados contrarios al adicionar SCG en cantidades de  $663 \text{ Mg ha}^{-1}$  a un Entisol, obteniendo una RR de 1.40. Estos resultados se podrían explicar debido a que estos autores utilizan ecuaciones de pedotransferencia para calcular los parámetros relacionados con la retención de agua. Carter (2007) también incluye en su trabajo una gráfica similar a la **Figura 44**, en la que las dos rectas correspondientes a ambos potenciales son casi paralelas, por lo que no encuentra una disminución en el AU. Por el contrario, Moreno et al. (2016) y Omondi et al. (2016) encuentran una  $RR > 1$  motivada por el incremento del AU con la adición de enmienda orgánica. Se puede afirmar, por tanto, que los efectos de las enmiendas orgánicas sobre el AU no dependen sólo del incremento de la materia orgánica, sino también de la naturaleza de dicha materia orgánica.

La adición de SCG y el tiempo de experimentación suponen un incremento del porcentaje de macroagregados y disminución del de meso y microagregados (**Tabla 10**), lo que también se refleja en las RR (**Tabla 13**). Esta

respuesta coincide con la encontrada por Sall et al. (2016), sin embargo, el efecto de los SCG sobre el tamaño de agregado fue menor. Así, las RR para los agregados de mayor tamaño ( $> 2000 \mu\text{m}$ ) reportados por Sall et al. (2016) fue de 7.14 y la RR para los macroagregados del presente ensayo fue de 1.40 (**Tabla 13**). El aumento en el tamaño de los agregados, según Bronick y Lal (2005), se produce de acuerdo con la *hierarchical theory of aggregation*: primero se forman los agregados pequeños y éstos se van uniendo entre sí para formar agregados de mayor tamaño. Esto coincide con lo observado en la **Figura 41c**, donde un agregado de casi 3 mm está formado por unión de agregados más pequeños ( $< 1\text{mm}$ ). Según Sall et al. (2016) y Esmaelnejad et al. (2016), la unión entre pequeños agregados para formar agregados de mayor tamaño se debe en parte a la actividad fúngica. Esto puede ser también considerado en nuestro ensayo una causa en la formación de macroagregados, ya que con la adición de SCG se observa una colonización del suelo por hifas de hongos (**Figura 42d**).



**Figura 5.** Retención de agua a capacidad de campo y punto de marchitamiento permanente versus dosis de SCG. La distancia vertical entre las dos líneas rectas es igual al AU. SCG, posos de café; W<sub>33</sub>, retención de agua a -33 kPa; W<sub>1500</sub>, retención de agua a -1500 kPa.

El aumento de la estabilidad estructural de los macro y mesoagregados con el tiempo de experimentación y también con la adición de SCG (**Tabla 10**),

se refleja en RRs mayores de 1 (**Tabla 13**). El aumento de la estabilidad estructural con la adición de enmiendas orgánicas está ampliamente descrito en la bibliografía (**Tabla 13**), aunque en estos trabajos no se diferencia por tamaño de agregados. El aumento de la estabilidad estructural de los macro y mesoagregados con el tiempo de experimentación y también con la adición de SCG (**Tabla 10**), se refleja en RRs mayores de 1 (**Tabla 13**). Las RR más altas se encuentran con adiciones altas de materia orgánica y tiempos de actuación prolongados. El efecto estabilizador de la estructura que supone la adición de SCG es rápido, ya que con tiempos muy cortos (60 días) se obtienen RR comparativamente altas con los de la bibliografía para tiempos de hasta 12 años con otros residuos (Carter, 2007). Forge et al. (2016) atribuyeron el aumento de la estabilidad estructural al desarrollo de las raíces estimulado por la enmienda orgánica. En nuestro caso, la estabilidad no se puede relacionar con las raíces ya que la presencia de planta no tiene un efecto significativo sobre las propiedades físicas en general y en particular sobre la estabilidad estructural. Según Yazdanpanah et al. (2016), los polisacáridos generados por los microorganismos actúan como *binding agents* e incrementan la estabilidad de los agregados. En este ensayo hemos encontrado un incremento de las hifas de hongos cuando se adiciona SCG (**Figura 42d**), lo que podría suponer un incremento de los *binding agents*. A este efecto de los polisacáridos debemos sumar las interacciones entre las partículas de SCG (materia orgánica particulada) y las partículas minerales del suelo observadas con estereomicroscopio y SEM (**Figura 41c** y **Figura 42b**), que según Bronick y Lal (2005) contribuyen a la estabilización de la estructura.

Los resultados de la adición de SCG y el tiempo de experimentación sobre las propiedades físicas tienen la misma tendencia en el suelo de Vega y el suelo Rojo, aunque se han encontrado diferencias significativas en las variables DA,  $W_{33}$ ,  $W_{1500}$  y AU (**Tabla 11**). Estas diferencias deberían atribuirse a que ambos suelos tienen propiedades químicas, fisicoquímicas y mineralógicas diferentes

(**Tabla 3**). Para comprender mejor la influencia de las propiedades del suelo en los efectos de los SCG como enmiendas orgánicas sería necesario realizar un experimento específico al respecto, empleando un mayor número de suelos con propiedades muy diversas.

Aunque en la bibliografía se indica que las raíces de las plantas tienen efectos positivos sobre la agregación del suelo (Bronick y Lal, 2005; Forge et al., 2016), en nuestro caso no se ha demostrado. La razón de ello puede ser que los efectos de los SCG tienen mayor peso y han enmascarado el correspondiente a las raíces.

#### **4.2.6. Consideraciones finales**

La adición de SCG tanto al suelo de Vega como al suelo Rojo tuvo un efecto positivo sobre todas las propiedades físicas excepto para el agua útil para las plantas: aumentó la retención agua a capacidad de campo y en el punto de marchitamiento permanente, también aumentó el porcentaje de macroagregados y la estabilidad estructural; mientras que simultáneamente disminuyó la densidad aparente, el contenido de agua disponible para las plantas y el porcentaje de meso y microagregados. Entre los efectos a corto plazo sobre las propiedades físicas del suelo, causados por la adición de SCG, destaca el aumento de la estabilidad estructural. Por otro lado, el efecto sobre las propiedades físicas fue incrementado tanto por la dosis de SCG como por el tiempo de experimentación. En cuanto al efecto del resto de variables de ensayo sobre las propiedades físicas, el tipo de suelo tuvo una influencia significativa en la intensidad de los efectos, mientras que la presencia de planta no influyó significativamente sobre ninguna propiedad física. Al comparar el efecto de los SCG con el de otras enmiendas orgánicas se observa como los SCG influyen de la misma manera que lo hace por ejemplo el compost, el estiércol, los desechos vegetales, etc.

Por lo tanto, el uso de SCG como enmienda orgánica es una posibilidad real para mejorar la calidad física de los suelos agrícolas Mediterráneos. Al mismo tiempo, debería ser posible reutilizar un residuo generado en cantidades importantes y contribuir a la mitigación del cambio climático mediante la incorporación de carbono en los suelos.

## **4.3. ENSAYO 3. EFECTOS SOBRE LA MICROBIOLOGÍA DEL SUELO**

### **4.3.1. Conocimiento previo**

Las causas naturales y antropogénicas de la disminución de la calidad del suelo incluyen el uso de la tierra, la sobreexplotación del suelo, la deforestación, los cambios climáticos y las fuertes lluvias. En consecuencia, los procesos de degradación del suelo como la acidificación o la salinización, la pérdida de la estructura del suelo o de materia orgánica, (Muñoz-Rojas et al. 2015), representan un serio desafío para la sostenibilidad ambiental y socioeconómica (Boardman, 2006).

La calidad del suelo se evalúa mediante la mejora global de parámetros químicos (carbono orgánico, pH, conductividad eléctrica, NPK disponible, capacidad de intercambio catiónico), físicos (estructura del suelo, agregados) y biológicos (comunidades microbianas) (Acevedo et al., 2005). Se han estudiado diferentes enmiendas orgánicas e inorgánicas para mejorar la calidad del suelo, como fertilizantes inorgánicos (Obi y Ebo, 1995), o biofertilizantes (bacterias fijadoras de N, solubilizadoras de P y K) que aumentan el rendimiento del cultivo (Jilani et al., 2007).

Los desechos de la agricultura y la ganadería también se han utilizado para mejorar la calidad del suelo: la adición de estiércol de cerdo y paja de arroz en suelos agrícolas (Hui et al., 2017); residuos de mijo y estiércol de ganado como fertilizante en suelos arenosos (Suzuki et al., 2017); abono de hongos, abono verde y estiércol de ganado y paja de arroz como enmiendas orgánicas en arrozales de baja productividad (Mi et al., 2016). El uso de los SCG como enmienda orgánica puede tener ventajas de "triple resultado", con beneficios sociales, ambientales/ecológicos y económicos. La adición de sustancias orgánicas e inorgánicas tiene un efecto directo sobre la abundancia, diversidad y metabolismo microbiano del suelo (Wang et al., 2013a); por lo tanto, la

observación microbiana podría usarse como un indicador de la calidad del suelo (Giacometti et al., 2013). Aunque los efectos de la adición de SCG en la microbiota del suelo no se han descrito previamente, existen varios estudios sobre el efecto fitotóxico de la suplementación con SCG en aguas/suelos contaminados con metales pesados (Kim et al., 2014) y en suelos de horticultura (Hardgrove y Livesley, 2016).

#### **4.3.2.Efectos fisicoquímicos de los SCG en el suelo.**

La evolución de los parámetros fisicoquímicos del suelo durante el tiempo de incubación, tras la adición de SCG se muestra en la **Tabla 14**. La media de los valores de pH para el suelo Rojo y Vega son 7.1 y 8.1, respectivamente, registrando los valores de pH más bajos en los suelos adicionados con 10% de SCG. Sin embargo, el pH del suelo a los 30 días aumentó en todas las macetas adicionadas de SCG en comparación con el pH a tiempo 0. Las concentraciones de CO, N, P, K y C/N fueron significativamente mayores en los suelos iniciales adicionados con SCG en comparación con las macetas control (sin adición de SCG). La adición de 10% de SCG aumentó el CO en el tiempo inicial en los suelos Vega y Rojo en un 341 y 417% respectivamente, y aumentó el N total en un 175% en ambos suelos. El N total no aumentó con el tiempo de incubación en los microcosmos adicionados de SCG. Los valores iniciales de C/N en los suelos con 10% de SCG aumentaron (9 unidades) en ambos suelos cuando se añadió 10% de SCG, sin embargo, disminuyeron levemente en el tiempo, debido a la mineralización de los SCG. También se observó un aumento de la concentración de macronutrientes disponibles (P y K) con la adición de SCG. El CaCO<sub>3</sub> eq. disminuyó significativamente después de la adición de SCG, debido a la ausencia de los mismos en el residuo (**Tabla 6**).

**Tabla 14.** Evolución de los parámetros fisicoquímicos tras la adición de SCG.

Suelo	Tiempo	% SCG	pH	CE <sub>25</sub> (dS/cm)	CO (%)	N total (%)	C/N	K asim (mg/Kg)	CaCO <sub>3</sub> eq. (%)	P asim. (mg/Kg)	Cu asim. (mg/Kg)	Zn asim. (mg/Kg)	Fe asim. (mg/Kg)	UFC ml <sup>-1</sup>	Ácido fenólico total (mg GAE/g)	
Rojo	0	0	7.2c	0.6a	1.16a	0.113a	10.0a	248a	1.6b	51.0a	3.78a	1.97a	4.27a	6.5x10 <sup>5</sup> a	0.341a	
		2.5	7.1b	0.6a	2.31b	0.148a	16.0b	324b	0.9a	55.0b	5.08b	2.60b	5.39b	6.5x10 <sup>5</sup> a	2.371b	
		10	6.5a	0.7b	6.61c	0.314b	21.0c	482c	0.8a	64.0c	6.74c	3.38c	6.46c	6.5x10 <sup>5</sup> a	6.309c	
	30	0	7.4b	0.6c	1.03a	0.087a	12.0a	249.8a	0.8a	36.2a	4.11a	2.12a	5.71a	7.3x10 <sup>6</sup> b	0.069a	
		2.5	7.4b	0.2a	2.48b	0.158b	15.9b	282.1b	1.1a	42.9b	4.81b	2.42b	6.58b	3.6x10 <sup>6</sup> a	0.157b	
		10	6.7a	0.3b	5.4c	0.274c	19.6c	404.8a	1.0a	45.9c	4.60ab	2.37b	7.92c	5.6x10 <sup>6</sup> ab	0.866c	
	60	0	7.5b	0.9b	1.19a	0.109a	11.0a	247.5a	0.8a	45.6a	4.48a	2.32a	5.63a	7.0x10 <sup>5</sup> a	<0.001a	
		2.5	7.5b	0.3a	2.08b	0.158b	13.7b	289.2b	0.7a	46.4a	4.30a	2.18a	6.86b	9.0x10 <sup>5</sup> a	<0.001a	
		10	6.7a	0.3a	5.54c	0.290c	19.1c	423.3c	1.2b	51.1b	4.71a	2.17a	8.53c	9.8x10 <sup>5</sup> b	0.921b	
	Vega	0	0	8.2c	1.3a	1.4a	0.105a	13.0a	453a	39.0c	69.0a	4.58a	0.89a	6.86c	1.2x10 <sup>6</sup> a	<0.001a
			2.5	7.9b	1.5b	2.96b	0.138b	21b	482b	37.6b	79.0b	4.95b	0.96b	6.15b	1.2x10 <sup>6</sup> a	1.049b
			10	7.6a	1.6c	3.6c	0.286c	13a	688c	35.5a	87.0c	5.47c	1.2c	3.46a	1.2x10 <sup>6</sup> a	4.121c
30		0	8.21b	0.9b	1.4a	0.094a	14.9a	447.2a	39.3a	45.6a	4.34a	0.82a	11.46b	1.5x10 <sup>6</sup> a	<0.001a	
		2.5	8.31b	0.6a	2.6b	0.139b	18.4b	511.9b	39.0a	50.4ab	4.29a	0.90a	10.54b	1.9x10 <sup>6</sup> a	<0.001a	
		10	8.0a	0.8b	5.7c	0.275c	21.0b	635.3c	38.0a	56.1b	4.40a	1.10b	8.41a	1.4x10 <sup>6</sup> a	0.419b	
60		0	8.2a	1.0b	1.4a	0.090a	15.7a	458.6a	40.2c	46.7a	3.71a	0.71a	6.72a	6.9x10 <sup>5</sup> a	<0.001a	
		2.5	8.4b	0.6a	2.4b	0.160b	14.9a	509.3b	38.3b	47.2a	4.24a	0.83a	7.91a	8.2x10 <sup>5</sup> a	<0.001a	
		10	8.1a	0.9b	5.5c	0.284c	19.6b	638.6c	36.0a	50.7a	4.23a	0.99b	7.02a	6.7x10 <sup>6</sup> b	<0.001a	

SCG, posos de café; CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C; CO, carbono orgánico; asim, asimilable; CaCO<sub>3</sub> eq., carbonato cálcico equivalente; nd, no detectado. UFC, unidad formadora de colonias.

Las concentraciones más altas de ácido fenólico total en los suelos iniciales se registraron en los microcosmos adicionados con 10% de SCG y las más bajas en los suelos con 0% de SCG, ya que los SCG contienen altas concentraciones de ácido fenólico (**Tabla 14**). La reducción de ácido fenólico a los 60 días de incubación fue del 99% y del 80% en el suelo de Vega y Rojo, respectivamente.

La dinámica de los parámetros fisicoquímicos durante el tiempo de cultivo describe los cambios producidos en el suelo debido a la adición de SCG. La diferencia en el aumento de pH en los microcosmos adicionados de SCG durante el tiempo de cultivo (**Tabla 14**) se atribuyó a la capacidad amortiguadora de los suelos, que fue mayor para el suelo Vega debido a la abundancia de carbonatos (Brady y Weil, 2002). Además, el aumento del pH con el tiempo estuvo de acuerdo con estudios previos donde el suelo fue adicionado de otras enmiendas orgánicas (Teutscherova et al., 2017).

También se detectó una disminución de P y K durante el tiempo de cultivo, y esto podría explicarse de diferentes formas. La disminución del P disponible podría deberse a la precipitación como fosfatos de calcio en suelos ricos en carbonatos, como el suelo Vega, o podría formar complejos con el hierro libre (hidróxidos) en aquellos suelos ricos en óxidos de hierro (los suelos rojos son ricos en hematites; Navarro y Navarro, 2013). Cruz y Cordovil (2015) observaron el mismo efecto para los SCG, sin embargo, atribuyeron la inmovilización de P a los microorganismos del suelo. Una posible causa de la disminución de K podría ser la incorporación de este elemento en la interlámina de las illitas (filosilicatos derivados de la mica), provocando la reconstrucción de la illita a mica (Calero et al., 2013). Las illitas son uno de los minerales arcillosos más comunes en los suelos Mediterráneos. Las concentraciones de ácido fenólico (**Tabla 14**) fueron consistentes con los estudios realizados por Cruz et al. (2015) y Baslam et al. (2013), que analizaron el efecto de la adición de SCG sobre el crecimiento de la lechuga.

### 4.3.3. Parámetros ecológicos: índices de riqueza y diversidad.

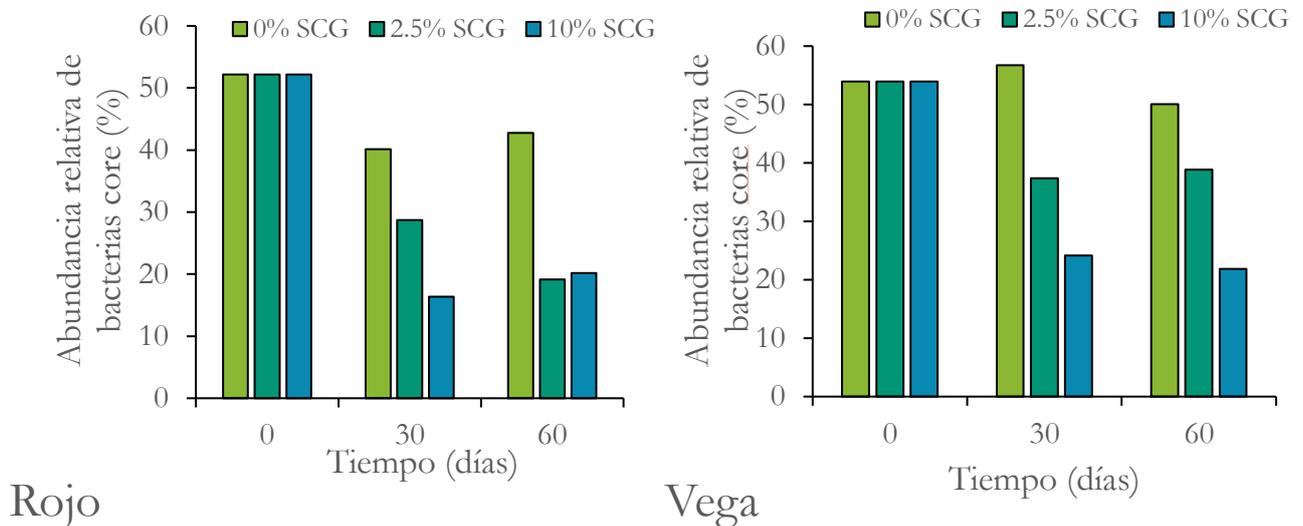
La estructura de la comunidad microbiana de cada suelo ilustrada por los índices de diversidad alfa se muestra en la **Tabla 15**. Se observaron correlaciones positivas entre el índice Chao-1 y el porcentaje de SCG en los suelos. Esta tendencia se observó en ambos suelos; sin embargo, los SCG aumentaron la riqueza de especies en mayor medida en el suelo de Vega que en el suelo Rojo. El índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ) nos proporciona una medida de la diversidad y fue sensible a la pérdida de especies raras.  $H'$  se expresó con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales se encuentra entre 0.5 y 5, aunque su rango normal se encuentra entre 2 y 3. En nuestro ensayo, los valores de  $H'$  variaron de 3.7 a 4.9 en el suelo Rojo y de 4.9 a 5.7 en el suelo Vega; por lo tanto, se observó una gran diversidad en ambos suelos, aunque se detectó la máxima diversidad en suelos adicionados con 2.5% de SCG.

**Tabla 15.** Diversidad comunitaria de los suelos adicionados con SCG. Índices ecológicos Chao-1, Shannon-Wiener ( $H'$ ), and Simpson (1-D).

Suelo	Tiempo de incubación	% SCG	Chao-1	Shannon_H	Simpson_1-D
ROJO	INICIAL		109.0	3.539	0.9271
	30	0	119.8	3.763	0.9527
		2.5	113.5	3.952	0.9687
		10	102.0	3.175	0.9015
		0	105.2	3.466	0.9187
	60	2.5	111.2	4.205	0.9795
		10	139.6	3.85	0.9598
	VEGA	INICIAL		145.0	4.009
30		0	152.1	3.984	0.9656
		2.5	214.7	4.312	0.9757
		10	229.6	4.253	0.9698
		0	152.8	4.103	0.9716
60		2.5	179.9	4.201	0.9743
		10	192.5	4.150	0.9675

Finalmente, el índice de Simpson midió la probabilidad que hay de que dos individuos tomados al azar del mismo sistema representen el mismo tipo, insensible a la pérdida de especies raras. Como tal, es una medida del dominio de las especies ( $D$ ) dentro de una muestra, donde un valor de  $D$  cercano a 1 indica el dominio de monocultivo. Nuestros datos mostraron que los valores del índice de Simpson ( $1-D$ ) estaban cerca de 1, que el dominio de monocultivo era bajo dentro de la comunidad y que las fluctuaciones tras la adición de SCG eran muy bajas. Esto último indica una estructura de comunidad microbiana estable para todas las macetas.

En ambos suelos, entre el 5–11% de la diversidad total en los niveles de género provino de microorganismos naturalmente presentes. La abundancia de los microorganismos naturalmente presentes variaba con el tiempo y el contenido de SCG de los suelos. Su abundancia relativa inicial fue de aproximadamente el 50%, que disminuyó con el aumento de SCG (**Figura 45**).



**Figura 6.** Abundancia relativa de microorganismos centrales. La correlación indirecta entre la abundancia de microorganismos centrales y el porcentaje de SCG se observa en ambos suelos.

Entre los parámetros biológicos analizados, se encontró que las variaciones en la diversidad microbiana del suelo son similares a los datos

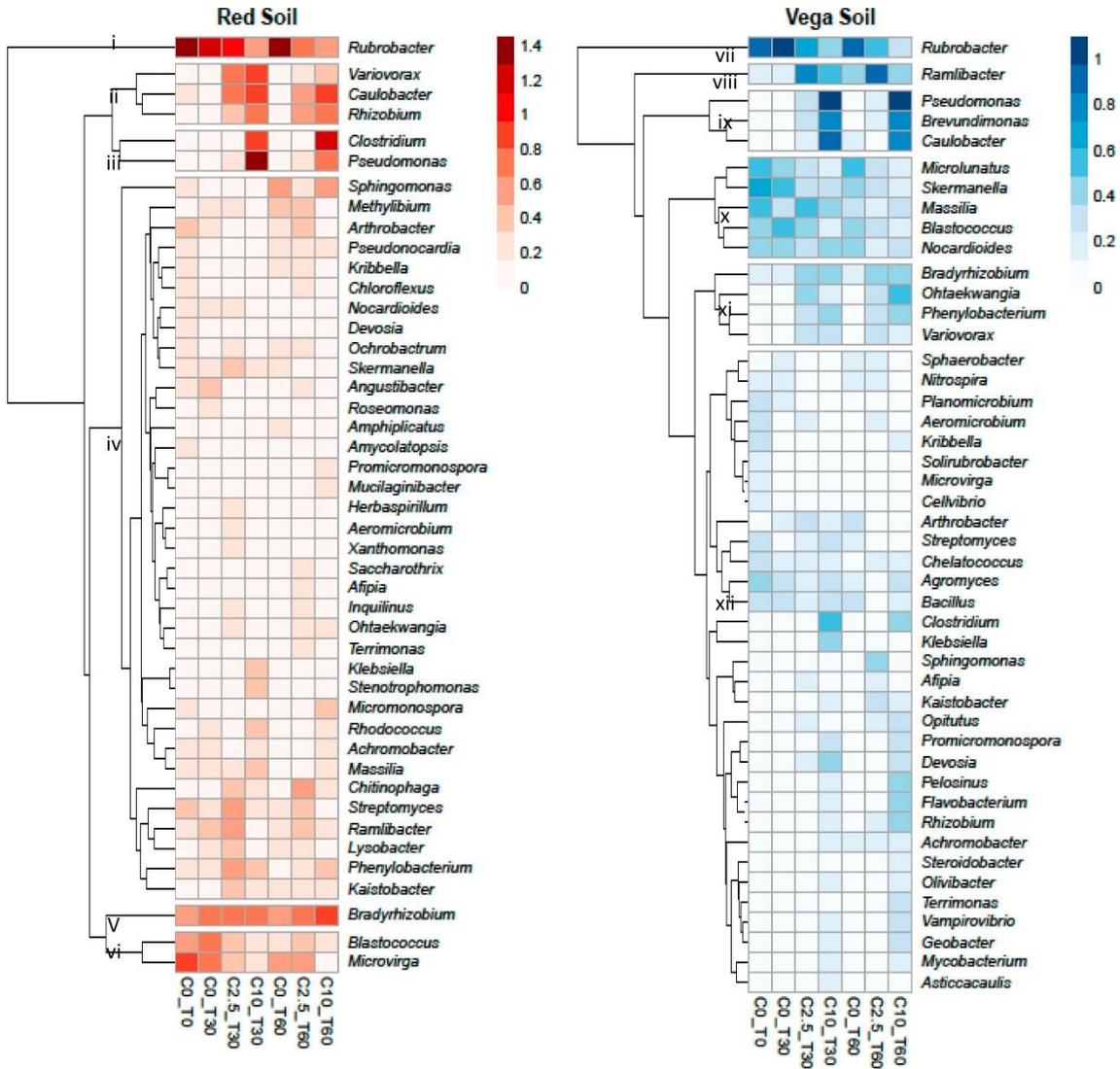
reportados en la bibliografía. Bastida et al. (2017) observaron que las enmiendas orgánicas como el lodo y el compost aumentaron el índice bacteriano de Shannon. Wu et al. (2014) también obtuvieron un aumento en este índice después de la adición de un compost de estiércol a un suelo agrícola. Los índices de Shannon y Simpson en nuestro estudio (**Tabla 15**) se encontraron dentro del rango más alto de aquellos encontrados para otras enmiendas de suelo, como el estiércol y el compost de paja y el compost de té (Vela-Cano et al., 2018). Por lo tanto, aunque no se realizó el compostaje de los SCG, este residuo pareció estar experimentando un proceso de degradación natural con el tiempo de incubación (**Tabla 14**). Los índices mostraron un aumento en la diversidad, riqueza y uniformidad de las estructuras de la comunidad bacteriana al aumentar el porcentaje de SCG, incluso para las concentraciones de SCG probadas como fitotóxicas.

#### **4.3.4. Variación de la estructura de la comunidad bacteriana con la adición de SCG**

Los perfiles de abundancia de los filos a lo largo del tiempo del experimento, y para diferentes porcentajes de SCG y distintos suelos no cambiaron en gran medida, probablemente como resultado de los tiempos de muestreo relativamente cortos. La observación de los datos de abundancia a nivel de género a lo largo del tiempo mostraron grandes cambios en la dinámica de las comunidades (**Figura 46**).

El género *Rubrobacter* termofílico y radiotolerante fue en general el género más abundante observado en ambos suelos; sin embargo, hubo una correlación negativa entre su abundancia relativa y el porcentaje de SCG (**Figura 46**). Este efecto también se observó para los grupos vi y x, p.ej. para el género *Blastococcus* en ambos suelos. Por el contrario, existen correlaciones positivas entre el

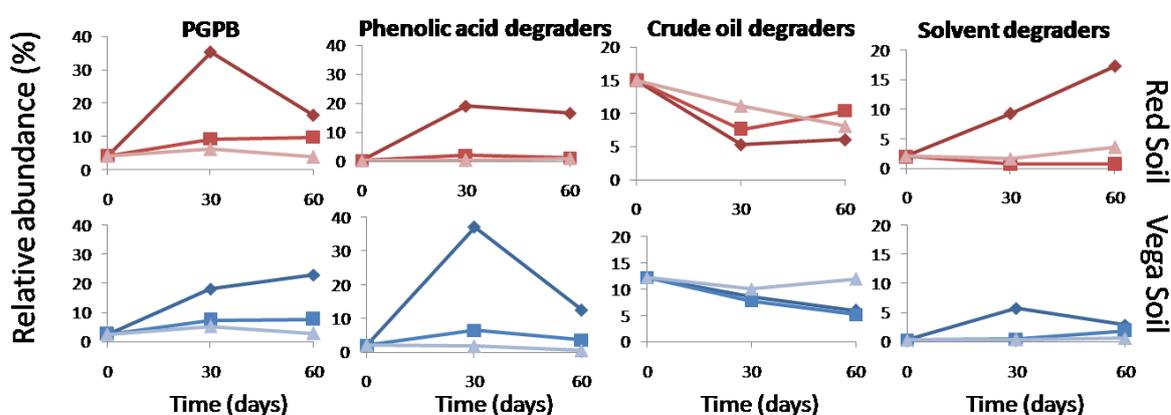
porcentaje de SCG y los datos de abundancia en los grupos de género ii, iii, ix y xi.



**Figura 46.** Análisis cluster de las bacterias en los suelos adicionados con SCG. Solo se incluyeron OTUs pertenecientes a géneros conocidos y una abundancia relativa de > 0.5% (en al menos 1 muestra). Los árboles fueron cortados en 6 grupos en filas. Dentro de cada muestra, la escala de colores indica el log<sub>10</sub> del% de abundancia relativa. Las columnas y las filas se agrupan utilizando la distancia euclidiana.

Entre los géneros compartidos por ambos suelos que se observó que aumentaban con el porcentaje de SCG se encuentran: *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Caulobacter*, *Variovorax*, *Rhizobium*, *Ohtaekwangia* y *Phenylobacterium*. A medida que

se incorporaron altas concentraciones de ácido fenólico en los suelos mediante la adición de SCG (**Tabla 14**), se examinó la dinámica de abundancia de bacterias que eran potenciales degradadoras de ácidos fenólicos (**Figura 47**). Los posibles degradadores de ácido fenólico incluían miembros de los géneros *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Rhodococcus*. En particular, sus abundancias relativas aumentaron a los 30 días, lo que coincidió con la mayor disminución en los niveles de ácido fenólico (**Tabla 14**).



**Figura 47.** Abundancia relativa de grupos funcionales potenciales. PGPB, bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Los géneros relevantes que pertenecen a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) también fueron rastreados para detectar comunidades agrícolas relevantes (**Figura 47**). Se observaron correlaciones directas entre el porcentaje de SCG y la abundancia de las PGPB. A los 30 días de incubación, ambos suelos mostraron un aumento en la abundancia relativa de las PGPB, y aunque se observaron cambios en las PGPB del suelo contradictorios a los 60 días de incubación, su abundancia relativa (> 10%) aún era alta. La mineralización de los SCG requiere de la transformación química de compuestos orgánicos, por lo tanto, también observamos la abundancia relativa de degradadores potenciales de petróleo

crudo y de degradadores potenciales de solventes. Entre estos dos grupos, solo los degradadores de solventes tuvieron un incremento significativo y constante en la abundancia en suelos adicionados de 10% de SCG.

La dinámica microbiana a nivel de filos mostró que las *Proteobacterias* y *Actinobacterias* fueron las más abundantes en todos los escenarios experimentales en el presente estudio, lo que coincide con lo observado en suelos agrícolas y no agrícolas (Ding et al., 2016; Tian et al., 2015). Nuestros datos no revelaron cambios significativos en la abundancia de filos entre tratamientos, lo que probablemente se debió al corto período de tiempo del experimento (Dolfing et al., 2004; Marschner et al., 2003); sin embargo, cuando las bacterias se clasificaron a nivel de género, se observaron dinámicas importantes con respecto al SCG y el tiempo.

Se observaron correlaciones positivas de degradadores de ácido fenólico conocidos (*Achromobacter*, *Caulobacter* y *Pseudomonas*) y se observó una reducción de ácido fenólico para ambos suelos (**Figura 47**). Otros géneros que presentaron una correlación similar fueron: *Olivibacter* (residuos alcalinos de almazaras; Ntougias et al., 2007); *Phenyllobacterium* (suelos aromáticos contaminados; Lingens et al., 1985), los cuales se saben que viven en ambientes con alto contenido de ácido fenólico; y *Geobacter*, cuyo genoma ha demostrado contener vías de degradación del fenol (Schleinitz et al., 2009). Las interacciones microbianas calculadas entre los últimos géneros fueron principalmente interacciones mutualistas y competitivas, con la excepción de *Phenyllobacterium*, que resultó tener un efecto de depredación. La abundancia de bacterias degradadoras del ácido fenólico (**Figura 47**) no solo se correlacionó positivamente con la reducción del ácido fenólico, sino también con la dosis de SCG. Por lo tanto, la disminución en la abundancia de bacterias degradadoras de fenoles podría ser indicativa de una disminución del ácido fenólico, con la inferencia de que estos suelos eran menos fitotóxicos a los 60 días de incubación.

En el suelo Rojo, la abundancia de bacterias degradadoras de solventes (**Figura 47**) en el caso de muestras adicionadas de 10% de SCG aumentó continuamente hasta los 60 días de incubación, y la eficiencia de eliminación de ácido fenólico fue inferior que en el suelo de Vega; por lo tanto, la acumulación de metabolitos podría ser la razón de este aumento constante. Por lo tanto, la degradación completa del ácido fenólico en los suelos rojos podría conllevar más de 60 días.

Las PGPB mineralizan activamente la materia orgánica, participan en los procesos de nitrógeno y la adquisición de nutrientes, y también promueven el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos como las fitohormonas o la mayor disponibilidad de nitrógeno por la fijación del mismo. Los mecanismos de defensa de la planta también son realizados por algunas PGPB a través del antagonismo microbiano. La abundancia de PGPB aumentó al aumentar la dosis de SCG, y supuso aproximadamente el 20% de la microbiota total a los 60 días de incubación. Este aumento no fue acompañado por un aumento del contenido del N total durante el tiempo de incubación. Las bacterias fijadoras de nitrógeno no se encontraron entre los PGPB detectadas en nuestro estudio; por lo tanto, la adición de SCG no resultó en un aumento del N total. Una abundancia de PGPB > 20% podría ser indicativa de condiciones óptimas de plantación después de la enmienda SCG; sin embargo, no es un indicador microbiano de la concentración total de N en el suelo y se requieren más estudios para definir dicha medida.

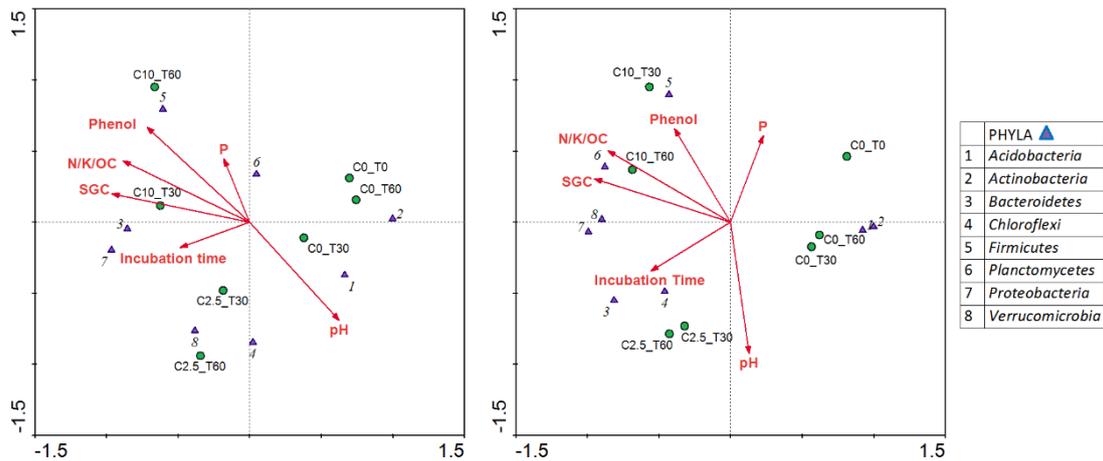
Schlöter et al. (2018) incluyeron en su descripción de los bioindicadores del suelo la necesidad de definir grupos microbianos beneficiosos y sus características mediante el uso de varios criterios, como su presencia universal, su contribución de funciones a los ciclos geoquímicos vinculados al crecimiento de las plantas, y para reportar sobre las perturbaciones del suelo que podrían causar su deterioro o daño. En consecuencia, una limitación en el uso de degradadores de ácido fenólico o las PGPB como indicadores microbianos para

la mejora del suelo adicionado con SCG, es que su funcionalidad depende de la dinámica de la población y no de un recuento absoluto. Además, cada tipo de suelo ensayado asimiló los SCG a diferentes velocidades, p.ej. el suelo de Vega asimila los SCG mediante la eliminación de ácidos fenólicos mejor que el suelo Rojo.

La abundancia relativa de los microorganismos normalmente presentes se estabilizó durante el período de 30 a 60 días, después de experimentar una disminución rápida. Esto plantea la pregunta de si los altos niveles de estos microorganismos son un indicador de la mala calidad del suelo. Entre los microorganismos normalmente presentes se encuentra el *Rubrobacter* termofílico y radiotolerante. Su correlación negativa con la dosis de SCG sugirió que esta enmienda podría tener un ligero efecto tóxico en la bacteria (**Figura 46**); sin embargo, sus números decrecientes también podrían explicarse por la competencia resultante del aumento en la abundancia de otras bacterias.

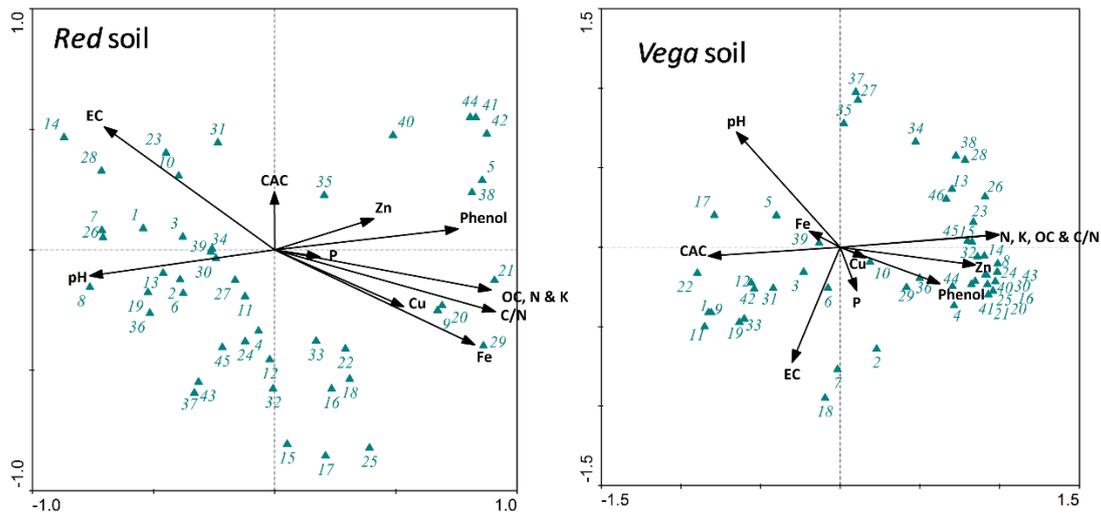
#### **4.3.5. Análisis de redundancia de las variables ambientales y estructura comunitaria bacteriana.**

El análisis de redundancia (Redundancy Analysis, RDA) que muestra correlaciones entre los factores fisicoquímicos y biológicos, se realizaron en filos (**Figura 48**) y géneros. El RDA basado en datos de abundancia de los filos mostró que las muestras se agruparon por el porcentaje de SCG en ambos suelos. Se observaron similitudes entre los dos suelos, con concentraciones de ácido fenólico correlacionadas positivamente con *Firmicutes*, *Planctomycetes* y *Proteobacteria*, mientras que *Acidobacteria*, *Actinobacteria* y *Chloroflexi* se correlacionaron con el pH.



**Figura 48.** Inferencia de correlaciones bio y fisicoquímicas entre comunidades enteras en suelos de Vega (izquierda) y Rojo (derecha) usando parcelas de análisis de redundancia multivariante. Las muestras están representadas por círculos, los parámetros ambientales por flechas y los filos están representados por triángulos. Se realizaron un total de 499 simulaciones de Monte-Carlo sin restricciones.

La **Figura 49** muestra correlaciones entre las concentraciones de ácido fenólico y los géneros; Las bacterias que se correlacionaron más fuertemente fueron *Rhodococcus*, *Variovorax* y *Caulobacter* en suelo Rojo. Además, se observaron correlaciones de género con el N total con *Promicromonospora*, *Clostridium*, *Rhizobium* y *Caulobacter* en el suelo Rojo. En el suelo de Vega, las concentraciones de ácido fenólico se correlacionaron con el nitrógeno total y, a su vez, con una gran cantidad de géneros, que incluyen: *Achromobacter*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Geobacter*, *Pelosinus*, *Chlostridium*, *Caulobacter*, *Olivibacter*, *Devosia*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Promicromonospora*, *Vamprovibrio*, *Flavobacterium*, *Obtaekwangia*, *Bradyrhizobium*, *Castiobacter*, *Opitutus*, *Asticcacaulis*, *Steroidobacter*, *Phenylbacterium*, *Terrimonas* y *Rhizobium*.



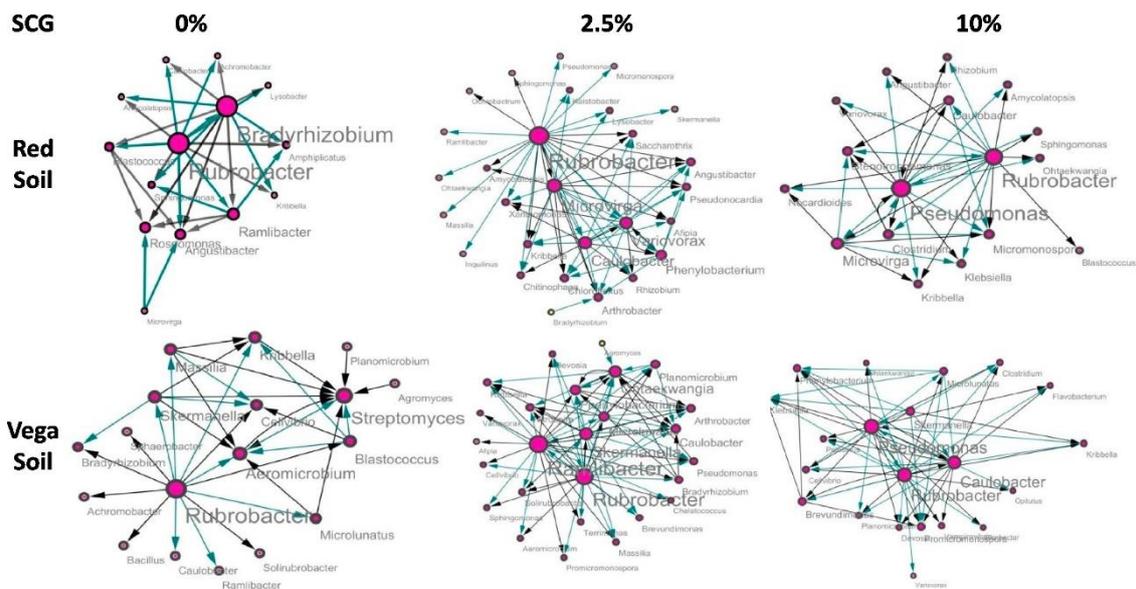
Species	Red	Species	Red
1	Blastococcus	24	Afipia
2	Angustibacter	25	Bradyrhizobium
3	Arthrobacter	26	Ochrobactrum
4	Micromonospora	27	Devosia
5	Rhodococcus	28	Microvirga
6	Aeromicrobium	29	Rhizobium
7	Kribbella	30	Roseomonas
8	Nocardioides	31	Skermanella
9	Promicromonospora	32	Inquilinus
10	Amycolatopsis	33	Kaistobacter
11	Pseudonocardia	34	Sphingomonas
12	Saccharothrix	35	Achromobacter
13	Streptomyces	36	Methylibium
14	Rubrobacter	37	Ramlibacter
15	Ohtaekwangia	38	Variovorax
16	Chitinophaga	39	Herbaspirillum
17	Terrimonas	40	Massilia
18	Mucilagibacter	41	Klebsiella
19	Chloroflexus	42	Pseudomonas
20	Clostridium	43	Lysobacter
21	Caulobacter	44	Stenotrophomonas
22	Phenylobacterium	45	Xanthomonas
23	Amphiplicatus		

Species	Vega	Species	Vega
1	Blastococcus	24	Brevundimonas
2	Agromyces	25	Caulobacter
3	Arthrobacter	26	Phenylobacterium
4	Mycobacterium	27	Afipia
5	Aeromicrobium	28	Bradyrhizobium
6	Kribbella	29	Chelatococcus
7	Nocardioides	30	Devosia
8	Promicromonospora	31	Microvirga
9	Microlunatus	32	Rhizobium
10	Streptomyces	33	Skermanella
11	Rubrobacter	34	Kaistobacter
12	Solirubrobacter	35	Sphingomonas
13	Ohtaekwangia	36	Achromobacter
14	Flavobacterium	37	Ramlibacter
15	Terrimonas	38	Variovorax
16	Olivibacter	39	Massilia
17	Sphaerobacter	40	Vampirovibrio
18	Bacillus	41	Geobacter
19	Planomicrobium	42	Cellvibrio
20	Clostridium	43	Pseudomonas
21	Pelosinus	44	Klebsiella
22	Nitrospira	45	Steroidobacter
23	Asticcacaulis	46	Opiritutus

**Figura 49.** Inferencia de correlaciones bio y fisicoquímicas entre comunidades enteras en suelos Vega y Red usando parcelas de análisis de redundancia multivariante. Los parámetros ambientales mediante flechas y el género se representan mediante triángulos. Se realizaron un total de 499 simulaciones de Montecarlo sin restricciones. Varianza porcentual acumulada: suelo rojo (eje x = 69,7%, eje y = 88,8%); Suelo Vega (x = 75,4%, eje y = 92,9%).

El alto número de correlaciones microbianas con los ácidos fenólicos y el N total en el suelo de Vega requirió de un estudio más profundo; por lo tanto, las interacciones microbianas entre géneros se integraron en redes de consenso (**Figura 50**). Se observaron interacciones microbianas de consenso a lo largo del tiempo para los suelos Rojo y Vega (**Figura 50**). La comparación de las redes del suelo se realizó con Cytoscape (**Tabla 16**). Los coeficientes de agrupación para estas redes no se correlacionaron con el porcentaje de SCG. Este fue también el caso para el número promedio de bacterias vecinas; sin embargo, estaba claro que la mayor conectividad entre vecinos se observó con suelos adicionados con 2.5% de SCG. Además, el número promedio de microorganismos vecinos de microorganismos clave (nodos / etiquetas más grandes) aumentó para los suelos adicionados con SCG en comparación con los suelos control. Los números de interacción dentro de cada red de consenso también fueron similares entre estos 2 suelos en comparación con sus respectivas muestras control.

A través de los suelos, los microorganismos claves de interacción microbiana fue *Rubrobacter* y *Pseudomonas* también estuvo altamente correlacionado con los suelos adicionados de 10% de SCG. Otros géneros bacterianos altamente asociados incluyeron *Bradyrhizobium* y *Microvirga* para el suelo Rojo, y *Streptomyces* y *Ramlibacter* para el suelo de Vega. *Caulobacter* también estuvo altamente conectado a todas las redes de suelo adicionado con SCG. Los géneros *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Caulobacter* y *Rhodococcus* descritos en la literatura como degradadores de fenol, compartieron interacciones negativas. Es probable que fueran interacciones de mutualismo o competencia, aunque se calcularon fuertes efectos de depredación con *Achromobacter* (datos obtenidos con MetaMIS).



**Figura 50.** Redes de consenso de interacción microbiana. Aunque ambos suelos tienen aproximadamente el mismo número de interacciones, el suelo Vega (B) tiene más interacciones negativas que en el suelo Rojo (A), donde las relaciones positivas a negativas son alrededor de 50:50. Interacciones microbianas positivas (rojo) e interacciones negativas (azul). Las redes de consenso para ambos suelos fueron dibujadas en una  $P$  (pares concordantes)  $> 0.85$ .

**Tabla 16.** Análisis de redes microbianas de los suelos adicionados con SCG.

	SCG %	Coefficiente de agrupamiento	Número medio de bacterias vecinas
<i>Suelo Rojo</i>	0	0.355	4.429
	2.5	0.271	4.857
	10	0.653	4.588
<i>Suelo de Vega</i>	0	0.183	3.778
	2.5	0.595	6.308
	10	0.567	6.000

Entre las PGPB descritas en la literatura se encuentran *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Nitrospira* y *Streptomyces*. Sus interacciones microbianas modeladas mostraron que se produjeron principalmente interacciones de mutualismo o competencia, aunque se calculó la depredación para *Bradyrhizobium* y *Streptomyces* en el suelo Rojo adicionado con 10% de SCG y en el suelo de Vega adicionado con 2.5 y 10% de SCG. Otras interacciones de depredación calculadas fueron las siguientes: *Massilia* en mezclas SCG-Rojo; *Nocardiodes* en el suelo Rojo adicionado con 2.5 y 10% de SCG; *Phenyllobacterium* en el suelo Rojo adicionado de 10% de SCG; y *Achromobacter* y *Micromonospora* en suelos rojos adicionados de 2.5% de SCG. *Afibia* fue el único género (suelo rojo con 2.5% de SCG) que tuvo un rasgo de comensalismo/amensalismo calculado.

Las diferencias en las redes de interacción microbiana encontradas entre la dosis 0 y 10% de SCG reflejan los complejos cambios microbianos que ocurren debido a cambios en los parámetros fisicoquímicos y de nutrientes. Ambos suelos estaban muy agrupados (coeficiente de agrupación > 0.5) en las redes del suelo adicionado con 10% de SCG como resultado del aumento de las interacciones microbianas en comparación con las redes del suelo sin adición de SCG (**Tabla 16, Figura 50**). Se podría realizar un análisis adicional de la red microbiana para estudiar los efectos entre la dinámica de conectividad de la red microbiana y la recuperación del suelo.

#### **4.3.6. Consideraciones finales**

En general, el uso de SCG como biofertilizante es una excelente solución sostenible. La adición de SCG no solo aumenta el valor de los nutrientes, sino que también mejora los PGPB, que son conocidas por ayudar al crecimiento de las plantas. Se necesita más trabajo para definir los tiempos de siembra y plantación después de la degradación de los SCG en los suelos; sin embargo,

nuestro estudio indica que para una incorporación máxima de nutrientes y concentraciones reducidas de ácido fenólico y sus metabolitos tóxicos probables, un buen punto de partida es más de 30 días para el suelo Vega y más de 60 días para el suelo Rojo, después de la adición de 10% de SCG. Además, la presencia de redes microbianas más complejas con un aumento de la dosis de SCG podría sugerir un suelo más activo.

## **4.4. ENSAYO 4. EFECTOS SOBRE LA HIDROFOBICIDAD Y LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO. RELACIÓN CON LA CALIDAD DEL SUELO**

### **4.4.1. Conocimiento previo**

Ante el alarmante deterioro de la calidad de los suelos agrícolas en el área Mediterránea (Rodríguez-Entrena et al., 2014), uno de los principales objetivos de la agricultura de conservación es el aumento de la materia orgánica del suelo, la cual mejora las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo. Por lo tanto, es necesario estudiar en profundidad el uso de residuos biológicos, frescos o transformados, como enmiendas orgánicas y sus efectos en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y en general sobre su calidad. La capacidad de retención de agua y sus propiedades relacionadas, el tipo estructural y la estabilidad de los agregados, la conductividad hidráulica, la densidad aparente, la materia orgánica, la CIC, el pH y la CE pueden utilizarse para evaluar la calidad del suelo como atributos clave (Arshad y Coen, 1992). Los parámetros biológicos del suelo han demostrado ser especialmente útiles para detectar pequeños cambios en las condiciones del suelo, proporcionando así información sobre alteraciones sutiles en la calidad del suelo (García-Ruiz et al., 2008).

Las enmiendas orgánicas frescas o poco transformadas, como los SCG o subproductos compostados inadecuadamente, presentan inconvenientes como, por ejemplo, su contenido en una materia orgánica más lábil y menos estable, o su repelencia al agua o hidrofobicidad (Comino et al., 2017). La hidrofobicidad del suelo es generada por la acumulación de compuestos hidrofóbicos, originados por la vegetación (de Blas et al., 2010) o por los microorganismos (Schaumann et al., 2007) o producidos por la descomposición de materia orgánica fresca con un bajo grado de alteración y/o humificación. Esta hidrofobicidad podría tener un impacto negativo en el régimen del agua

del suelo, en la capacidad de infiltración (Mohawesh et al., 2014), en la conductividad hidráulica o la disponibilidad de agua para las plantas (Doerr y Thomas, 2000). Además, algunos autores han reportado que la hidrofobicidad reduce la accesibilidad de los microorganismos a la materia orgánica, disminuyendo su tasa de descomposición, debido a la falta de agua que restringe sus condiciones de vida favorables. Al mismo tiempo, la hidrofobicidad incrementa la estabilidad de los agregados del suelo y consecuentemente contribuye a la oclusión de la materia orgánica como un mecanismo de estabilización (Lützow et al., 2006). En este sentido, es común encontrar suelos con una hidrofobicidad moderada y, por otro lado, ha empezado a reconocerse su influencia positiva sobre la calidad y la estructura del suelo (Aranda et al., 2016; Goebel et al., 2005; Mataiz-Solera et al., 2011). Estos aspectos son esenciales en relación a la conservación de la materia orgánica en el suelo y a la extensión del concepto del suelo como sumidero de carbono. Más datos empíricos sobre los efectos en suelo y sus propiedades son necesarios y es importante evaluar adecuadamente la hidrofobicidad, especialmente en suelos agrícolas. Algunos autores han sugerido que la hidrofobicidad debería de ser incluida como indicador de la calidad física del suelo debido a su relación con otras propiedades del suelo y su fácil determinación (Jordan et al., 2013).

Existen varias formas de determinar la hidrofobicidad: el método más usual es la WDPT, pero este método tiene algunas desventajas tales como que presenta una escala cuantitativa no lineal y el dilatado tiempo necesario para suelos repelentes (Chau et al., 2014). Otra medida ampliamente usada es el CA (Diehl y Scgaumann, 2007; Goebel et al., 2005) el cual muestra algo de significado físico y permite estudiar la repelencia del suelo al agua (Soil Water Repellency, SWR) en todo el rango del suelo (desde humectable hasta extremadamente repelente). Sin embargo, estos métodos estiman sólo la persistencia y la intensidad, entre las gotas de agua y la superficie del suelo, sin proporcionar una caracterización termodinámica integral de la superficie sólida.

Por lo tanto, sería recomendable una determinación completa de la SFE. El enfoque de Van Oss et al. (1988) para las interacciones ácido-base y las interacciones de Lifshitz-van der Waals pueden explicar las superficies minerales en términos de componentes ácido/base (el donador de electrones  $\gamma^-$  y el aceptor de electrones  $\gamma^+$ ), siendo el componente  $\gamma^-$  el que nos permite delimitar la hidrofobicidad del suelo. Muchos fenómenos que tienen lugar en la interfaz sólido-líquido, incluida la humectabilidad, la adsorción y la agregación, dependen en gran medida de los cambios involucrados en la SFE (van Oss, 1994).

#### **4.4.2. Efectos de las variables de ensayo sobre los indicadores de la calidad del suelo**

La **Tabla 17** muestra la influencia de la dosis de SCG, el tipo de suelo y el tiempo de incubación sobre la hidrofobicidad, los parámetros químicos, biológicos y físicos. La mayoría de las propiedades del suelo se vieron significativamente afectadas por la adición de SCG. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 0, 2.5 y 10% SCG en los parámetros de hidrofobicidad (por ejemplo: WDPT, CA en H<sub>2</sub>O y  $\gamma$ ), parámetros fisicoquímicos (por ejemplo: CO o TEC), parámetros biológicos (por ejemplo: RR y DHasa) y parámetros físicos (la mayoría de ellos excepto la porosidad total). Es importante resaltar que la adición de SCG es el único factor que afecta las propiedades relacionadas con la hidrofobicidad, mientras que el tipo de suelo y el tiempo de incubación no tienen un efecto significativo. Sin embargo, afectan a algunas propiedades: el tipo de suelo afecta la humectabilidad potencial de materia orgánica del suelo, la porosidad total,  $W_{33}$

**Tabla 17.** Valores medios de los indicadores de la calidad del suelo y componentes de energía libre superficial para el tipo de suelo y los distintos tratamientos. Test estadísticos para las diferencias entre medias; n=30.

Indicador	%SCG	Suelo	Días de incubación
	0/2.5/10	SV/SR	0/30/60
WDPT (s)	0.23/1.26/4.06***	1.72/1.98 n.s.	13.64/1.95/1.75*
logWDPT+1	0.28/1.04/1.59***	0.99/0.94 n.s.	1.46/0.99/0.95 n.s.
CA (H <sub>2</sub> O)	16.63/20.50/29.00**	21.50/22.58 n.s.	20.67/23.00/21.08 n.s.
CA (formamida)	12.75/16.88/22.25 n.s.	19.83/14.75 n.s.	12.50/20.42/14.17 n.s.
CA (diyodomethano)	22.38/22.63/35.50*	28.17/25.50 n.s.	37.17/24.00/29.67 n.s.
$\gamma^{LW}$ SFE (mJ m <sup>-2</sup> )	45.82/45.12/40.59**	43.15/44.53 n.s.	40.51/43.62/44.06 n.s.
$\gamma^+$ SFE (mJ m <sup>-2</sup> )	0.54/0.58/1.06*	0.65/0.80 n.s.	1.38/0.77/0.68*
$\gamma^-$ SFE (mJ m <sup>-2</sup> )	51.23/48.36/38.85***	46.27/46.03 n.s.	47.98/46.69/45.60 n.s.
Total SFE (mJ m <sup>-2</sup> )	56.1/55.6/53.4 n.s.	53.98/56.09 n.s.	56.21/55.05/55.02 n.s.
PWSOM	1.92/1.92/2.27 n.s.	2.73/1.34***	2.09/2.04/2.03 n.s.
CO (%)	1.37/2.43/5.17***	3.19/2.79 n.s.	3.33/3.01/2.97 n.s.
CIC (cmol <sub>+</sub> kg <sup>-1</sup> )	23.72/24.06/27.43 n.s.	27.81/22.33***	25.52/25.06/25.09 n.s.
HQI	17.46/9.95/5.33***	11.34/10.49 n.s.	11.24/10.97/10.85 n.s.
CaCO <sub>3</sub> eq. (%)	20.67/20.51/19.09 n.s.	39.12/1.07***	19.23/20.06/20.13 n.s.
TEC (mg C kg <sup>-1</sup> )	5038/8062/17611***	10180/10293 n.s.	11286/11248/9227 n.s.
AH/AF ratio	11.34/12.47/11.97 n.s.	12.91/10.93 n.s.	12.46/12.26/11.59 n.s.
HWSC (mg C kg <sup>-1</sup> )	198/581/1405***	698/758 n.s.	904/693/763 n.s.
A4/A6 ratio	4.29/4.63/4.74 n.s.	4.14/4.96***	4.54/4.54/4.57 n.s.
RR (mg CO <sub>2</sub> -C g <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	0.22/1.46/3.82***	1.52/1.54 n.s.	Not viable
GI (%)	102.62/98.46/86.16 n.s.	95.61/95.90 n.s.	100.03/95.24/96.26 n.s.
DHasa (µg TPF g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	26.00/49.01/33.33*	24.86/47.37***	23.88/34.09/38.13 n.s.
ASI	0.76/0.86/0.94***	0.87/0.84 n.s.	0.83/0.84/0.86 n.s.
Ks (cm h <sup>-1</sup> )	7.14/11.56/23.03***	14.73/13.09 n.s.	15.33/14.00/13.81 n.s.
DA (g cm <sup>-3</sup> )	0.97/0.93/0.90*	0.91/0.96**	1.10/0.94/0.93***
DR (g cm <sup>-3</sup> )	2.49/2.44/2.29***	2.39/2.42 n.s.	2.41/2.39/2.42 n.s.
Porosidad total (%)	60.98/61.86/60.56 n.s.	62.05/60.21*	54.40/60.51/61.76***
Macroporosidad(%)	35.52/35.71/28.30**	30.52/35.82**	27.30/32.83/33.52 n.s.
W <sub>33</sub> (%)	25.46/26.16/32.26**	31.53/24.39***	27.09/27.68/28.24 n.s.
W <sub>1500</sub> (%)	13.99/17.23/26.84***	21.10/17.60 n.s.	16.14/18.72/20.00 n.s.
AU (mm cm <sup>-1</sup> )	1.11/0.83/0.49***	0.95/0.66*	1.2/0.85/0.77*

SV: suelo de Vega; SR: suelo Rojo; WDPT: tiempo de penetración de la gota de agua; CA: ángulo de contacto (°); SFE: componente de energía libre superficial; PWSOM: humectabilidad potencial de la materia orgánica del suelo; CO: carbono orgánico; CIC: capacidad de intercambio catiónico; HQI: índice de calidad del humus (CEC/OC); CaCO<sub>3</sub> eq: carbonato cálcico equivalente; TEC: carbono total extraíble; AH: ácidos húmicos; AF: ácidos fúlvicos; HWSC: carbono soluble en agua caliente; relación A4/A6: 472nm/680nm UV-Vis spectra de los ácidos húmicos; RR: tasa de respiración; GI: índice de germinación; DHasa: actividad deshidrogenasa; ASI: índice de estabilidad estructural; Ks: conductividad hidráulica saturada; DA: densidad aparente; DR: densidad real; W<sub>33</sub>: retención de agua a -1500kPa; W<sub>1500</sub>: retención de agua a -1500kPa AWC: contenido de agua disponible. Significancia estadística: \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001; n.s.: no diferencias significativas.

y AU, así como la relación A4/A6, DHasa, DA y macroporosidad. Los días de incubación sólo muestran algunas diferencias significativas para WDTP,  $\gamma^+$ , DA, porosidad total y AU. Por tanto, todo parece indicar que el factor principal para este ensayo es la adición de SCG.

#### 4.4.3. Repelencia al agua del suelo e hidrofobicidad

La caracterización termodinámica de los suelos se realizó para estimar su grado de hidrofobicidad y medir sus propiedades de humectación y retención de agua. La **Tabla 18** muestra los ángulos de contacto avanzados obtenidos con agua, formamida y diyodometano de conocidos componentes de tensión superficial (van Oss, 1994), los componentes SFE,  $\gamma^{LW}$ ,  $\gamma^+$  y  $\gamma^-$  y la humectabilidad potencial de la materia orgánica del suelo. Las variables se agruparon de acuerdo con la dosis de SCG y el tipo de suelo, los dos factores que mostraron diferencias significativas en el análisis estadístico (**Tabla 17**).

Según el WDPT, los suelos originales son bastante humectables, con tiempos de penetración de  $<1$  s, y los SCG muy repelentes al agua (817 s). Este valor es más bajo que el encontrado por Comino et al. (2017) para los SCG (3180 s), pero ambos valores se consideran muy repelentes al agua (600-3600 s). Estas diferencias podrían atribuirse a las condiciones utilizadas para la preparación de café instantáneo (presión y temperatura). La adición de SCG parece afectar sólo al WDPT cuando se usó la dosis más alta de SCG (no significativamente en el suelo de Vega, **Tabla 18**), aumentando la hidrofobicidad del suelo (ligeramente repelente al agua: 5-60 s). Sin embargo, cuando los datos se normalizaron mediante la aplicación de logaritmos ( $\log\text{WDPT} + 1$ ), la adición de SCG afectó significativamente a esta variable.

En los SCG, se observó el valor más alto de CA para el agua, seguido de formamida y diyodometano (**Tabla 18**), debido al carácter hidrofóbico de los

**Tabla 18.** Parámetros de hidrofobicidad de las muestras de suelo y SCG. Medias  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). Diferencias significativas son indicadas por distintas letras ( $p < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc). Se muestra también el F ratio obtenido del ANOVA de dos vías ( $p < 0.001^{***}$ ;  $p < 0.01^{**}$ ;  $p < 0.05^*$ ).

Suelo	SCG %	WDPT (s)	logWDPT+1	CA (°)			Componentes de la SFE (mJ m <sup>-2</sup> )				PWSOM
				H <sub>2</sub> O	formamida	diyodometano	$\gamma^{LW}$	$\gamma^-$	$\gamma^+$	Total	
SR	0	0.3 $\pm$ 0.2 a	<1 a	17.8 $\pm$ 7 a	11.2 $\pm$ 5 a	19.8 $\pm$ 7 a	47.03 $\pm$ 1.02 c	51.70 $\pm$ 1.44 b	0.45 $\pm$ 0.14 a	56.41 $\pm$ 0.85 b	1.28 $\pm$ 0.05 a
SR	2.5	1 $\pm$ 0.6 a	1 b	21.4 $\pm$ 9 ab	15.8 $\pm$ 11 a	23.4 $\pm$ 10 ab	44.94 $\pm$ 2.28 bc	47.15 $\pm$ 5.46 b	0.67 $\pm$ 0.34 a	56.09 $\pm$ 1.55 b	1.24 $\pm$ 0.06 a
SR	10	14.9 $\pm$ 22.9 b	2 c	28 $\pm$ 6 c	15.2 $\pm$ 3 a	35.4 $\pm$ 10 ab	41.45 $\pm$ 3.92 ab	38.90 $\pm$ 3.15 a	1.28 $\pm$ 0.52 a	55.87 $\pm$ 1.43 b	1.51 $\pm$ 0.08 a
SV	0	0.3 $\pm$ 0.3 a	<1 a	18 $\pm$ 4 a	13.2 $\pm$ 7 a	27.8 $\pm$ 12 ab	43.81 $\pm$ 4.10 bc	50.73 $\pm$ 1.83 b	0.80 $\pm$ 0.48 a	56.41 $\pm$ 0.41 b	2.57 $\pm$ 0.30 b
SV	2.5	1.4 $\pm$ 0.4 a	1 b	18 $\pm$ 4 a	15.6 $\pm$ 7 a	28 $\pm$ 15 ab	43.44 $\pm$ 5.07 bc	50.60 $\pm$ 1.42 b	0.79 $\pm$ 0.68 a	56.09 $\pm$ 2.08 b	2.59 $\pm$ 0.14 b
SV	10	7.3 $\pm$ 8.6 ab	2 c	27.4 $\pm$ 10 ab	27 $\pm$ 11 b	39.2 $\pm$ 10 b	38.38 $\pm$ 2.96 a	38.92 $\pm$ 8.76 a	1.15 $\pm$ 0.95 a	55.87 $\pm$ 4.38 a	3.10 $\pm$ 0.35 c
SCG	-	816.6 $\pm$ 19.97	3.9 $\pm$ 0.01	83 $\pm$ 6.08	38 $\pm$ 5.29	28 $\pm$ 2.65	40.60 $\pm$ 1.64	0.044 $\pm$ 0.01	5.78 $\pm$ 0.70	41.61 $\pm$ 1.45	1.95 $\pm$ 0.10
		F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio
Tipo de suelo		239.8***	0.01	0.63	1.65	3.02	8.65*	0.10	3.11	2.26	226.8***
Dosis de SCG		1648.6***	54.3***	9.08**	2.34	4.07	8.57**	12.4**	5.11*	2.32	8.04**
Tipo de suelo $\times$ Dosis de SCG		269.1***	1.16	0.38	0.65	0.15	0.11	0.40	0.20	0.86	1.42

Abreviaturas procedentes de la **Tabla 17**.

SCG. Sin embargo, cuando se agregó SCG a ambos suelos, se encontró un mayor CA para el diiodometano debido al carácter apolar del líquido, que generó un mayor CA con el sólido. Este hecho se debe a que las partículas sólidas del suelo a pH neutro y básico generalmente tienen cargas negativas (Ndlovu et al., 2014). Cuando se adicionaron los SCG, se observó una tendencia creciente de todos los CA, exceptuando la formamida con 2.5% de SCG en el suelo Rojo. Este hecho probablemente se debió a la ausencia de simetría de la polaridad de este líquido que domina sobre al carácter aceptor de electrones ( $\gamma^+ = 39.6$  y  $\gamma^- = 2.28$ ; van Oss, 1994). También se ha demostrado en estudios previos que la adición de otras enmiendas orgánicas, como co-compost de alpeorajo, de estiércol de vaca, estiércol de cabra u hojas, incrementó también el CA (Aranda et al., 2016; Liyanage y Leelamanie, 2016). Sin embargo, de acuerdo con la *contact angle soil water repellency classification*, los SCG se clasifican como bajos repelentes al agua (81-86°), siendo este valor más bajo que el ángulo subcrítico de repelencia, establecido en 90° por Tillman et al. (1989), los cuales indica una baja hidrofilia del suelo. Por tanto, todas las mezclas suelo-SCG con un CA por debajo de 40° se consideran “no significativamente repelentes al agua”, de acuerdo con King (1981). La falta de coincidencia con respecto a la clasificación de la hidrofobicidad entre el WDPT y la CA ya fue establecida por Aranda et al. (2016) quienes atribuyeron la complejidad de la relación entre ambas clases de parámetros al método de medida.

Los valores  $\gamma^{LW}$  de las muestras de suelo se encuentra en un rango entre 38 y 47 mJ m<sup>-2</sup> (**Tabla 18**), los cuales fueron ligeramente inferiores a aquellos obtenidos para otros suelos Mediterráneos (Plaza et al., 2015). Este componente disminuye conforme el porcentaje de SCG adicionado aumenta, lo que probablemente es debido a que los SCG generan una estructura más ordenada de moléculas de agua en la interfaz sólido-líquido (Ontiveros et al., 2014). A partir del análisis de los componentes ácido base ( $\gamma^+$  y  $\gamma^-$ ) de la energía libre superficial de los suelos, los suelos estudiados pueden considerarse de

naturaleza monopolar [modelo van Oss]. Los suelos en general se consideran como una base de Lewis ( $\gamma^+ \approx 0$  y  $\gamma^- \neq 0$ ). Si analizamos el comportamiento del componente donador de electrones, observamos que en todos los casos la adición de SCG supone una disminución en el carácter donador de electrones del suelo. Por otro lado, se observa que esta disminución del carácter básico (en el sentido de Lewis) del suelo no es significativa entre 0 y 2.5%, pero sí entre 2.5 y 10% SCG (**Tabla 18**). Si consideramos que según el modelo de van Oss, un material monopolar presenta un carácter hidrofílico cuando  $\gamma^+ \approx 0$  y  $\gamma^- \leq 28.2$  mJ m<sup>-2</sup> (van Oss, 1994), la adición de SCG reduce la hidrofiliidad del suelo (**Tabla 18**) y paralelamente lo acidifica, como se discutirá más adelante.

Del mismo modo, la PWSOM, es decir, grupos funcionales hidrofóbicos alifáticos/hidrofílicos aromáticos obtenidos a partir de ATR-FTIR de muestras de suelo, tradicionalmente utilizados para evaluar la hidrofobicidad del suelo (Matějková y Šimon, 2012), muestran una tendencia similar a la encontrada en otros estudios (Ellerbrock et al., 2005; Comino et al., 2017). Esta tendencia indica que la mayor concentración de compuestos alifáticos en la enmienda orgánica genera un mayor carácter hidrofóbico y, por lo tanto, una mayor repelencia al agua, como también lo demuestran Aranda et al. (2016), sobre los efectos del co-compost de alpeorujó en la humectabilidad y la calidad del suelo en los olivares en un experimento de campo a largo plazo. En este caso, la adición de SCG generó un aumento en la concentración de compuestos alifáticos, lo que conduce a un aumento en la repelencia al agua, pero no significativamente.

Además, es interesante discutir el comportamiento hidrofóbico de las muestras, desde el punto de vista del tipo de suelo. Los suelos ensayados presentan condiciones geoquímicas distintas. El suelo de Vega tiene una textura menos arenosa, más carbonatada y con un pH mayor (**Tabla 3**), lo que no influye sobre los parámetros relacionados con la hidrofobicidad decisivamente, como evidencia la falta de relación entre el tipo de suelo y el WDPT, el CA y

los componentes SFE (**Tabla 17**). Para los parámetros WDPT y CA H<sub>2</sub>O, el incremento en la hidrofobicidad es algo mayor en el suelo Rojo. Por tanto, la presencia de una textura más arenosa en este suelo (**Tabla 3**) podría influir de cierta forma en el ligero aumento de su repelencia al agua, como han reportado diferentes autores (Dekker et al., 2005; González-Peñazola et al., 2013; Woche et al., 2005). El mayor contenido en carbonatos y esmécticas en el suelo de Vega podría también influir en este hecho, como discutiremos posteriormente. Un comportamiento similar se ha encontrado en el parámetro electro-donor  $\gamma$ , disminuyendo conforme aumenta el porcentaje de SCG, siendo significativo con 10% de SCG (**Tabla 18**) y no significativo en el suelo Rojo con respecto al suelo de Vega. Hay que recordar que, para un material monopolar, de naturaleza donador de electrones ( $\gamma^+ = 0$ ,  $\gamma^- \neq 0$ ), una disminución de  $\gamma^-$  indica una disminución en su hidrofiliidad, siendo el límite que diferencia un material hidrofóbico e hidrofílico ( $\gamma^+ = 0$ ,  $\gamma^- \leq 28.2$ , van Oss, 1994). Aunque no se ha encontrado una correlación entre el componente  $\gamma^-$  y los CaCO<sub>3</sub> eq. para todas las muestras (n = 30), se encontró una correlación positiva para las muestras del suelo de Vega (n = 15) ( $r = 0.516$ ;  $p < 0.05$ ); lo que indica que un contenido más bajo en carbonatos y un contenido más alto en SCG (**Tabla 17**) dan lugar a una mayor hidrofobicidad. Varios autores han descrito esta relación inversa entre la repelencia al agua y los carbonatos en los suelos (Aranda et al., 2016; Cerda y Doerr, 2005), pero apenas se han descrito para enmiendas orgánicas. Estos autores explicaron las diferencias en los suelos en términos de acidez del suelo, y sugirieron que la alcalinidad de los suelos calcáreos es responsable de la disminución de la hidrofobicidad.

Existen correlaciones interesantes entre las variables relacionadas con la hidrofobicidad (**Tabla 19**). Destaca la buena correlación que existe entre los

**Tabla 19.** Matriz de correlación de Pearson entre las propiedades de hidrofobicidad y las propiedades químicas, físicas y biológicas.

	WDPT	log WDPT+1	CA H <sub>2</sub> O	CA formamide	CA diiodomethane	$\gamma^{\text{LW}}$ SFE	$\gamma^+$ SFE	$\gamma^-$ SFE	Total SFE
WDPT									
log WDPT+1	0.678***								
CA H <sub>2</sub> O		0.437*							
CA formamide			0.393*						
CA diiodomethane		0.514**							
$\gamma^{\text{LW}}$ SFE		-0.573***		-0.379*	-0.859***				
$\gamma^+$ SFE		0.511**			0.605***	-0.746***			
$\gamma^-$ SFE		-0.583***	-0.761***	-0.369*					
Total SFE				-0.648***	-0.431*	0.464**			
PWSOM					0.373*	-0.437*			-0.423*
CO	0.536**	0.868***	0.492**	0.453*	0.513**	-0.599***	0.424*	-0.714***	-0.459*
CIC					0.438*	-0.481**		-0.365*	-0.446*
HQI	-0.406*	-0.826***	-0.411*	-0.447*	-0.387*	0.506**	-0.370*	0.621***	0.366*
CaCO <sub>3</sub> eq.									
TEC	0.488**	0.842***	0.582***	0.440*	0.457*	-0.544**	0.415*	-0.709***	-0.403*
AH/AF									
HWSC	0.652***	0.836***	0.381*	0.411*	0.473**	-0.535**		-0.661***	-0.437*
A4/A6									
RR	0.498**	0.866***	0.514**	0.372*	0.563***	-0.662***	0.610***	-0.638***	
GI			-0.446*						
DH <sub>asa</sub>									
ASI		0.676***	0.373*		0.383*	-0.417*		-0.580***	
K <sub>s</sub>	0.536**	0.868***	0.492**	0.453*	0.514**	-0.600***	0.424*	-0.714***	-0.459*
DA									
DR	-0.380*	-0.713***		-0.503**	-0.514**	0.651***	-0.415*	0.498**	0.515**
Porosidad total	-0.482**					0.361*	-0.458*		
Macroporosidad	-0.448*	-0.649***		-0.455*	-0.580***	0.718***	-0.534**	0.399*	0.442*
W <sub>33</sub>		0.496**		0.494**	0.464**	-0.557***		-0.456*	-0.575***
W <sub>1500</sub>		0.636***	0.574***	0.523**	0.429*	-0.482**		-0.730***	-0.579***
AU			-0.558***					0.623***	

Abreviaturas procedentes de la **Tabla 17**. Significancia estadística: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n=30$ .

componentes de la SFE ( $\gamma^{LW}$ ,  $\gamma^+$ ,  $\gamma^-$ ) y el parámetro WDPT. En este sentido, observamos que los valores altos de  $\gamma^{LW}$ , que proporcionan información sobre la capacidad de estructuración de las moléculas de agua alrededor de la superficie de las partículas del suelo, corresponden a valores de tiempo de penetración de gotas de agua más bajos, como se esperaba. La correlación entre  $\gamma^-$  que indica el grado de hidrofilia (menor hidrofilia, menor  $\gamma^-$ ) también es razonable, como lo es el WDPT que indica que a un valor más bajo de  $\gamma^-$ , implica menos hidrofilia y, por lo tanto, mayor tiempo de penetración de la gota de agua.

#### **4.4.4. Relación entre la hidrofobicidad del suelo y otras propiedades relacionadas con la calidad del suelo.**

##### ***Relación con las propiedades químicas del suelo y la materia orgánica del suelo.***

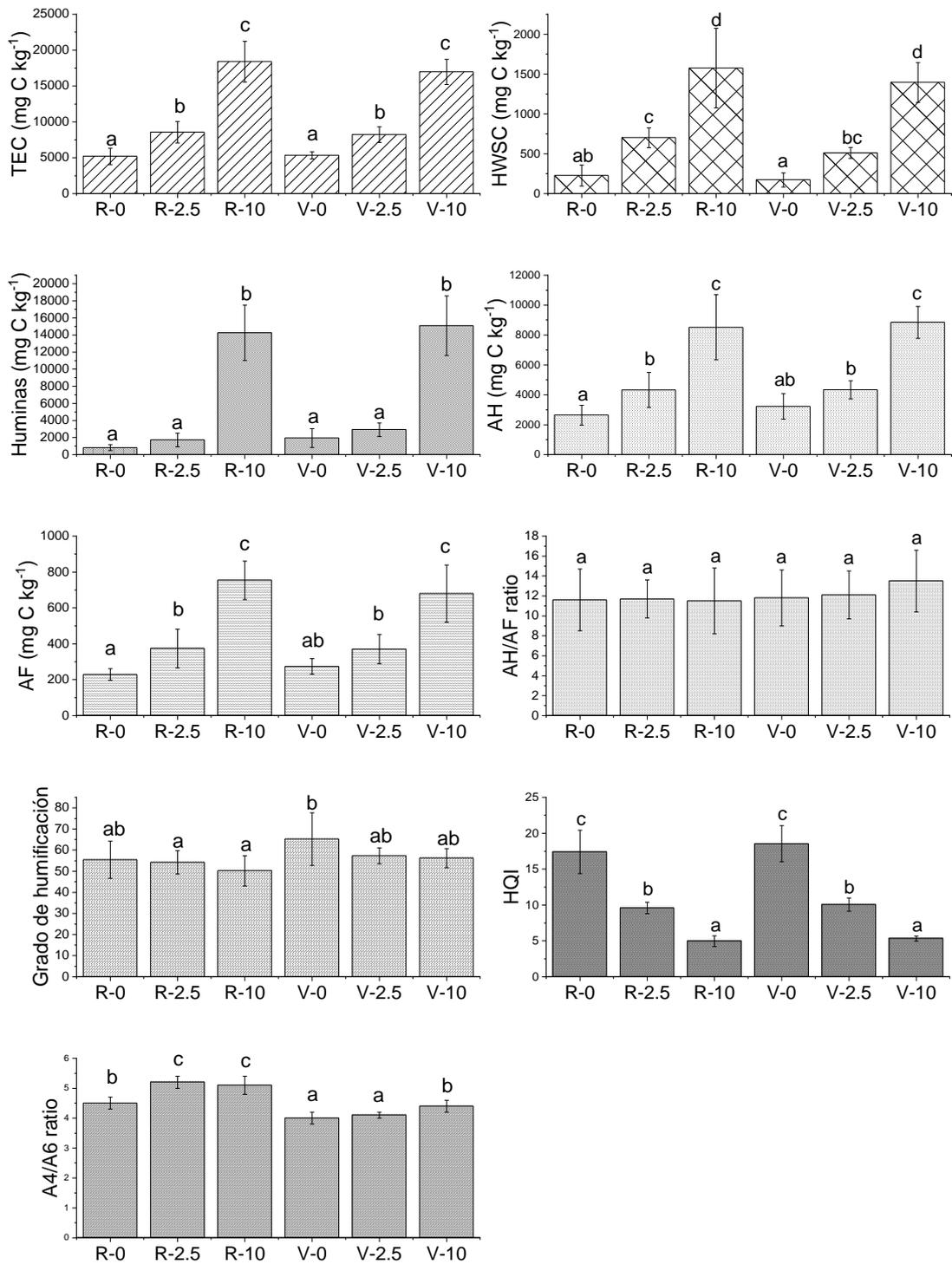
La adición de 2.5 y 10% de SCG aumentó la cantidad de CO en ambos suelos, alcanzando valores del 5% en SR y del 5.6% en el suelo de Vega (**Tabla 20**), lo que indica un aspecto favorable del uso de SCG como enmienda orgánica de suelos, debido a la baja cantidad de CO (<1%) en los suelos agrícolas Mediterráneos (Rodríguez Martín et al., 2016). Este hecho ha sido reportado también para los SCG en estudios previos (Comino et al., 2017).

Las diferentes fracciones de la SOM y su cuantificación (**Figura 51**) incluyen sustancias húmicas nativas del suelo coextraídas con sustancias similares a las húmicas derivadas de los SCG (así como ácidos fúlvicos y sustancias similares a las huminas). Los resultados obtenidos muestran un claro aumento en todas las fracciones de la SOM con la adición de SCG. El incremento es especialmente mayor en las fracciones de carbono extraíble total y HWSC, mientras que el incremento en las fracciones de ácidos

**Tabla 20.** Parámetros de calidad del suelo. Medias  $\pm$  SD (n = 5). Diferencias significativas son indicadas por distintas letras ( $p < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc). Se muestra también el F ratio obtenido del ANOVA de dos vías ( $p < 0.001^{***}$ ;  $p < 0.01^{**}$ ;  $p < 0.05^*$ ).

		Propiedades químicas, fisicoquímicas y biológicas								
Suelo	SCG %	pH (H <sub>2</sub> O)	CO (%)	CIC (cmol+ kg <sup>-1</sup> )	CaCO <sub>3</sub> eq. (%)	GI (%)	DHasa ( $\mu\text{gTPF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )			
SR	0	7.5 $\pm$ 0.2 b	1.23 $\pm$ 0.17 a	21.07 $\pm$ 1.74 a	1.0 $\pm$ 0.4 a	104 $\pm$ 27 a	34.68 $\pm$ 8.04 c			
SR	2.5	7.4 $\pm$ 0.1 b	2.28 $\pm$ 0.17 b	21.75 $\pm$ 0.63 a	1.2 $\pm$ 1.1 a	99 $\pm$ 18 a	58.64 $\pm$ 13.65 d			
SR	10	6.7 $\pm$ 0.2 a	5.09 $\pm$ 0.98 d	24.81 $\pm$ 0.75 b	1.0 $\pm$ 0.2 a	81 $\pm$ 12 a	38.26 $\pm$ 14.03 c			
SV	0	8.3 $\pm$ 0.1 d	1.47 $\pm$ 0.16 a	26.95 $\pm$ 1.89 c	40.2 $\pm$ 1.2 d	101 $\pm$ 33 a	17.04 $\pm$ 9.90 a			
SV	2.5	8.3 $\pm$ 0.2 d	2.66 $\pm$ 0.30 c	26.52 $\pm$ 0.67 c	39.3 $\pm$ 1.6 c	98 $\pm$ 14 a	32.28 $\pm$ 3.49 bc			
SV	10	8.0 $\pm$ 0.1 c	5.62 $\pm$ 1.74 e	29.28 $\pm$ 1.96 d	36.8 $\pm$ 1.3 b	98 $\pm$ 16 a	21.10 $\pm$ 4.93 a			
		F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio			
Tipo de suelo		508.2***	6.51*	104.1***	8990.2***	0.55	41.9***			
Dosis de SCG		64.9***	279.3***	17.3***	7.26**	0.35	14.3**			
Tipo de suelo $\times$ dosis de SCG		8.35**	0.26	0.09	6.17*	0.40	0.81			
		Propiedades físicas								
Suelo	SCG %	ASI	Ks (cm h <sup>-1</sup> )	DA (g cm <sup>-3</sup> )	DR (g cm <sup>-3</sup> )	Porosidad total (cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup> )	Macroporosidad (cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup> )	W <sub>33</sub> (%)	W <sub>1500</sub> (%)	AU (mm cm <sup>-1</sup> )
SR	0	0.72 $\pm$ 0.02 a	6.56 $\pm$ 0.64 a	1.03 $\pm$ 0.09 b	2.53 $\pm$ 0.09 c	59.20 $\pm$ 2.48 a	37.61 $\pm$ 2.72 d	21.59 $\pm$ 1.08 a	12.15 $\pm$ 0.37 a	0.97 $\pm$ 0.13 bc
SR	2.5	0.85 $\pm$ 0.06 b	10.94 $\pm$ 0.63 b	1.01 $\pm$ 0.1 ab	2.46 $\pm$ 0.05 bc	59.00 $\pm$ 4.04 a	36.45 $\pm$ 3.88 cd	22.56 $\pm$ 1.40 a	15.38 $\pm$ 3.63 b	0.73 $\pm$ 0.29 ab
SR	10	0.93 $\pm$ 0.05 c	22.68 $\pm$ 3.33 c	0.96 $\pm$ 0.08 ab	2.31 $\pm$ 0.03 a	58.39 $\pm$ 3.55 a	30.00 $\pm$ 3.04 b	28.39 $\pm$ 0.69 b	22.95 $\pm$ 3.50 c	0.54 $\pm$ 0.35 a
SV	0	0.79 $\pm$ 0.03 b	7.54 $\pm$ 0.52 a	0.97 $\pm$ 0.08 ab	2.48 $\pm$ 0.05 bc	60.88 $\pm$ 3.84 a	32.18 $\pm$ 3.49 bc	28.70 $\pm$ 0.82 bc	15.70 $\pm$ 0.32 b	1.26 $\pm$ 0.09 c
SV	2.5	0.86 $\pm$ 0.06 b	12.52 $\pm$ 1.06 b	0.93 $\pm$ 0.08 ab	2.42 $\pm$ 0.05 b	61.45 $\pm$ 3.81 a	31.64 $\pm$ 4.10 bc	29.81 $\pm$ 0.44 c	18.07 $\pm$ 0.79 b	1.10 $\pm$ 0.21 c
SV	10	0.95 $\pm$ 0.06 c	24.91 $\pm$ 1.43 d	0.90 $\pm$ 0.07 a	2.25 $\pm$ 0.08 a	59.79 $\pm$ 3.70 a	21.10 $\pm$ 3.63 a	35.68 $\pm$ 1.31 d	28.00 $\pm$ 2.84 d	0.71 $\pm$ 0.27 ab
		F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio	F ratio
Tipo de suelo		4.43	6.48*	15.1**	5.83*	3.99	23.7***	336.2***	43.1***	25.0***
Dosis de SCG		24.0***	278.1***	4.82*	35.7***	0.75	20.6***	116.5***	115.8***	20.6***
Tipo de suelo $\times$ Dosis de SCG		0.79	0.26	0.12	0.29	0.19	0.09	0.04	1.33	1.53

Abreviaturas procedentes de la **Tabla 17**.



**Figura 51.** Fraccionamiento de la materia orgánica del suelo. TEC, carbono extraíble total; AF, ácidos fúlvicos; AH, ácidos húmicos; HQI, índice de calidad del humus.

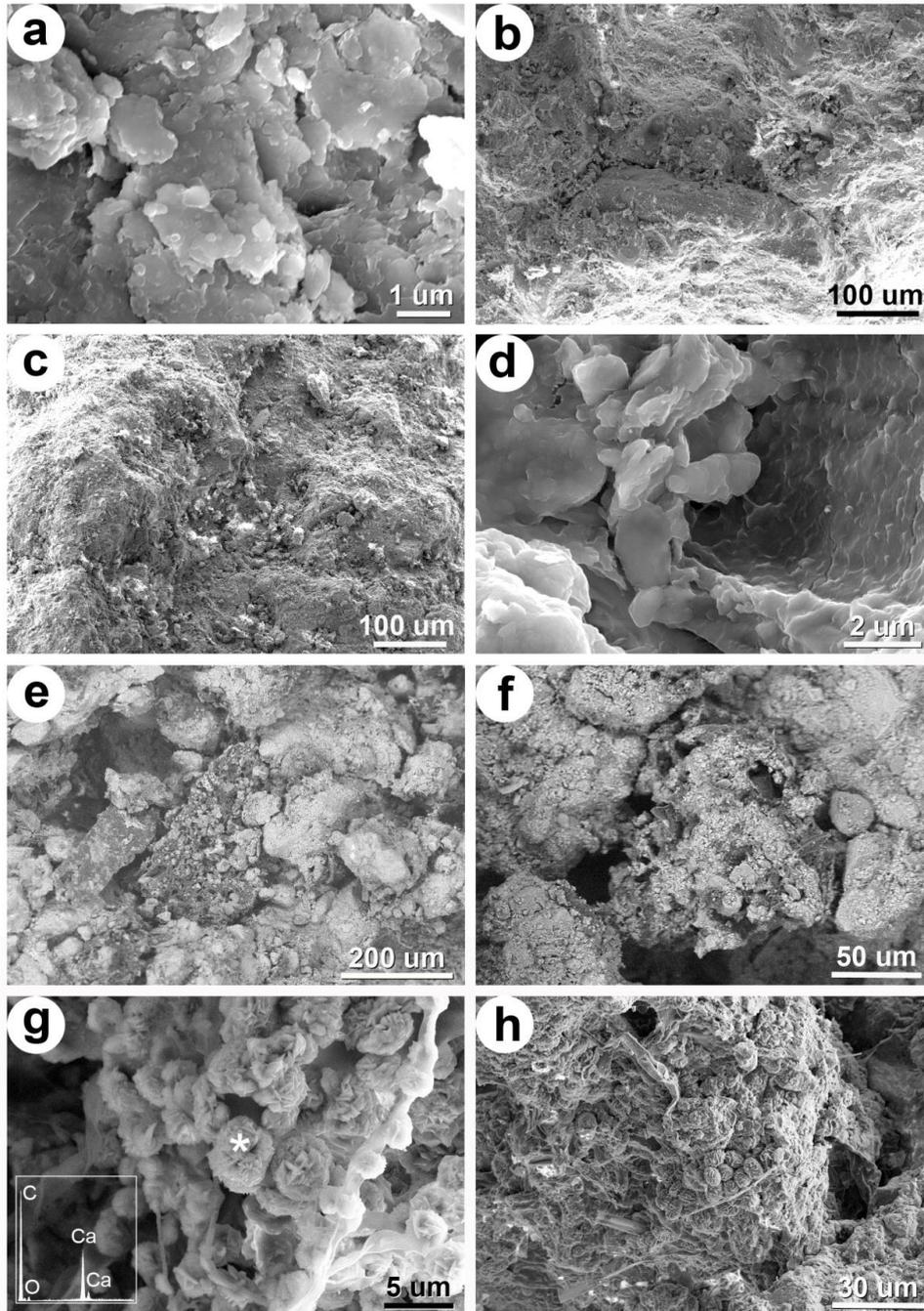
húmicos y fúlvicos es menor, pero también significativo. El incremento de la humina sólo es significativo en los suelos con 10% de SCG. Estos incrementos indican un aumento en la materia orgánica total en el suelo con la adición de SCG, pero especialmente en el grupo más lábil de la SOM, que incluye biomasa microbiana, así como carbohidratos solubles del suelo y aminas (Ghani et al., 2003). También hay un aumento, aunque menos sustancial, de las fracciones más evolucionadas y recalcitrantes de materia orgánica del suelo, especialmente en el caso de las huminas, lo que representa una SOM más estabilizada (Hayes et al., 2017). La relación de ácidos húmicos/ácidos fúlvicos y el grado de humificación (**Figura 51**) motivaron una mayor discusión sobre el grado de evolución de la materia orgánica en las diferentes muestras. La relación ácidos húmicos / ácidos fúlvicos (grado de polimerización) fue similar entre todas las muestras, aunque muestra una tendencia a valores más altos en las muestras del suelo de Vega con la adición de SCG. Por otro lado, se obtuvieron valores más bajos para el grado de humificación para las muestras del suelo Rojo en comparación con las muestras del suelo de Vega, y también una tendencia de valores más bajos para este grado cuando se incorpora SCG en ambos tipos de suelos. Esto último muestra que la adición de SCG tiende a aumentar la proporción de la fracción no humificada, es decir sustancias con pocas características húmicas, como péptidos, azúcares, ácidos nucleicos, grasas, etc. (Vergnoux et al., 2011) en estos suelos con respecto a las formas más evolucionadas de materia orgánica. Esta disminución de la calidad de la SOM se observa también en la reducción del índice de calidad del humus (13 unidades en ambos suelos con 10% SCG; **Figura 51**). Además, la adición de SCG aumentó la relación A4/A6 y, por lo tanto, la complejidad molecular del CO disminuyó, ya que esta propiedad está inversamente relacionada con el grado de humificación de la SOM (Stevenson, 1994). Esta relación indica diferencias entre las tipologías de suelo (**Tabla 17; Figura 51**), con valores más bajos en el suelo de Vega, que muestran una mejor distribución en ácidos húmicos

humificados parciales y totales, y una mayor evolución de los AH en este suelo. Otras propiedades afectadas significativamente por el tipo de suelo fueron los carbonatos y la CIC, siendo más altos en el suelo de Vega que en el suelo Rojo (**Tabla 3**). Estos resultados sugieren que los niveles de materia orgánica aumentan con la adición de SCG y que la calidad de esta materia orgánica se reduce, especialmente en muestras del suelo Rojo.

Las variables relacionadas con la hidrofobicidad,  $\gamma$  y  $\log \text{WDPT} + 1$ , son las que presentan el mayor número de correlaciones y las más significativas con los parámetros de calidad del suelo (**Tabla 19**). Las propiedades químicas CO, TEC y HWSC se correlacionan con el parámetro  $\gamma$  ( $r = -0.714, -0.709$  y  $-0.661$ , respectivamente), de modo que cuanto mayor es el contenido de materia orgánica, mayor es la hidrofobicidad en las muestras de suelo, de acuerdo con Aranda et al. (2016). En las correlaciones entre el parámetro  $\gamma$ - (y todos los parámetros relacionados con la hidrofobicidad) con los parámetros de calidad de la materia orgánica (HQI, AH/AF y A4/A6), sólo encontramos una correlación significativa con el HQI, lo que respalda la idea de que existe un relación inversa entre calidad de la materia orgánica y la hidrofobicidad. Esta relación entre la cantidad y la calidad de la materia orgánica en relación con la hidrofobicidad puede deberse a la fuerte estabilidad y al bajo grado de humificación del material orgánico agregado al suelo, con poca evolución para los días de incubación establecidos en el ensayo (**Tabla 17**). Estos resultados mostraron, de acuerdo con Leue et al. (2010), que el tiempo de infiltración de la gota de agua está relacionado con la composición y calidad de la materia orgánica y podría tener implicaciones, aunque poco conocidas, en el movimiento preferencial del agua y los solutos reactivos en el suelo.

### ***Relación con las propiedades físicas del suelo***

La adición de SCG influyó significativamente en todas las propiedades físicas del suelo, excepto en la porosidad total (**Tabla 17** y **Tabla 20**). Las propiedades físicas fueron en general más favorables en los suelos con adición de SCG con un mayor índice de estabilidad estructural (Aggregate Stability Index, ASI), mayor conductividad hidráulica ( $K_s$ ), mayor macroporosidad y mayor retención de agua y menor densidad aparente y de partículas (o densidad real). Por lo tanto, esta materia prima tuvo una influencia positiva en la retención de agua, aumentando su valor en ambos potenciales (-33 y -1500 kPa). Por lo tanto, la retención de agua aumentó con el aumento de la repelencia al agua, lo que coincide con lo establecido por Liyanage y Leemanie (2016), quienes encontraron que las muestras adicionadas con estiércol hidrófobo mostraron una mayor retención de agua. Como se ha indicado en el apartado sobre el efecto de los SCG sobre las propiedades físicas del suelo, el aumento relativo de la  $W_{1500}$  fue mayor que para  $W_{33}$ , y, por lo tanto, el AU disminuyó con la adición de SCG. Esta misma tendencia fue encontrada por otros para otras enmiendas orgánicas (Aranda et al., 2016; Forge et al., 2016; Killi et al., 2014; Lozano- García et al., 2011). Aranda et al. (2016) atribuyeron este fenómeno a la hidrofobicidad de la enmienda orgánica agregada al suelo. La macroporosidad y la densidad aparente, significativamente mayores en las muestras del suelo Rojo (**Tabla 17** y **Tabla 20**), disminuyeron con la incorporación de SCG, lo que se puede observar en las imágenes SEM (**Figura 52**). Los resultados también mostraron un aumento en la estabilidad estructural con la adición de SCG, alcanzando valores de 0.93 (promedio de ambos suelos), y un aumento en  $K_s$  del 245% y 230%, en el caso de suelo Rojo y suelo de Vega, respectivamente, con la adición de 10% SCG. Coincidiendo con Lützow et al. (2006), un aumento de la hidrofobicidad tiene un impacto positivo en la estabilidad estructural del suelo.



**Figura 52.** Imágenes SEM de muestras seleccionadas del suelo Rojo (SR) y suelo de la Vega (SV); a: SR 0 % SCG, 0 días de incubación; b: SR 0 % SCG, 0 días de incubación; c: SV 0% SCG, 0 días de incubación; d: SV 10% SCG, 60 días de incubación; e: SR 10% SCG, 60 días de incubación; f: SV 10% SCG, 60 días de incubación; g: SR 10% SCG, 60 días de incubación; h: SV 10% SCG, 60 días de incubación. Las imágenes a, b, c, d, g y h fueron tomadas con electrones secundarios; las imágenes e y f fueron tomadas con electrones retrodispersados (condiciones backscattered).

Leemanie et al. (2013), encontraron que mayores cantidades de abono verde (material muy hidrófobo) aumentaron los agregados estables. Con respecto al tiempo de cultivo, la DA disminuyó significativamente y la porosidad total aumentó significativamente durante la incubación (**Tabla 17**), lo que puede atribuirse a los cambios de humedad de los microcosmos durante el ensayo, como ya indicamos en el apartado sobre el efecto de los SCG sobre las propiedades físicas. El efecto sobre la porosidad del suelo podría facilitar la incorporación intrapedregosa de la materia orgánica del suelo (Bronick y Lal, 2005). La mayor porosidad y la inclusión de SCG dentro de los agregados se pueden observar en la **Figura 52 e y f** (imágenes SEM). Las correlaciones entre estos parámetros y la retención de agua, por un lado y el componente  $\gamma^+$ , por otro, son de especial interés (**Tabla 19**). El donador de electrones  $\gamma^+$  mostró correlaciones negativas con  $W_{33}$  y  $W_{1500}$ , y una correlación positiva con el AU, mostrando la sensibilidad de los componentes SFE para evaluar estas propiedades del suelo. Por lo tanto, aunque las muestras con repelencia al agua parecen retener más agua, ésta parece estar menos disponible para el crecimiento de las plantas. Por lo tanto, los componentes SFE, especialmente  $\gamma^-$ , juegan un papel interesante en el balance hídrico del suelo, de acuerdo con Aranda et al. (2016). Otros parámetros físicos correlacionados con el parámetro  $\gamma^-$  son la  $K_s$  y la porosidad (total y macroporosidad); y de una manera no significativa, la DA, la cual se relaciona negativamente con la hidrofobia (a más hidrofobia, menor densidad, **Tabla 17**). La correlación negativa entre el componente  $\gamma^-$  y la ASI es notable, lo que implica un importante papel de la hidrofobicidad en el desarrollo estructural del suelo y en la estabilización de los agregados del suelo, ya demostrado por otros autores en experimentos de campo con cubiertas naturales de plantas, compost de alpeorujos y aguas residuales derivadas del alpeorujos en suelos agrícolas Mediterráneos (Aranda et al., 2016; Mahmoud et al., 2012; Plaza et al., 2015). Además, como lo afirmaron Lützow et al. (2006) y Bachmann et al. (2008), el aumento de la estabilidad de

los agregados del suelo con el aumento de la hidrofobicidad también contribuiría a la oclusión de la materia orgánica incorporada como mecanismo de estabilización. Por lo tanto, un aumento en la repelencia al agua del suelo podría implicar un aumento en la calidad del suelo al mejorar uno de sus indicadores esenciales, como es la estabilidad estructural (Bünemann et al., 2018).

### ***Relación con la morfología del suelo (SEM)***

La microestructura de las muestras del suelo Rojo y suelo de Vega previa al ensayo, es laminar (en el sentido de Osipov y Sokolov, 1978), en la que las partículas más finas del suelo (arcilla y limo) se orientan paralelamente a la superficie de los agregados (ped) en uniones cara-cara (**Figura 52 a**). Según Ndlovu et al. (2014), estas uniones cara-cara de las illitas y esmectitas (filosilicatos mayoritarios en estos suelos) se favorecen a pH básicos (7.2 - 8.2; **Tabla 3**). A un nivel organizativo mayor, la masa del suelo está diferenciada en microagregados equidimensionales de unos 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, coalescentes, separados por fisuras (**Figura 52 b y c**).

En el caso de las muestras adicionadas de SCG, la microestructura a un nivel inferior es más abierta, tipo “honeycomb” (Osipov y Sokolov, 1978). En esta microestructura se perciben algunas uniones de partículas cara-borde (**Figura 52d**; parte central de la fotografía). Según Ndlovu et al. (2014) las partículas de filosilicatos, illita y esmectita, presentan cargas superficiales negativas en las caras y pH dependientes en el borde: principalmente negativas cuando el pH es básico y positivas cuando es ácido. La presencia de cargas positivas en los bordes de las partículas de arcilla facilita las uniones cara-borde; esto podría explicar en parte el cambio microestructural que ocurre al adicionar SCG, ya que éstos descenden el pH del suelo (son ácidos: 5.8; **Tabla 3**), facilitando así la existencia de uniones cara-borde entre los filosilicatos del suelo.

A un nivel estructural mayor, los microagregados (tamaños entre 150 – 200  $\mu\text{m}$ ) están más separados, con las superficies más nítidas y mayor número y volumen de poros (**Figura 52 e y f**) que los suelos nativos (**Figura 52 b y c**). En estas imágenes se ha observado que en las muestras del suelo de Vega las partículas de SCG interactúan más intensamente con las partículas minerales que en el suelo Rojo, donde suelen estar más en superficie, y menos cubiertas de partículas minerales que en el caso del suelo de Vega. Se puede atribuir este hecho a que en el suelo de Vega hay un mayor contenido de esmectita y de carbonatos, que interactúan mejor con la materia orgánica (Six et al., 2002). En la formación de este tipo diferente de estructura, hay que añadir también el papel de los microorganismos (bacterias y hongos) a través de la producción y el consumo de compuestos orgánicos lábiles y de la unión física de las partículas del suelo (Bronick y Lal, 2005). Así, las muestras adicionadas con SCG manifiestan una actividad biológica notable, principalmente mediante hifas de hongos (**Figura 52 g y h**) y la cementación orgánica masiva que une los granos minerales (**Figura 52 e y f**). Estas características son compatibles con el índice de estabilidad estructural y otros parámetros físicos (**Tabla 19**). Por lo tanto, el entramado físico de las partículas del suelo por las hifas de hongos observadas, puede ser una forma importante de aumentar la estabilidad de los agregados en suelos no carbonatados y arenosos, de acuerdo con Delgado et al. (2007). Los compuestos hidrofóbicos liberados por las hifas de hongos y otros microorganismos son uno de los responsables del aumento de la hidrofobicidad en el suelo (Schaumann et al., 2007). La **Figura 52 g**, correspondiente al suelo Rojo, plantea una interesante cuestión porque las formas esferulíticas que se observan ligadas a las hifas de los hongos no son conidióforos, como si ocurre en el caso de la del suelo de Vega (**Figura 52 h**), sino que se trata de drusas de carbonato cálcico detectado con EDX. La técnica empleada no permite determinar si se trata de calcita o aragonito (poliformos de  $\text{CaCO}_3$ ). Se trata de un proceso de biomineralización, es decir, de formación de minerales con la

participación de los seres vivos; la biomineralización de carbonato cálcico por hongos está descrita en la bibliografía (Bindschedler et al., 2016). La aparición de carbonato cálcico ligado a la actividad fúngica en el suelo Rojo y no en el suelo de Vega, podría explicarse porque la DHasa es mayor en el suelo Rojo (**Tabla 20**) y según lo que indican Zhang et al. (2010), la biomineralización de carbonatos es proporcional a dicha actividad. La biomineralización de carbonatos por algunas colonias de hongos podría considerarse como un proceso de fijación de C al suelo de forma inorgánica; otro aspecto positivo de mejora de la calidad con la adición de SCG.

Los suelos calcáreos (suelo de Vega) parecen ser menos propensos a desarrollar repelencia al agua que los ácidos (suelo Rojo), lo que podría explicarse por la menor actividad fúngica registrada a pHs mayores de 7 (Mataix-Solera y Doerr, 2004). Los valores de pH recogidos en la **Tabla 20** hacen que este hecho sea probable debido a la mayor actividad fúngica observada con SEM en las muestras de suelo Rojo adicionadas de SCG y sin carbonatos, las cuales son muestras más hidrofóbicas. Las imágenes SEM nos permiten otra interpretación de las diferencias de hidrofobicidad entre ambos suelos. Gao et al. (2018) indicaron que las arcillas podrían disminuir la hidrofobicidad del suelo al recubrir las superficies hidrofóbicas. Como anteriormente se discutió, las partículas de SCG en el suelo de Vega parecen más recubiertas por partículas minerales del suelo (carbonatos y/o esmectitas) que en el suelo Rojo y también más incorporadas a la masa de suelo que en el suelo Rojo. Tanto la incorporación a la masa como el recubrimiento haría que la hidrofobicidad (propiedad superficial) de los SCG, mucho mayor que la del suelo (ver valores de WDPT, **Tabla 18**) quede enmascarada.

### ***Relación con las propiedades biológicas del suelo***

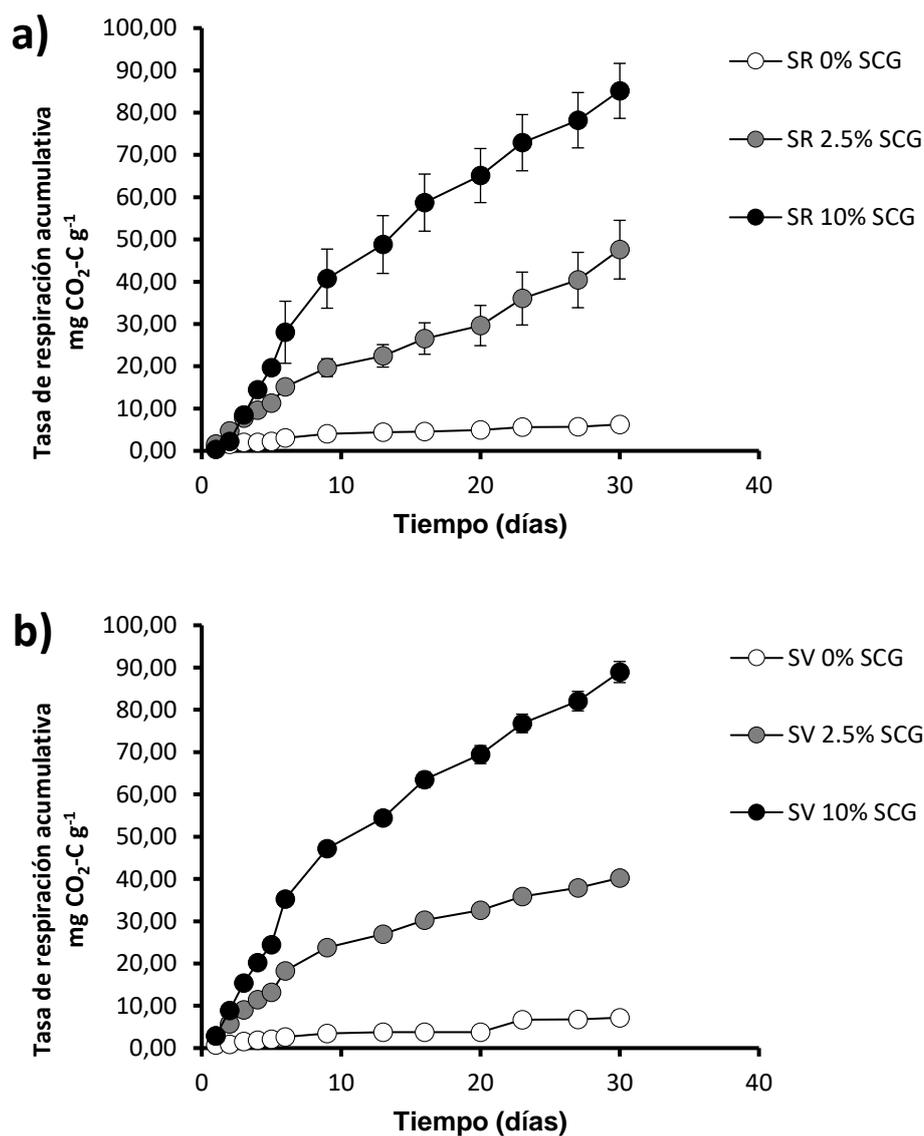
La tasa de respiración (RR) aumentó significativamente con la adición de SCG y presentó valores similares para ambos suelos (**Tabla 17** y **Tabla 20**). Como se muestra en la **Figura 53**, se emitieron 85.2 y 89 mg de CO<sub>2</sub>-C g<sup>-1</sup> en el suelo Rojo y suelo de la Vega respectivamente, después de 30 días con 10% de adición de SCG. Estos datos son muy elevados en comparación con los obtenidos por otros autores después de la incubación de materiales frescos como restos de poda de olivo, con valores alrededor de 0.6-0.9 mg CO<sub>2</sub>-C g<sup>-1</sup> (Gómez-Muñoz et al., 2016). La observación de las curvas acumulativas de RR y de los datos de la **Tabla 20**, nos indica que el CO<sub>2</sub> emitido en ambos suelos por las muestras adicionadas con 2.5% y 10% de SCG, no es proporcional a las cantidades de SCG adicionadas. Es decir, los suelos con 2.5% de SCG emiten relativamente más CO<sub>2</sub> que los adicionados con 10%, resultado que se ratifica con los datos de DHasa, como discutiremos a continuación.

La DHasa (enzima intracelular indicativa de actividad biológica del suelo; Defrieri et al., 2011) en el suelo Rojo es significativamente más alta en las muestras con 2.5% de SCG, siendo afectada negativamente con la adición de 10% de SCG (**Tabla 17** y **Tabla 20**), con valores similares en muestras sin adicionar de SCG. El suelo de Vega tiene menos actividad biológica que el suelo Rojo, incluso con la misma adición de SCG, probablemente debido a la SOM más estabilizada en el suelo de Vega, o porque esta SOM está ocluida en agregados y/o cubierta por partículas minerales (**Figura 52f**).

Es difícil de explicar la falta de coincidencia de los resultados de RR con los de la DHasa, ya que ambos parámetros representan la actividad global de los microorganismos del suelo. En ambos suelos, la RR se incrementa significativamente con el contenido de SCG, es decir, es mayor para 10% que para 2.5% y, sin embargo, ocurre lo contrario con la DHasa, donde se percibe una disminución significativa cuando se incrementa la cantidad de SCG de 2.5 a 10% SCG. Cuando se adiciona SCG cambia la estructura de la comunidad

bacteriana del suelo (como ya indicamos en el apartado de resultados y discusión correspondiente al Ensayo 3) y también podemos hipotetizar que por encima de un determinado umbral de contenido en SCG parte de la actividad biológica se frena por la toxicidad de los SCG. Estas alteraciones de la biología del suelo con la adición de SCG podrían tener consecuencias en la correlación entre DHasa y la RR. El índice de germinación (GI) ha sido usado comúnmente para valorar la posible fitotoxicidad de un material; un GI superior al 100% significa la ausencia de toxicidad y también indica que es un buen sustrato para el crecimiento de las plantas (Comino et al., 2017). El GI (**Tabla 20**) disminuye con la incorporación de SCG, pero no significativamente, dando valores por encima del rango de toxicidad del 60% (Zucconi et al., 1981) o del 50% (Eshetu, 2013), y muy lejos de los obtenidos para la muestra de SCG (35%), y por lo tanto claramente fitotóxico, mostrando su capacidad para afectar el crecimiento de las plantas. La fitotoxicidad de SCG también se ha demostrado tanto en ensayos de campo (Yamane et al., 2014), ensayos de invernadero (Vardon et al., 2013) como en ensayos *in vitro* (Hardgrove y Livesley, 2016). Este hecho se ha atribuido a algunos compuestos tóxicos de SCG como la cafeína, los taninos y los polifenoles (Leifa et al., 2010).

Todos los parámetros relacionados con la hidrofobicidad están significativamente relacionados con la tasa de respiración (**Tabla 19**), lo que indica que una mayor hidrofobicidad está asociada con una mayor respiración del suelo, siendo realmente dependiente de la cantidad de SCG adicionado y no estando relacionada con el tipo de suelo (**Tabla 17** y **Tabla 20**). Esto es contrario a lo establecido por Leemanie (2016), quien encontró una correlación lineal negativa moderada entre la respiración del suelo y el ángulo de contacto suelo-agua. Por otro lado, la correlación negativa entre CA-H<sub>2</sub>O e GI parece indicar un efecto negativo de la hidrofobicidad sobre el crecimiento de las plantas, pero nuevamente esto está asociado también al contenido de SCG (**Tabla 19**).

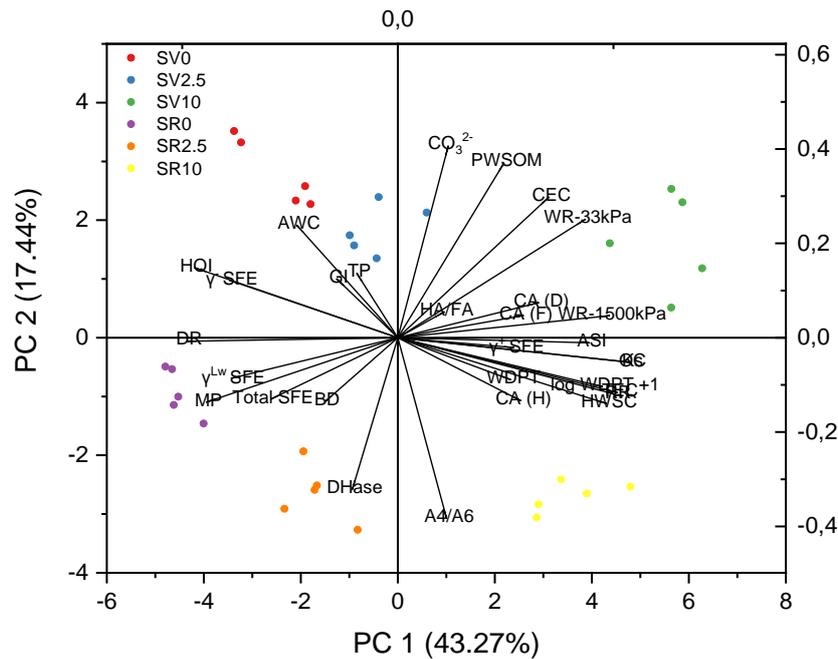


**Figura 53.** Tasa de respiración acumulativa ( $\text{mg CO}_2\text{-C g}^{-1}$ ) durante 30 días de incubación.  
a) Suelo Rojo (SR); b) Suelo de la Vega (SV).

Se realizó un ANOVA multifactor para determinar el control que la dosis de SCG y el tipo de suelo (siendo estas variables las que mostraron mayores diferencias significativas, **Tabla 17**) ejercen sobre los parámetros de la hidrofobicidad (**Tabla 18**) y los parámetros de calidad del suelo (**Tabla 20**). Las interacciones más significativas entre la dosis de SCG y el tipo de suelo se observaron en el caso de las propiedades químicas y fisicoquímicas (pH,  $\text{CaCO}_3$  eq., HWSC y A4/A6, **Tabla 20**), lo que también fue reportado por Comino et

al. (2020). La interacción de estos dos factores no influye en los parámetros físicos y biológicos (**Tabla 20**) y, en el caso de los parámetros relacionados con la hidrofobicidad, solo se observa en WDPT, sin embargo, el efecto es menor de lo que la dosis de SCG tendría por sí sola.

También se realizó un análisis de componentes principales para reducir y explicar la variabilidad del sistema. Se seleccionó una matriz que contiene todos los resultados obtenidos a lo largo del experimento. En la **Figura 54** se muestran los valores de puntuación de las muestras en el espacio definido por PC1 y PC2, que capturaron el 60.71% de la varianza. El primer componente, que explica el 42.56% de varianza, agrupa las muestras según la dosis de SCG, siendo las muestras con 10% de SCG las que tienen los valores más altos en este PC. El parámetro más importante en este PC es el CO, que presenta una carga de 0.27, seguido de HWSC, TEC, WDPT,  $W_{33}$ ,  $W_{1500}$  y CA. El segundo componente, que explica el 17.44% de varianza, agrupa las muestras según el tipo de suelo, presentando las muestras del suelo de Vega valores positivos en este componente y mientras que las muestras del suelo Rojo presentan valores negativos. El parámetro dominante en este componente es el contenido de carbonatos, con una carga de 0.41, seguido de PWSOM, CIC y AU para valores positivos, mientras que los valores negativos se deben principalmente a la influencia de DHasa y A4/A6. Así mismo, este análisis corrobora la alta correlación entre las propiedades relacionadas con la hidrofobicidad (WDPT y CA) con ASI, CO y retención de agua. Todos estos parámetros se encuentran cerca de las muestras con 10% SCG. Por otro lado, la mayor actividad de DHasa del suelo Rojo también se corrobora y domina en las muestras con 2.5% de SCG. En las puntuaciones negativas del PC1 también aparece el parámetro A4 / A6 que indica una menor evolución de AH en este suelo.



**Figura 54.** Gráfico superpuesto de las puntuaciones de las muestras obtenidas del análisis de componentes principales y cargas de cada parámetro analizado. Abreviaturas correspondientes a la **Tabla 17**.

#### 4.4.5. Consideraciones finales

La adición de SCG como materia fresca a dos suelos agrícolas Mediterráneos modificó muchas de sus propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas y biológicas relacionadas con la calidad del suelo, destacando las propiedades relacionadas con la hidrofobicidad del suelo. Específicamente, los SCG influyeron en la hidrofobicidad del suelo, aumentando el WDPT y el CA.

Además, este residuo modificó los equilibrios preexistentes en el suelo entre el carácter donante y aceptor de acuerdo con el modelo de van Oss, disminuyendo el carácter de electrodonor que es característico de la fracción mineral. Esta influencia en la hidrofobicidad tuvo un efecto diferencial y determinante, dependiendo del tipo de suelo, aumentando en mayor medida en suelo Rojo, más arenoso, decarbonatado y pobre en esmectita. La

hidrofobicidad y la retención de agua a diferentes potenciales se relacionaron positivamente. Sin embargo, se detectó una relación negativa y significativa con el contenido de agua disponible. Dada la importancia de la disponibilidad de agua para la planta en suelos agrícolas, se necesita más investigación cuando se utilizan materias primas orgánicas con un fuerte carácter hidrófobo. La relación positiva entre los SCG y la hidrofobicidad y los cambios observados en la estructura del suelo, con un mayor grado de agregación, porosidad y estabilidad estructural, nos permiten establecer una relación entre la hidrofobicidad, el desarrollo y la estructura de las hifas de hongos. La adición de SCG estimuló la actividad biológica, aunque las dosis altas parecen limitar algunos parámetros, como la DHasa. La relación positiva entre la hidrofobicidad y la actividad biológica parece coherente con la literatura, lo que podría justificarse por la estimulación de la actividad fúngica que a su vez genera hidrofobicidad.

En general, la adición de SCG podría considerarse positiva desde la perspectiva de la calidad del suelo, aunque algunos parámetros denotan una tendencia opuesta. Por lo tanto, los protocolos de manejo del suelo deben adaptarse cuidadosamente a la calidad de la enmienda orgánica utilizada y al tipo de suelo de un sistema agroambiental dado.



## **4.5. ENSAYO 5. EFECTOS DE LAS DOSIS CRECIENTES DE LOS SCG SOBRE EL SISTEMA SUELO-PLANTA**

### **4.5.1. Efectos sobre la nutrición mineral de la planta**

#### *Conocimiento previo*

Durante la segunda mitad del siglo XX, el rendimiento agrícola aumentó gracias a la mejora de variedades de cultivo, uso de pesticidas y fertilizantes inorgánicos, con la consiguiente intensificación del terreno, dando lugar a una pérdida de materia orgánica y biodiversidad (Schrama et al., 2018). La agricultura orgánica o ecológica (“organic farming”) ha sido propuesta como una solución para revertir esta tendencia, caracterizada por la prohibición del uso de fertilizantes sintéticos y pesticidas (Le Campion et al., 2019), así como por el incremento de materia orgánica del suelo como resultado de la adición de grandes cantidades de materiales orgánicos al mismo (Gattinger et al., 2012).

Los nutrientes son esenciales tanto para el crecimiento del cultivo como para la producción. La mayoría de los elementos que necesita la planta proceden del suelo y hay varias formas de reponer estos nutrientes: mediante fertilizantes inorgánicos, los cuales presentan formas fácilmente asimilables para los cultivos y las enmiendas orgánicas, las cuales presentan formas menos accesibles con necesidad de tiempos mayores para su asimilación. Por otro lado, el uso de fertilizantes inorgánicos tiene efectos negativos medioambientales para el suelo, el aire y el agua (Rashmi et al., 2020).

Una de las formas para aumentar el contenido de nutrientes, en especial de micronutrientes en la planta, es lo que se conoce como biofortificación agronómica (como ya adelantábamos en el Capítulo de Introducción). La biofortificación agronómica se logra mediante la aplicación de fertilizantes con micronutrientes al suelo y/o la aplicación foliar directamente a las hojas del cultivo (de Valença et al., 2017). La disponibilidad de nutrientes del suelo está influenciada por muchos factores (pH, materia orgánica, aireación, humedad,

interacción con otros elementos). El manejo del suelo mediante la adición de enmiendas orgánicas puede alterar propiedades del suelo como el pH y el estímulo de la biodisponibilidad de los nutrientes (Alloway, 2009). Una enmienda con pequeñas cantidades de (múltiples) micronutrientes se ha sugerido como una estrategia sostenible para aumentar los rendimientos y la calidad nutricional de los cultivos (de Valença et al., 2017).

### ***Efecto secuencial de los SCG sobre el pH del suelo***

Como ya se ha discutido en los apartados sobre el efecto de los SCG en el suelo, la adición de este bio-residuo modifica las propiedades químicas, físicas y fisicoquímicas del suelo. Una de las propiedades altamente relacionadas con la disponibilidad de nutrientes en el suelo es el pH. En este sentido, como ya indicamos en el capítulo de Materiales y Métodos, la adición de SCG al suelo de Vega disminuyó significativamente el pH (pH inicial), debido a la mayor acidez de los SCG, principalmente en suelos adicionados con altos porcentajes de SCG (**Tabla 21**). Este incremento del pH coincide con lo reportado por otros autores (Hardgrove y Livesley, 2016; Kim et al., 2014). De manera similar, la adición de NPK también disminuyó el pH inicial de los suelos lo que coincide con Hardgrove y Livesley (2016). La disminución del pH podría movilizar algunos elementos y hacerlos disponibles para las plantas debido a sustitución de cationes por protones en los sitios de unión del suelo (Pauget et al., 2012). Sin embargo, tras 40 días de cultivo, los valores de pH (pH final) tienden a incrementar debido a la capacidad amortiguadora de los suelos carbonatados (suelo de Vega).

**Tabla 21.** Valores de pH de los suelos agrícolas donde se cultivaron las muestras de lechugas estudiadas. Los datos son representados como media  $\pm$  SD.

Muestra	pH inicial	pH final
0% SCG	8.3 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	8.3 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
1-5% SCG	7.6 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	8.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
7.5-15% SCG	7.0 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	7.9 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>
NPK	7.5 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	8.0 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los valores de pH entre tratamientos.

### ***Efecto secuencial de los SCG sobre la nutrición mineral de lechugas***

La **Tabla 22** muestra la concentración de los elementos esenciales (Mg, Si, P, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Mo y N) y tóxicos (As, Pb, Cd y Al) en lechugas *baby* (lechugas sin cultivar), lechugas cultivadas en suelos adicionados con SCG (bajos porcentajes de SCG: 1, 2, 2.5 y 5%; y altos porcentajes de SCG: 7.5, 10, 12.5 y 15%), lechugas cultivadas sin SCG (0% SCG) y lechugas cultivadas con fertilizante NPK. Para entender los resultados incluidos en esta tabla, se realizó un análisis comparativo entre los resultados de las diferentes muestras de lechugas agrupadas en cinco categorías.

#### *Concentración de elementos en lechugas baby (lechugas sin cultivar) vs. Concentración de elementos en lechugas cultivadas con 0% de SCG*

Entre todos los elementos analizados, sólo las concentraciones medias de P, Cu y Mo disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) en las hojas de lechuga cultivadas durante 40 días en suelos agrícolas sin adición de SCG. Por el contrario, se incrementaron significativamente las cantidades de Cd y Si, lo que parece indicar que el tiempo de cultivo facilitó la toma de estos elementos por la planta.

**Tabla 22.** Contenido de elementos minerales esenciales y tóxicos \* en muestras de lechuga. Los datos son representados como medias  $\pm$  SD.

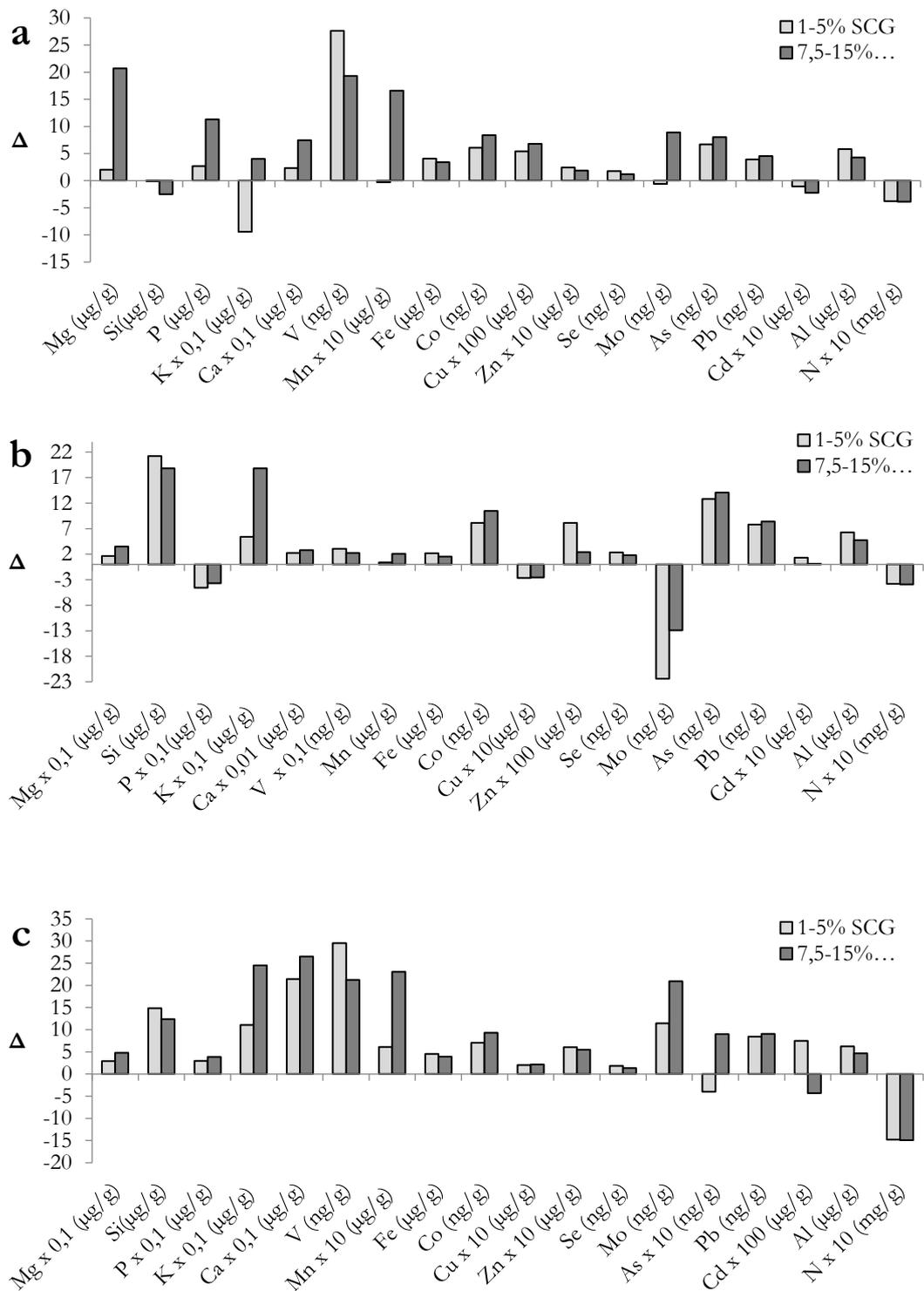
Elemento (unidad)	0% SCG	1-5% SCG	7,5-15% SCG	NPK	Lechuga <i>baby</i>
Mg ( $\mu\text{g/g}$ )	109 $\pm$ 23	111 $\pm$ 26	130 $\pm$ 34 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	95 $\pm$ 9.1
Si ( $\mu\text{g/g}$ )	21 $\pm$ 10	21 $\pm$ 9.9 <sup>a</sup>	19 $\pm$ 11	6.4 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	No detectado
P ( $\mu\text{g/g}$ )	94 $\pm$ 15 <sup>a,b</sup>	97 $\pm$ 15 <sup>c,d</sup>	105 $\pm$ 21 <sup>e,f</sup>	67 $\pm$ 6.7 <sup>a,c,e,g</sup>	143 $\pm$ 15 <sup>b,d,f,g</sup>
K ( $\mu\text{g/g}$ )	1377 $\pm$ 141	1283 $\pm$ 201	1417 $\pm$ 232	1172 $\pm$ 90	1229 $\pm$ 127
Ca ( $\mu\text{g/g}$ )	489 $\pm$ 108 <sup>a,b</sup>	512 $\pm$ 112 <sup>c,d</sup>	563 $\pm$ 130 <sup>e,f</sup>	298 $\pm$ 11 <sup>a,c,e</sup>	289 $\pm$ 24 <sup>b,d,f</sup>
V (ng/g)	7.7 $\pm$ 6.0 <sup>a,b</sup>	35 $\pm$ 18 <sup>a,c,d</sup>	27 $\pm$ 14 <sup>b,e,f</sup>	5.8 $\pm$ 4 <sup>c,e</sup>	4.8 $\pm$ 0.57 <sup>d,f</sup>
Mn ( $\mu\text{g/g}$ )	1.4 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.42 <sup>b,c,d</sup>	3.1 $\pm$ 0.72 <sup>a,b,e,f</sup>	0.81 $\pm$ 0.17 <sup>c,e</sup>	1.0 $\pm$ 0.05 <sup>d,f</sup>
Fe ( $\mu\text{g/g}$ )	2.0 $\pm$ 0.98 <sup>a,b</sup>	6.0 $\pm$ 2.6 <sup>a,c</sup>	5.4 $\pm$ 2.3 <sup>b,d,e</sup>	1.5 $\pm$ 0.44 <sup>c,d</sup>	3.9 $\pm$ 0.25 <sup>e</sup>
Co ( $\mu\text{g/g}$ )	4.5 $\pm$ 1.5 <sup>a,b</sup>	11 $\pm$ 4.3 <sup>a,c,d</sup>	13 $\pm$ 3.9 <sup>b,e,f</sup>	3.4 $\pm$ 0.99 <sup>c,e</sup>	2.4 $\pm$ 0.02 <sup>d,f</sup>
Cu ( $\mu\text{g/g}$ )	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>a,b</sup>	0.46 $\pm$ 0.07 <sup>c,d</sup>	0.47 $\pm$ 0.12 <sup>e,f</sup>	0.26 $\pm$ 0.04 <sup>a,c,e,g</sup>	0.73 $\pm$ 0.08 <sup>b,d,f,g</sup>
Zn ( $\mu\text{g/g}$ )	0.67 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.19 <sup>a,b</sup>	0.86 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>	0.31 $\pm$ 0.14 <sup>b,c,d</sup>	0.84 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>
Se (ng/g)	2.0 $\pm$ 1.1	3.7 $\pm$ 2.1	3.2 $\pm$ 2.1	1.8 $\pm$ 1.3	1.4 $\pm$ 0.07
Mo (ng/g)	20 $\pm$ 6.0 <sup>a,b</sup>	19 $\pm$ 5.7 <sup>c,d</sup>	29 $\pm$ 22	7.8 $\pm$ 1.8 <sup>a,c,e</sup>	42 $\pm$ 5.2 <sup>b,d,e</sup>
N (mg/g)	1.1 $\pm$ 0.13 <sup>a,b,c</sup>	0.72 $\pm$ 0.20 <sup>a,d,e</sup>	0.71 $\pm$ 0.19 <sup>b,f,g</sup>	2.2 $\pm$ 0.10 <sup>c,d,f</sup>	1.1 $\pm$ 0.12 <sup>e,g</sup>
*As (ng/g)	13 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	20 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	21 $\pm$ 5.3 <sup>a,c</sup>	21 $\pm$ 3.0 <sup>d</sup>	7.4 $\pm$ 0.85 <sup>b,c,d</sup>
*Pb (ng/g)	8.9 $\pm$ 4.7	13 $\pm$ 5.0 <sup>a,b</sup>	13 $\pm$ 9.4	4.4 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	5.0 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
*Cd ( $\mu\text{g/g}$ )	0.237 $\pm$ 0.073 <sup>a,b,c</sup>	0.133 $\pm$ 0.097 <sup>d,e,f</sup>	0.015 $\pm$ 0.008 <sup>a,d,g,h</sup>	0.058 $\pm$ 0.008 <sup>b,e,g,i</sup>	0.003 $\pm$ 0.001 <sup>c,f,h,i</sup>
*Al ( $\mu\text{g/g}$ )	1.4 $\pm$ 1.4 <sup>a,b</sup>	7.2 $\pm$ 3.8 <sup>a,c,d</sup>	5.7 $\pm$ 2.9 <sup>b,e,f</sup>	0.97 $\pm$ 0.69 <sup>c,e</sup>	0.92 $\pm$ 0.07 <sup>d,f</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Las mismas letras en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de este elemento en las muestras de lechuga entre tratamientos.

Pinto et al. (2014) estudiaron la influencia del estado de crecimiento de las lechugas en su propio valor nutricional. En este sentido, encontraron que las lechugas más jóvenes tenían un mayor valor nutricional que las lechugas adultas, lo que es contrario a los resultados de nuestro trabajo. Estos autores, también concluyen que el valor nutricional de las lechugas está fuertemente relacionado con el tipo de suelo. Por tanto, la diferencia en el comportamiento encontrado en nuestro ensayo con respecto a lo encontrado por estos autores puede ser también atribuido al hecho de que ellos utilizan un sustrato rico en carbono orgánico (50% aprox.) mezclado con un material arenoso (más del 80% de arena), con un pH neutro (6.8). En nuestro estudio, el suelo de Vega es un suelo agrícola arcilloso, con bajos contenidos en carbono orgánico, rico en carbonatos y con un pH moderadamente alcalino (8.2) (**Tabla 3**). De acuerdo con Ceglie et al. (2015), la respuesta de la planta está relacionada con las características físicas, químicas y fisicoquímicas del medio de crecimiento empleado. En este sentido, los sustratos ricos en materia orgánica tienen una mayor capacidad de retener y bloquear nutrientes (Ociepa et al., 2013). Por tanto, los elementos podrían ser bloqueados en la matriz del suelo (material muy orgánico) y podría no estar biodisponibles para la planta.

*Concentraciones de elementos de lechugas cultivadas en suelos agrícolas adicionados de bajos (1-5%) y altos (7.5-15%) porcentajes de SCG vs. Concentraciones de elementos en lechugas cultivadas sin adición de SCG*

La comparación de la concentración de elementos en lechugas cultivadas durante 40 días en suelos adicionados de SCG (1-5% SCG y 7.5-15% SCG) y lechugas cultivadas sin adición de SCG muestra un incremento significativo en la concentración de varios elementos (**Tabla 22, Figura 55a**) como V, Fe y Co ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, las concentraciones medias de Mn y



**Figura 55.** Aumento relativo ( $\Delta$ ) en el contenido de elementos minerales en lechugas cultivadas durante 40 días en suelos adicionados de SCG (porcentajes altos y bajos de SCG) en comparación con otros grupos de lechugas: a) Lechuga cultivada durante 40 días sin SCG b) Lechuga *baby* c) Lechuga cultivada durante 40 días con NPK. Las unidades de cada elemento son diferentes, de modo que los datos se han multiplicado o dividido para adaptar la altura de las barras para representarlas en el gráfico.

en Zn en lechugas fue significativamente mayor sólo cuando las lechugas fueron cultivadas en suelos agrícolas adicionados con altas y bajas cantidades de SCG, respectivamente. Específicamente para el N, la adición de bajos y altos porcentajes de SCG disminuyó su concentración en las lechugas (**Tabla 22, Figura 55a**), lo que está directamente relacionado con la biomasa y la productividad. Como ya fue reportado anteriormente, esta limitación en la absorción de N por las lechugas puede ser debido al crecimiento de microorganismos presentes en suelos agrícolas, lo que debe de ser estudiado en futuros trabajos.

En relación con los elementos tóxicos, la concentración media de Al incrementó al adicionarse los SCG en bajos y altos porcentajes. En el caso del As, este elemento sólo incrementó para altos porcentajes de SCG. Por el contrario, la concentración media de Cd disminuyó significativamente en las lechugas, pero sólo en aquellas cultivadas con altos porcentajes de SCG.

Cruz et al. (2014b) encontró el mismo efecto (un incremento de los elementos) en las lechugas cultivadas con SCG compostados o cultivados con SCG directamente transformados en el suelo. Sin embargo, estos autores encontraron efectos contrarios cuando adicionaron SCG frescos. Lo último puede ser atribuido a que los autores cultivaron lechugas en sustratos orgánicos, los cuales tienen características muy diferentes a los suelos utilizados en este estudio, en términos del contenido en carbono orgánico, pH, humedad, densidad aparente, N, etc. (Cruz et al., 2012). Las diferencias en la nutrición de la planta en relación con el tipo de suelo han sido indicadas también por Pinto et al. (2014) y Ceglie et al. (2015), como ya señalamos en la sección anterior. Además, el uso de sustratos orgánicos en investigaciones relacionadas con la nutrición de la planta puede tener la desventaja de obtener resultados que no puedan ser extrapolables a la realidad agrícola. Así, durante los últimos años, ha crecido una cierta preocupación por el impacto ambiental asociado a la extracción de la turba (Bullock et al., 2009). Además, la turba, utilizada como

un medio estándar en la producción de plántulas convencionales y orgánicas ha sido considerado como un recurso no renovable (Ceglie et al., 2015).

Como anteriormente se ha indicado, el pH del suelo inicialmente disminuye cuando los SCG fueron adicionados al suelo. Sin embargo, la capacidad amortiguadora del suelo incrementó los valores de pH durante el ensayo hasta valores cercanos a la neutralidad (**Tabla 21**). Para calcular la influencia del pH sobre la concentración de elementos de la lechuga, hemos considerado más exacto emplear la media entre el pH inicial (0 días) y el pH final (40 días). El pH del suelo se relacionó de manera lineal, negativa y significativa con varios elementos esenciales como el Mg ( $r = -0.409$ ), Al ( $r = -0.399$ ), Ca ( $r = -0.465$ ), V ( $r = -0.395$ ), Mn ( $r = -0.835$ ), Fe ( $r = -0.404$ ), Co ( $r = -0.634$ ), As ( $r = -0.529$ ) y Pb ( $r = -0.380$ ) y positiva con el Cd ( $r = 0.564$ ) y N ( $r = 0.461$ ). Por tanto, valores de pH bajos parece mejorar la biodisponibilidad de mayoría de los elementos esenciales y la absorción de los mismos por las lechugas. La influencia del pH del suelo sobre la biodisponibilidad de nutrientes ha sido ampliamente descrita en la bibliografía (Sposito, 2016).

*Concentración de elementos en lechugas cultivadas en suelos adicionados con bajos (1-5%) y altos (7.5-15%) porcentajes de SCG vs. Cantidades de elementos en lechugas baby (lechugas sin cultivar).*

Se encontró un incremento significativo en las concentraciones de Ca, V, Mn y Co ( $p < 0.05$ ; **Tabla 22, Figura 55b**) cuando se compararon las concentraciones de los elementos de las lechugas *baby* con aquellas cultivadas durante 40 días en suelos adicionados con SCG (altos y bajos porcentajes de SCG). Sin embargo, las concentraciones de Fe fueron sólo significativamente mayores en las lechugas cultivadas con altos porcentajes de SCG. Por el contrario, los niveles de P, Cu, y N en lechugas disminuyeron para altos y bajos porcentajes de SCG. Además, la concentración de Mo también disminuyó, pero solo para bajos porcentajes de SCG. En relación a los elementos tóxicos, la

adición de bajos y altos porcentajes de SCG incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) los niveles de Al en lechugas. Adicionalmente, las concentraciones de As y Cd también se incrementaron significativamente solo para altos porcentajes mientras que la concentración de Pb también se incrementó significativamente pero sólo a bajos porcentajes de SCG. Estos resultados muestran el uso potencial de los SCG como enmienda orgánica de suelos, ya que esta práctica agrícola facilita la biofortificación de las lechugas, incrementando muchos elementos esenciales y por tanto mejorando su valor nutricional. Sin embargo, de una manera contraproducente, el uso de SCG incrementa la concentración de elementos tóxicos, aunque estas concentraciones son muy bajas y no supondría ningún problema para la salud humana, como se discutirá posteriormente.

Estos resultados no coinciden con los encontrados por Pinto et al. (2014), los cuales establecieron que el valor nutricional de las lechugas jóvenes era mayor que el de las lechugas adultas, excepto para la concentración de K. La adición de SCG modifica esta tendencia: las lechugas adultas tienen un mayor valor nutricional que las lechugas *baby*. Esto puede ser atribuido a las diferencias en el suelo utilizado en este ensayo y por Pinto et al. (2014), como indicamos en la anterior sección.

#### *Concentración de elementos en lechugas cultivadas en suelos adicionados con fertilizante NPK vs. Concentración de elementos en lechugas sin adición de SCG*

Una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en P, Ca, Cu, Mo y Cd fue encontrado en muestras de lechuga cultivadas con fertilizante NPK cuando se compararon con aquellas cultivadas con 0% SCG. Este resultado indica que la fertilización inorgánica convencional no mejora la concentración de elementos en lechuga en relación a elementos esenciales como el Ca, Cu y Mo. Esto sucede a pesar del hecho de que, como hemos indicado anteriormente, la adición de NPK disminuye el pH del suelo (**Tabla 21**), y tal disminución podría

incrementar la biodisponibilidad de nutrientes en el suelo. Este resultado y aquellos que estableceremos posteriormente (relacionados con la comparación entre los tratamientos con SCG y NPK), indican que la fertilización inorgánica no mejora la concentración de elementos en lechuga. La agricultura convencional no solo reduce la calidad nutricional de los cultivos, sino que también incrementa el uso de residuos de pesticidas, promueve la pérdida de biodiversidad y servicios ecosistémicos y reduce la calidad del suelo (Reganold y Wachter, 2016). Por el contrario, la fertilización convencional de suelos agrícolas mejoró significativamente la concentración de N de las lechugas cultivadas en ellos ( $p < 0.05$ , **Tabla 22**). Sin embargo, un resultado interesante fue que la fertilización inorgánica disminuyó la absorción de Cd como elemento tóxico para la planta.

*Concentración de elementos en lechugas cultivadas con fertilizante NPK vs. Concentración de elementos en lechugas cultivadas con bajos (1-5%) y altos (7.5-15%) porcentajes de SCG*

Cuando se comparan las concentraciones de elementos de lechugas cultivadas en suelos agrícolas adicionados con NPK como fertilizante inorgánico convencional (agricultura convencional) con aquellas cultivadas en suelos adicionados con bajos y altos porcentajes de SCG (agricultura orgánica), se encontró una disminución significativa en P, Ca, V, Mn, Fe, Co, Cu y Zn (**Tabla 22, Figura 55c**;  $p < 0.05$ ). Además, las concentraciones de Mg disminuyeron también significativamente pero sólo para altos porcentajes de SCG, así como las concentraciones de Si y Mo lo hicieron sólo para bajos porcentajes de SCG. En relación a los elementos tóxicos, se produjo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de las concentraciones de Cd y Al. Sin embargo, las concentraciones de Pb también disminuyeron significativamente solo en el caso de la adición de bajos porcentajes de SCG.

Estos resultados son de gran interés ya que se compara una práctica de agricultura convencional (como es añadir NPK como fertilizante inorgánico)

con la adición de un bio-residuo (SCG) como enmienda orgánica. Como ya se estableció anteriormente, la adición de SCG podría ser un método de biofortificación efectiva de elementos esenciales como P, Ca, V, Mn, Fe, Co, Cu y Zn, y probablemente Mg, Si y Mo en lechugas, lo que supone un incremento de los valores nutrientes en ellas. Esta mejora de elementos podría contrarrestar el déficit de N y la inhibición del crecimiento. Un aspecto negativo de la adición de SCG como enmienda orgánica a suelos agrícolas fue el incremento de elementos tóxicos como el Cd y Al, y probablemente Pb, aunque las ligeras implicaciones que tienen estos incrementos serán discutidas posteriormente. Sin embargo, estos resultados son diferentes de aquellos encontrados por Herencia et al. (2011), quienes concluyen que no es posible evaluar la mayor calidad nutricional de los cultivos orgánicos sólo siguiendo el criterio del tipo de fertilización usada, cuando se compara la calidad nutricional de cultivos desarrollados en suelos con fertilización orgánica y convencional.

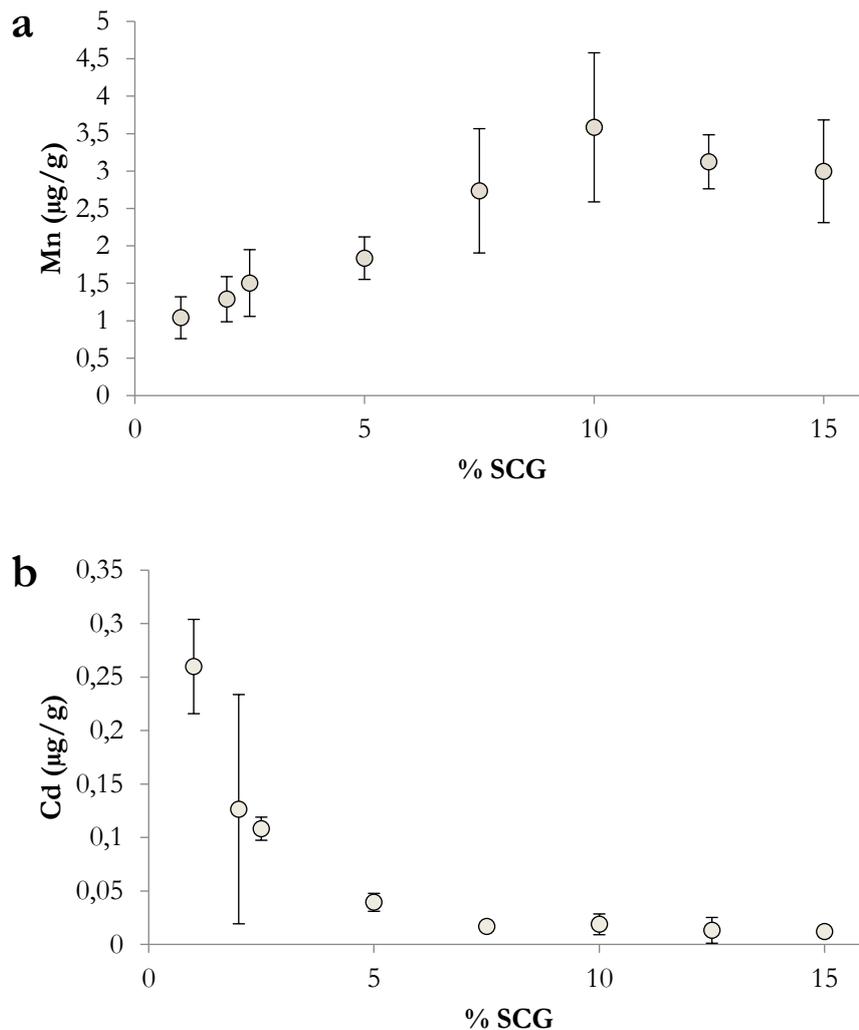
Nuestros resultados además son interesantes desde el punto de vista de obtener alimentos con la etiqueta de identificación de Producción Integrada. La adición de SCG como bio-residuo *vs.* la adición de un fertilizante inorgánico NPK, además de incrementar el valor nutricional de las lechugas, tiene otros efectos positivos sobre el medio ambiente, asegurando la implementación de buenas y prácticas agrícolas sostenibles, debido a la consecuente disminución del uso de fertilizantes convencionales (NPK) en nuestros cultivos. Este punto ha sido ya establecido en el apartado de Resultados y Discusión correspondiente al Ensayo 1 de la presente tesis, en el cual establecimos que la adición SCG aportaba nutrientes (N, P y K), con la consiguiente reducción de la necesidad de uso de fertilizantes inorgánicos.

*Influencia del incremento de los porcentajes de SCG (1, 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15%) sobre las concentraciones de elementos nutrientes en lechugas*

En este apartado se han evaluado la influencia del progresivo incremento de los porcentajes de los SCG adicionados al suelo sobre el contenido final de los elementos analizados en las lechugas (**Tabla 23**). Se observó una tendencia al incremento en la mayoría de los elementos estudiados cuando se incrementaba la dosis de SCG. Sin embargo, observando el comportamiento de las concentraciones de la mayoría de los elementos, encontramos que estas tendencias no eran lineales (sino que mostraban un comportamiento de “dientes de sierra”), excepto para el caso del Mn (**Figura 56a**), donde se observó un incremento lineal de ese elemento con la adición de SCG. El incremento general de los elementos debido a la adición de SCG u otros residuos del café ha sido relacionado con la capacidad quelante de algunos de sus componentes como son las melanoidinas, polifenoles o carbohidratos (Morikawa y Saigusa, 2008). En este sentido, Rufián-Henares y de la Cueva (2009) determinaron la capacidad quelante de las melanoidinas extraídas del café con respecto al Fe y observaron cómo estos compuestos disminuían el Fe libre mientras incrementaba el Fe quelado. Específicamente, el 50% del Fe fue quelado por las melanoidinas del café en una concentración de 2.5 mg/ml. Estos quelatos formados por melanoidinas y otras moléculas quelantes se liberaría poco a poco, mientras los SCG se degradan en el suelo. En este sentido, los SCG podrían llegar a ser fertilizantes de liberación lenta. Por tanto, en futuros estudios sería necesario determinar cuál de los componentes anteriormente citados (melanoidinas, polifenoles y/o carbohidratos) son responsables del incremento de las concentraciones de diferentes elementos en lechugas tras la adición de SCG. Como dijimos anteriormente, esta actividad podría ser considerada como un efecto biofortificante.

**Tabla 23.** Niveles de los elementos minerales las lechugas cultivadas durante 40 días con cantidades crecientes de SCG.

SCG (%)	Mg (µg/g)	Si (µg/g)	P (µg/g)	K (µg/g)	Ca (µg/g)	V (ng/g)	Mn (µg/g)	Fe (µg/g)	Co (ng/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)	Se (ng/g)	Mo (ng/g)	As (ng/g)	Pb (ng/g)	Cd (µg/g)	Al (µg/g)
1	91.0	16.45	89.6	1153	433.6	29.26	1.04	4.73	8.12	0.44	1.00	3.25	17.76	17.51	11.50	0.26	5.61
2	115.8	25.59	98.0	1289	525.7	40.12	1.29	6.60	11.70	0.47	0.95	4.51	17.10	20.41	13.11	0.13	8.56
2.5	117.7	14.00	97.7	1344	532.5	21.84	1.50	4.41	8.64	0.46	0.78	2.46	22.75	18.26	9.60	0.11	4.45
5	121.4	28.70	102.1	1346	557.6	49.97	1.84	8.39	14.13	0.46	0.93	4.58	19.04	24.69	17.15	0.04	10.15
7.5	152.7	20.40	116.7	1544	651.2	23.30	2.74	5.29	14.01	0.54	1.09	2.22	30.85	18.49	11.31	0.02	5.42
10	119.5	11.24	89.3	1388	539.0	16.68	3.58	3.69	11.23	0.42	0.68	1.88	44.92	19.67	7.63	0.02	3.39
12.5	129.2	24.78	106.8	1361	561.9	40.70	3.12	7.26	14.66	0.50	0.87	5.14	23.09	27.20	23.52	0.01	8.21
15	119.4	18.97	109.5	1374	503.7	27.48	3.00	5.30	11.71	0.42	0.81	3.49	15.84	21.20	11.23	0.01	5.66



**Figura 56.** Influencia del aumento de los porcentajes de SCG sobre las concentraciones de Mn (a) y Cd (b).

Los elementos tóxicos (As, Pb, Cd y Al) muestran el mismo comportamiento irregular descrito en los elementos esenciales (**Tabla 23**), exceptuando el caso del Cd. El contenido en Cd en planta disminuyó proporcionalmente a las cantidades añadidas de SCG. Este efecto es totalmente opuesto al comportamiento del Mn. Probablemente ciertos compuestos de los SCG forman complejos insolubles con el Cd del suelo limitando su absorción por la planta. En los últimos años se ha indicado como los fertilizantes orgánicos (como los SCG) son efectivos en la inmovilización de metales pesados en suelos contaminados (Wu et al., 2017). En nuestro estudio, los resultados obtenidos son muy interesantes en el caso de suelos agrícolas que

contienen altas concentraciones de Cd, ya que la adición de SCG como enmienda orgánica podría limitar la disponibilidad del Cd y por tanto el contenido final de este elemento tóxico en la planta. En este sentido, la adición de SCG como enmiendas orgánicas podría ser un método efectivo para remediar suelos contaminados, ya que este residuo contiene muy poca cantidad de metales pesados y puede retenerlos mediante quelación (Kim et al., 2014). Estos investigadores encontraron que la biodisponibilidad de metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) disminuyó en suelos tratados con SCG o biochar de SCG, lo que coincide con los resultados de esta tesis.

### ***Correlación entre los elementos de las lechugas cultivadas en suelos adicionados de SCG como enmienda orgánica***

Hay muchas correlaciones estadísticamente lineales y positivas entre los elementos analizados en las lechugas (**Tabla 24**). Aquellas relaciones con un alto coeficiente de correlación ( $r \geq 0.800$ ) han sido señaladas: Ca y Mg ( $r = 0.941$ ), Fe y V ( $r = 0.949$ ), K y Mg ( $r = 0.851$ ), Fe y Si ( $r = 0.828$ ), Co y V ( $r = 0.827$ ), Se y V ( $r = 0.881$ ), Fe y Co ( $r = 0.866$ ) y Se y Fe ( $r = 0.861$ ). En el caso de los elementos tóxicos, los altos coeficientes de correlación ( $r \geq 0.800$ ) han sido establecidos para las relaciones entre Al y V ( $r = 0.992$ ), Al y Fe ( $r = 0.962$ ), Al y Co ( $r = 0.852$ ), y Al y Se ( $r = 0.886$ ). Por otro lado, el Cd presentó relaciones negativas significativas con el P ( $r = -0.522$ ), Cu ( $r = -0.461$ ), y Mn ( $r = -0.437$ ). Además, hay que destacar que el N se relacionó de manera lineal, negativa y significativa con varios elementos esenciales como el Mn ( $r = -0.366$ ), Fe ( $r = -0.381$ ), Co ( $r = -0.468$ ), Mg ( $r = -0.371$ ), Ca ( $r = -0.406$ ), Cu ( $r = -0.405$ ), Zn ( $r = -0.404$ ) así como para el elemento tóxico Al ( $r = -0.367$ ). Algunas de estas relaciones son lógicas desde un punto de vista nutricional. Por ejemplo, el Mg y P son elementos sinérgicos, ya que el incremento de uno estimula la absorción del otro.

**Tabla 24.** Coeficientes de correlación lineales estadísticamente significativos y niveles de significancia (en paréntesis), establecidos entre los diferentes minerales analizados

	Mg	Ca	Al	Si	P	K	V	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	Se	Pb	Cd	Mo	N
<b>Mg</b>																		
<b>Ca</b>	0.941 (0.000)																	
<b>Al</b>	0.435 (0.013)	0.539 (0.001)																
<b>Si</b>	0.653 (0.000)	0.701 (0.000)	0.798 (0.013)															
<b>P</b>	0.634 (0.002)	0.367 (0.039)		0.505 (0.004)														
<b>K</b>	0.651 (0.000)	0.794 (0.000)		0.456 (0.011)	0.543 (0.001)													
<b>V</b>	0.399 (0.024)	0.517 (0.002)	0.992 (0.000)	0.784 (0.000)														
<b>Mn</b>	0.649 (0.000)	0.660 (0.000)				0.565 (0.001)												
<b>Fe</b>	0.546 (0.001)	0.586 (0.000)	0.962 (0.013)	0.828 (0.000)	0.407 (0.021)		0.949 (0.000)											
<b>Co</b>	0.725 (0.000)	0.798 (0.000)	0.852 (0.00)	0.749 (0.000)		0.474 (0.006)	0.827 (0.000)	0.673 (0.000)	0.866 (0.000)									
<b>Cu</b>	0.526 (0.002)	0.380 (0.032)		0.622 (0.000)	0.748 (0.000)				0.448 (0.010)									
<b>Zn</b>	0.561 (0.001)	0.591 (0.000)	0.434 (0.013)	0.489 (0.006)	0.634 (0.000)	0.437 (0.012)	0.416 (0.018)		0.528 (0.002)	0.502 (0.003)	0.645 (0.000)							
<b>As</b>	0.470 (0.007)	0.538 (0.001)	0.712 (0.000)	0.637 (0.000)				0.437 (0.012)	0.667 (0.000)	0.746 (0.000)								
<b>Se</b>	0.365 (0.040)	0.421 (0.016)	0.886 (0.000)	0.793 (0.000)			0.881 (0.000)		0.861 (0.000)	0.732 (0.000)			0.737 (0.000)					
<b>Pb</b>	0.409 (0.020)	0.485 (0.005)	0.762 (0.000)	0.674 (0.000)			0.776 (0.000)	0.383 (0.000)	0.756 (0.000)	0.704 (0.000)		0.394 (0.026)	0.583 (0.000)	0.694 (0.000)				
<b>Cd</b>					-0.522 (0.002)				-0.437 (0.011)		-0.461 (0.007)							
<b>Mo</b>						0.363 (0.041)			0.495 (0.004)									
<b>N</b>	-0.371 (0.044)	-0.406 (0.026)	-0.367 (0.046)					-0.366 (0.047)	-0.381 (0.038)	-0.468 (0.009)	-0.405 (0.026)	-0.404 (0.027)						

Sin embargo, existen otras correlaciones que contradicen esta lógica, como la correlaciones entre el K y el Ca o el K y el Mg. Estos elementos son antagonistas ya que el incremento de uno disminuye la asimilación del otro. Además, la naturaleza del vegetal (en este caso la lechuga) podría forzar relaciones entre elementos. Relaciones similares han sido descritas para lechuga por Nali et al. (2009) quienes encontraron buenas correlaciones entre elementos de la corteza como Al con Co, Fe y V.

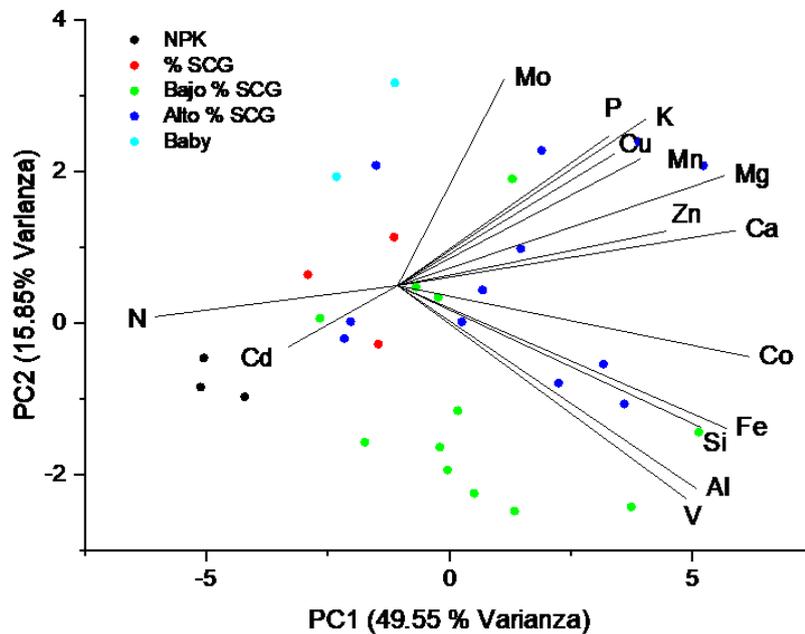
### ***Análisis de componentes principales (PCA)***

Se realizó un análisis de componentes principales en una matriz con todos los datos de los elementos obtenidos, y las puntuaciones de cada muestra fueron representados sobreimpuestos a las cargas de cada parámetro (**Figura 57**). El PCA retuvo cuatro componentes con eigen values mayores de 1.0. Estos componentes explicaron el 84.58% de la varianza. Los elementos (excepto el Cd y N) aparecen juntos (con valores altos en PC1) cerca de las lechugas cultivadas con altos porcentajes de SCG. Por el contrario, el N y el Cd aparecen juntos en el otro lado de la gráfica (con valores bajos en PC1), cerca de las lechugas cultivadas sin SCG (NPK, 0% SCG y lechugas *baby*). Estos resultados apoyan lo que previamente se ha discutido a cerca de la quelación de elementos esenciales y tóxicos por algunos componentes de los SCG (melanoidinas, polifenoles, carbohidratos, etc.) y su mayor disponibilidad por las plantas y como la adición de SCG disminuye las concentraciones de N y Cd en lechugas.

### ***Implicaciones nutricionales de los elementos esenciales y tóxicos presentes en las lechugas cultivadas en suelos adicionados de SCG.***

Teniendo en cuenta la concentración de elementos de la **Tabla 22**, se calcularon los elementos aportados por una ración diaria de lechuga (estimada entre 150 y 200g; Carbajar y Sánchez-Muniz, 2003) (**Tabla 25**). El contenido de nutrientes y elementos tóxicos se incrementó cuando las lechugas fueron

cultivadas con SCG a altas dosis, bajas dosis o en ambos casos, con respecto a las cultivadas sin la adición de SCG, con NPK, exceptuando los casos de Cd y Si. El incremento medio de los elementos en las lechugas cultivadas con altas y bajas dosis de SCG (**Tabla 22**) comparado con las lechugas cultivadas en suelos sin adicionar SCG (o con NPK) fue de 32% y 184% para el Zn, 161% y 22% para el Co, 191% y 285% para el Fe, 56% y 180% para el Mn y 306% y 400% para el V, respectivamente.



**Figura 57.** Gráfico superimpuesto de las puntuaciones obtenidas del PCA (PC2 vs PC1) y cargas de cada elemento mineral analizado.

La **Tabla 25** muestra la concentración de los elementos de las lechugas cultivadas sin SCG, el valor medio de aquellas cultivadas con SCG y de aquellas cultivadas con NPK en una porción de lechuga. A partir de estos resultados, se calculó el porcentaje de las ingestas dietéticas de referencia (IDRs) para hombres y mujeres adultos sanos (Instituto de Medicina, 2002) aportadas por una ración de lechuga (150g). Como muestra claramente los resultados de la

**Tabla 25**, la adición de SCG incrementó los porcentajes de las IDRs cubiertas por una porción de lechuga, particularmente importante en el caso del Mn (18.86% de las IDRs en mujeres), y Fe (1.07% de las IDRs en hombres y 4.75% en mujeres). Estos datos son de particular importancia debido a la prevalencia de anemia en la población mundial (24.8%, WHO, 2008). En menor medida para el Ca, Cu y Mo el incremento en el porcentaje de las IDRs es destacable, aproximadamente 8% en los tres casos.

**Tabla 25.** Cantidad de los diferentes elementos aportados por una porción de lechuga (150 g) cultivada con los diferentes tratamientos. Ingestas dietéticas de referencia (IDR) y porcentaje de IDR, para hombres y mujeres adultos sanos (Instituto de Medicina, 2005) proporcionados por una porción de lechuga (150 g) cultivada con SCG (promedio entre valores SCG bajos y altos)

Elemento (unidad)	Cantidad por porción			IDRs (mg)		%IDRs SCG (media)**	
	0% SCG	SCG (media)**	(NPK)	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Fe (mg)	0.294	0.856	0.222	18	8	4.75	10.69
Co (µg)	0.675	1.763	0.535	-	-	-	-
V (µg)	1.150	4.673	0.864	-	-	-	-
Mn (mg)	0.217	0.340	0.121	1.8	2.3	18.86	14.76
Zn (mg)	0.101	0.134	0.047	8	11	1.67	1.21
Mg (mg)	16.42	18.13	12.31	320	420	5.66	4.32
Si (mg)	3.195	3.000	0.958	nd	nd	-	-
P (mg)	14.13	15.18	10.06	700	700	2.17	2.17
K (mg)	206.6	202.5	175.8	4700	4700	4.31	4.31
Ca (mg)	73.30	80.65	44.70	1000	1000	8.07	8.07
Se (µg)	0.294	0.516	0.274	0.055	0.055	0.94	0.94
Cu (µg)	60.60	69.75	38.50	0.9	0.9	7.75	7.75
Mo (µg)	2.970	3.593	1.166	0.045	0.045	7.98	7.98
*As (µg)	2.025	3.128	3.090	-	-	-	-
*Pb (µg)	1.329	1.965	0.654	-	-	-	-
*Cd (µg)	35.55	11.08	8.700	-	-	-	-
*Al (µg)	208.5	964.5	146.2	-	-	-	-

\*Elementos tóxicos; \*\*Media entre altos y bajos porcentajes de SCG.

En este estudio, el aporte de As por 150 g de lechuga se incrementó un 54% (**Tabla 25**) cuando las lechugas se cultivaron con SCG (media de bajos y altos porcentajes), comparados con aquellas cultivadas en suelos no adicionados (0% SCG) y sólo un 1% comparados con aquellas que cultivadas con NPK (**Tabla 25**). Sin embargo, una porción de lechuga solo aporta 3.128 µg de As. En un estudio previo (Delgado-Andrade et al., 2003) se estimó que la ingesta dietética diaria de As en alimentos del sudeste de España es de 221 µg al día, lo que es considerablemente superior a lo estimado para una porción de lechuga. Además, la ingesta semanal tolerable provisional para el As está establecida en 15 µg/kg de peso. Por tanto, la cantidad de As aportado por una porción de lechuga no causaría efectos toxicológicos en humanos.

En relación a los elementos tóxicos, 150 g de lechuga aportan una cantidad de Al que se incrementó en un 352% (**Tabla 25**) en las lechugas cultivadas con SCG, comparadas con aquellas cultivadas sin SCG y en un 560% comparados con las lechugas cultivadas con NPK. Sin embargo, esta porción aporta 965 µg de Al, cuando la dieta diaria usual aporta una ingesta entre 1600 y 13000 µg de Al (Aguilar et al., 2008). Por tanto, en relación al Al, el consumo de una porción de lechuga cultivada con SCG no supone ningún riesgo para la salud de los consumidores.

Los contenidos de Cd tienen un comportamiento inverso al del Al; en otras palabras, disminuyen en las lechugas cultivadas con SCG. La concentración máxima de Cd para una lechuga es de 0.2 µg/g de peso fresco (Commission Regulation, 2006). La **Tabla 22** muestra que la concentración en aquellas lechugas cultivadas con altos porcentajes de SCG fueron significativamente menores (0.015 µg/g peso fresco), mientras que aquellas cultivadas en suelos con bajos porcentajes de SCG fueron de 0.133 µg/g de peso fresco. Sin embargo, estos niveles no exceden el límite máximo establecido por la legislación y por tanto no causaría problemas de toxicidad.

### ***Consideraciones finales***

El uso de SCG como enmienda orgánica aumenta las concentraciones de múltiples elementos esenciales como el V, Fe, Co, Mn y Zn, algunos de ellos de gran importancia nutricional, lo que aumenta el valor nutricional de la lechuga. Además, las concentraciones de estos elementos se correlacionan positivamente entre sí, a pesar de que algunos de ellos son elementos antagónicos en el nivel de absorción. Este comportamiento podría estar relacionado con la formación de quelatos solubles con algunos compuestos de los SCG (como melanoidinas, polifenoles o carbohidratos), que podrían ser liberados al suelo por la degradación de los propios SCG. La disminución del pH del suelo mediante la adición de SCG al suelo agrícola también podría contribuir al aumento de las concentraciones de elementos en la lechuga debido a la influencia del pH en la disponibilidad de los elementos. SCG (como enmienda orgánica) *versus* NPK (como fertilizante tradicional) aumenta las concentraciones de numerosos elementos esenciales (P, Ca, V, Mn, Fe, Co, Cu y Zn, y en menor medida Mg, Si y Mo), lo que podría reducir el uso de fertilizantes químicos, asegurando una mejora en la sostenibilidad ambiental. Los SCG como enmienda de los suelos agrícolas disminuyeron las concentraciones de N en la lechuga y, por lo tanto, su crecimiento y biomasa. Los SCG como enmienda orgánica da lugar a la producción de un producto alimenticio que podría clasificarse como ecológico y, al mismo tiempo, mejoran su valor nutricional.

### **4.5.2. Efectos sobre la estructura del suelo**

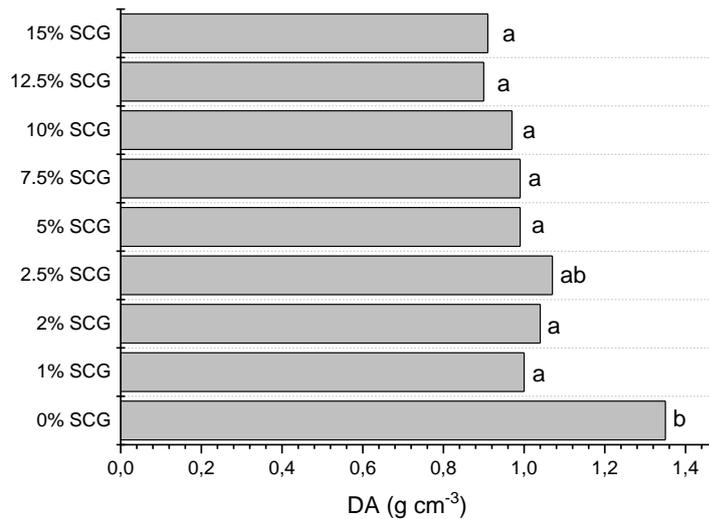
#### ***Conocimiento previo***

Son muchos los estudios acerca del efecto de la dosis de aplicación de diferentes enmiendas orgánicas sobre las propiedades físicas del suelo. Así, Omondi et al. (2016) estudiaron el efecto de diferentes dosis de biochar: baja (<20 t ha<sup>-1</sup>), media (21-40 t ha<sup>-1</sup>), alta (41-80 t ha<sup>-1</sup>) y muy alta (>80 t ha<sup>-1</sup>) sobre

la densidad aparente, la porosidad y el agua útil para las plantas. Omondi et al. (2016) reportaron cómo los cambios observados en las propiedades físicas del suelo se vieron relacionadas con las tasas de aplicación del biochar. En otro estudio, Aranyos et al. (2016) estudiaron el efecto de diferentes dosis de compost (0, 9, 18 y 27 t ha<sup>-1</sup>) sobre la densidad aparente observando una disminución de la misma con la tasa de aplicación. Hernández et al. (2015) también estudiaron el efecto de dosis crecientes (0, 150 y 450 t ha<sup>-1</sup>) sobre la capacidad de retención de agua y la estabilidad de los agregados. En este estudio observaron cómo estas propiedades incrementaban linealmente a la dosis de residuo aplicada. De la misma manera, Yazdanpanah (2016), estudió el efecto de la adición de 0, 10 y 30 t ha<sup>-1</sup> de residuos de alfalfa y compost de residuos urbanos sobre las propiedades físicas de un suelo arcilloso y otro limoso. En definitiva, se observa cómo la tasa de aplicación es uno de los factores más importantes y a tener en cuenta dentro del estudio del efecto de las enmiendas orgánicas sobre las propiedades físicas del suelo.

### ***Propiedades físicas***

Como se observa en la **Figura 58**, la adición de SCG disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) la DA de las mezclas progresivamente con las cantidades añadidas con respecto a la muestra control, salvo la dosis 2.5% SCG. Así, por ejemplo, la adición de un 5% produjo una disminución del 36%, la adición de un 10% una reducción del 39% y la adición de un 15% una reducción del 48% de la DA, con respecto a la muestra control. En cuanto a la respuesta lineal de la densidad aparente con la adición de SCG podemos observar dos grupos claramente diferenciados. Primero hay un aumento de la densidad aparente entre 1% y 2.5%, y posteriormente una disminución hasta las muestras adicionadas con dosis más altas (12.5 y 15% SCG).

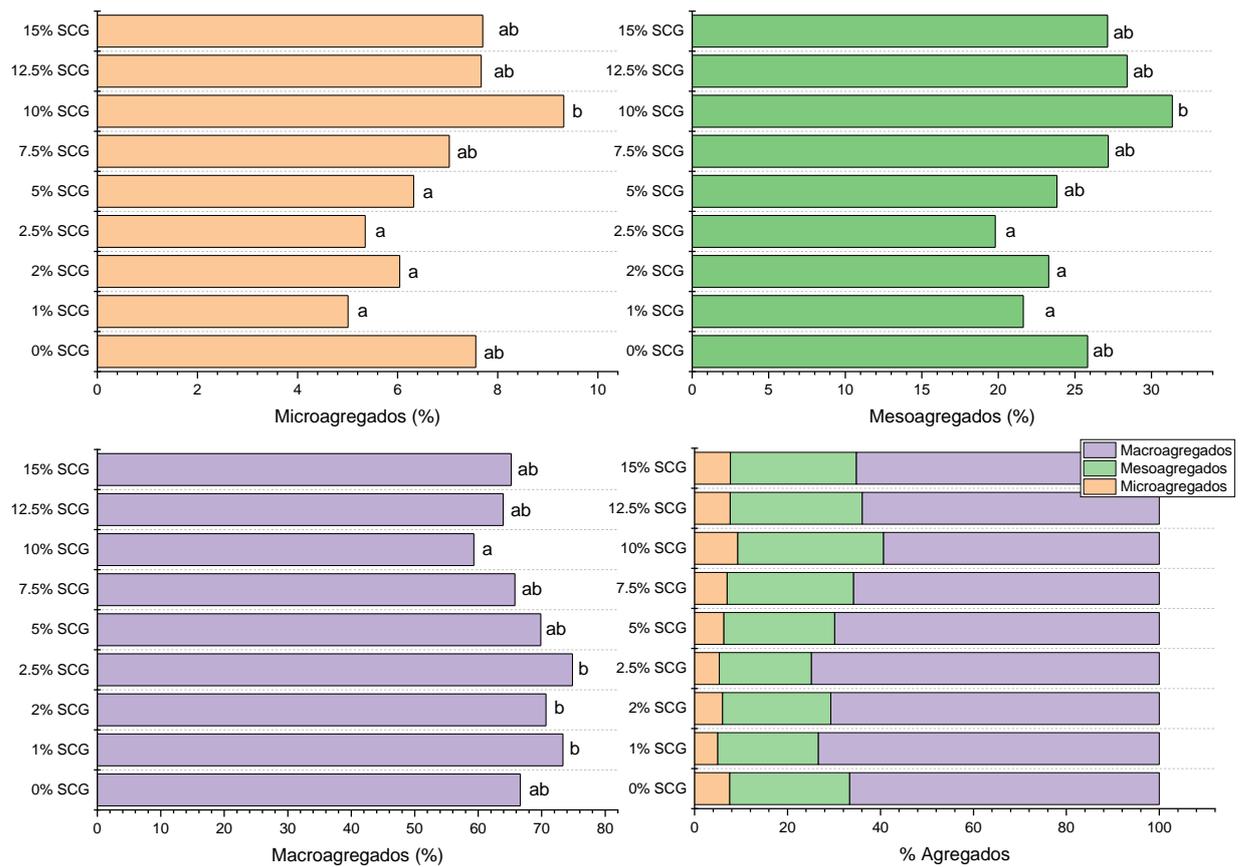


**Figura 58.** Evolución de la densidad aparente con la adición progresiva de SCG. Se indica con diferentes letras las diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ). DA, densidad aparente.

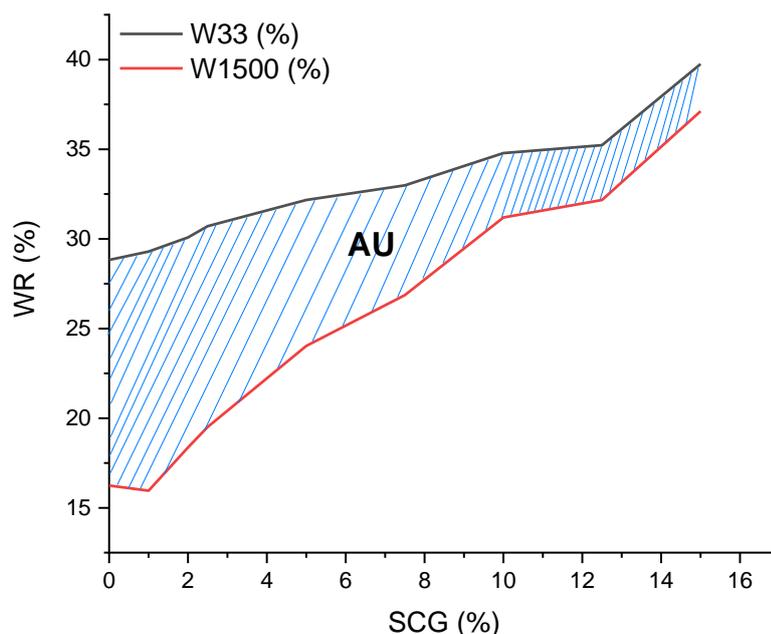
En cuanto al porcentaje de macro, meso y microagregados no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (**Figura 59**), sin embargo, si podemos destacar algunas tendencias. La muestra con adición de 10% de SCG es la que mayor porcentaje de microagregados y mesoagregados tuvo, y por tanto fue la muestra con menor cantidad de macroagregados. Parece que conforme se añaden SCG, hay un aumento de micro y mesoagregados y una disminución de macroagregados hasta llegar a la dosis de 10% de SCG, dónde se produce un umbral. A partir de aquí hay una disminución de micro y mesoagregados y un ligero aumento de los macroagregados.

En cuanto a la capacidad de retención de agua (**Figura 60**) se observa un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) tanto a -33 kPa como a -1500 kPa. La adición del 15% SCG incrementa la retención de agua a capacidad de campo en un 38% y en el punto de marchitamiento permanente en un 129%, lo que nos indica un mayor incremento relativo a -1500kPa que a -33kPa. Esto da como resultado una disminución significativa del agua útil por las plantas conforme va

aumentando la dosis de SCG (para 0, 1, 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15%, le corresponde una cantidad de agua utilizable de 1.70, 1.34, 1.22, 1.20, 0.80, 0.60, 0.35, 0.28, y 0.24 mm/cm, respectivamente). Ya que como se observa en la **Figura 60**, la distancia que hay entre las dos rectas va disminuyendo y por lo tanto disminuye el agua utilizable por las plantas (ya que ésta corresponde a la diferencia entre el agua a -33kPa y -1500 kPa) como ya vimos en capítulos anteriores de la tesis. En cuanto a la linealidad del efecto de los SCG sobre la retención de agua, el efecto es totalmente lineal. A más dosis de SCG, mayor retención de agua y menor agua útil para las plantas.



**Figura 59.** Porcentaje de microagregados, mesoagregados y macroagregados con la adición progresiva de SCG.



**Figura 60.** Capacidad de retención de agua a capacidad de campo (W33) y en el punto de marchitamiento permanente (W1500) versus dosis de SCG. La distancia entre ambas restas es igual al agua utilizable por las plantas (AU).

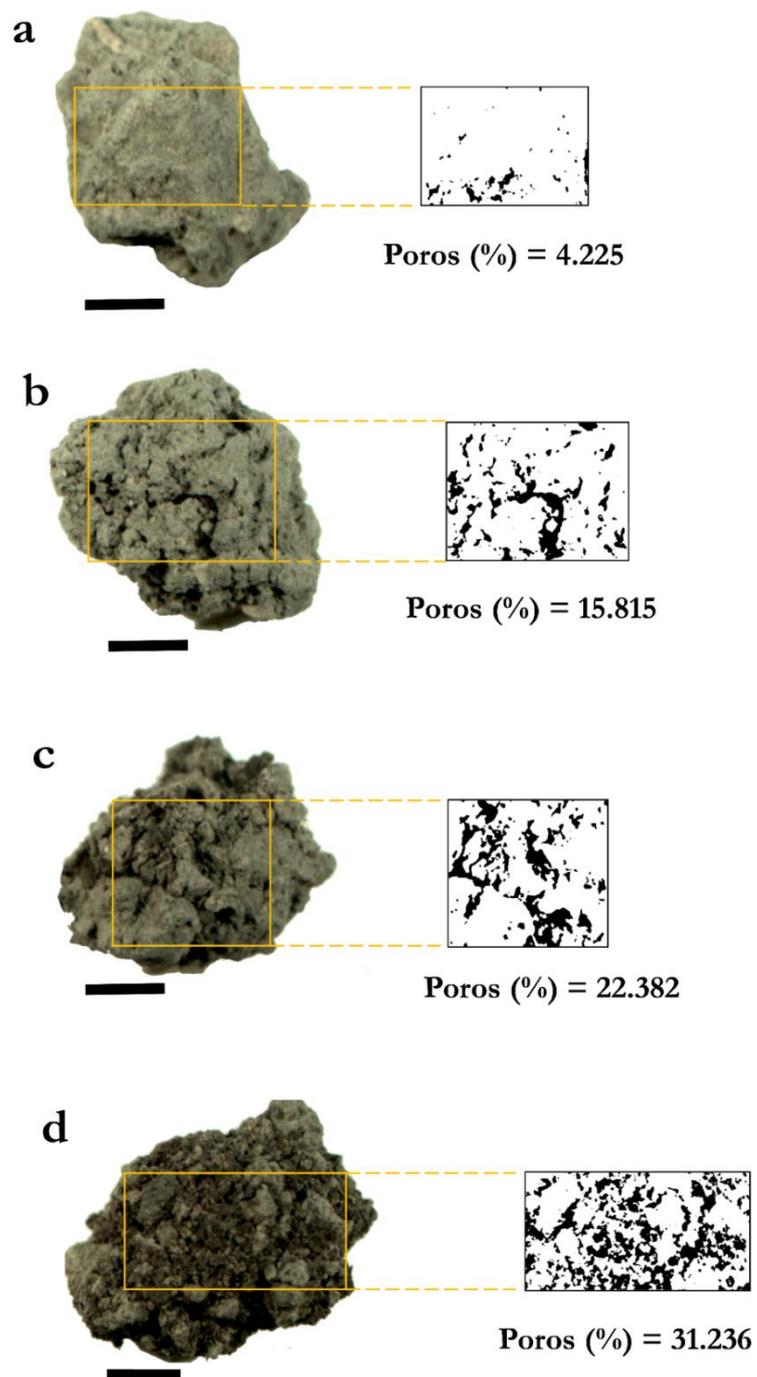
### ***Morfología***

Como ya vimos en el capítulo del efecto de los SCG sobre las propiedades físicas del suelo, tanto la adición de SCG como la simple incubación de las muestras incrementan la porosidad de los agregados (**Figura 61**). La porosidad incrementó un 430% en el caso de la muestra con 5% SCG y un 639% en la muestra con 15% SCG con respecto a la muestra control. La simple incubación de la muestra durante 40 días también incrementó la porosidad debido a los pequeños cambios de humedad durante la incubación en la cámara climática. Como se observa en la **Figura 61**, la incorporación de los SCG parece ser intra-ped en el caso de la muestra adicionada con 5% de SCG. Sin embargo, cuando se adicionaron altas cantidades de SCG, éstos parecen formar una masa la cual recubre las partículas minerales del suelo facilitando la unión entre ellas, lo que podría estar relacionado con el aumento de los macroagregados a estas dosis más altas.

### ***Comparación de los efectos de los SCG con los de otras enmiendas orgánicas reportadas en la bibliografía***

Turek et al. (2019) realizó también un ensayo parecido al de este capítulo, estudiando el efecto de distintas dosis de SCG (5, 10, 15 y 20%) sobre algunas propiedades físicas como la retención de agua a capacidad de campo, el agua utilizable por las plantas y la porosidad drenable. En ese estudio también se cultivaron lechugas (*Mimosa Roxa Roxanne*). Al igual que en nuestro ensayo, los autores encontraron un aumento de la capacidad de retención de agua en un 31%. Además, también coincide con lo encontrado por Kasongo et al. (2011), los cuales establecieron que la adición de otros residuos del café (mezcla de pulpa y cascarilla) aumentó la retención de agua en niveles de 55-60%. Para Turek et al. (2019) la capacidad de retención de agua a capacidad de campo disminuye entre la dosis 15 y 20% SCG, lo cual asocian a la geometría de los poros, los cuales han sido moldeados por los SCG, modificando su forma, tortuosidad, continuidad y conductividad. Estos autores obtuvieron también un aumento del agua utilizable por las plantas conforme aumenta la adición de SCG hasta un 15%, lo que es contrario a lo encontrado en nuestro ensayo. Esta diferencia de comportamiento podría ser atribuida a las distintas características de los suelos ensayados: en nuestro caso suelos arcillosos y en el caso de estos autores suelos franco-arenosos.

Hardgrove y Livesley (2016) también encontraron un aumento de la retención de agua al adicionar SCG frescos en suelos arenosos y limosos. Además, ellos también reportaron un incremento del contenido de humedad gravimétrica en el suelo cuando se adicionaba dosis de SCG superiores al 10%. Por otro lado, de acuerdo con Sena da Fonseca et al. (2014), en un estudio sobre el uso de los SCG como aditivo en materiales de construcción, mostraron como los SCG incrementaron la absorción de agua, la porosidad aparente y disminuía la densidad aparente de las muestras adicionadas de SCG.



**Figura 61.** Imágenes estereomicroscópicas de los macroagregados y resultados del análisis de imagen. a) Suelo sin incubar. b) Suelo incubado con 0%SCG. c) Suelo con 5% SCG. d) Suelo con 15%SCG.

El comportamiento de los SCG con respecto a las propiedades físicas también puede ser comparado con el efecto que tienen otras enmiendas orgánicas (Aranda et al., 2016; Aranyos et al., 2016; Carter, 2007; Emaeelnejad

et al., 2016; Ferreira de Araújo et al., 2016; Forge et al., 2016; Hernández et al., 2015; Khaliq y Abassi, 2015; Moreno et al., 2016; Omondi et al., 2016; Sall et al., 2016; Yazdanpanah et al., 2016; Kranz et al., 2020). Como ya vimos en el capítulo del efecto de la adición de SCG sobre las propiedades físicas, su comparación es difícil debido a la diversidad de condiciones, dosis y tipo de suelos utilizados en cada ensayo. En estos trabajos la adición de diferentes enmiendas orgánicas (biochar, compost de lodos de depuradora, gallinaza, estiércol, etc.) produjo una disminución de la densidad aparente, que está directamente relacionada con un aumento de la actividad biológica del suelo, así como de la porosidad, resultado de un aumento de la materia orgánica del suelo (Bronick y Lal, 2004). Con respecto a la retención de agua, Aranda et al (2016) y Carter (2007) encontraron que la adición de compost de alpeorujó y de otros tipos de compost, respectivamente, aumentaba la retención de agua a capacidad de campo. Lo mismo encontraron Aranda et al. (2016) y Forge et al. (2016) con respecto a la retención de agua en el punto de marchitamiento permanente, aunque Moreno et al. (2016) encontró una disminución de este parámetro al adicionar compost de cáscara de olivo. Como hemos visto en esta tesis, un aumento de ambas retenciones de agua no implica un directo aumento del agua útil por parte de la planta, resultado también observado por Aranda et al. (2016) con compost de alpeorujó. Aunque Moreno et al. (2016), Omondi et al. (2016) y Kranz et al. (2020) encontraron resultados contrarios, observando un incremento de este parámetro al adicionar enmiendas orgánicas.

### ***Consideraciones finales***

La adición secuencial de SCG al suelo de Vega tuvo un efecto positivo sobre todas las propiedades físicas excepto para el agua útil para las plantas. Incrementó proporcionalmente a las cantidades añadidas la retención de agua a -33 kPa y a -1500 kPa, disminuyó la densidad aparente del suelo y aumentó la estabilidad estructural del suelo. Los SCG influyen de igual manera en las

propiedades físicas del suelo que otro tipo de enmiendas orgánicas como el compost o el biochar.



## **4.6. ENSAYO 6. EFECTOS COMBINADOS DE LA ADICIÓN DE SCG CON FERTILIZANTES NITROGENADOS SOBRE EL SISTEMA SUELO-PLANTA**

### **4.6.1. Conocimiento previo**

La fitotoxicidad de los SCG ha sido atribuida a la presencia de compuestos tóxicos en los SCG como cafeína, taninos y polifenoles (Yamane et al., 2014) y también a un estrés oxidativo por la planta al adicionar SCG frescos (Gomes et al., 2013). Sin embargo, otros autores atribuyeron dicha limitación a una inmovilización microbiana del N en el suelo (Cruz y Cordovil, 2015; Hardgrove y Livesley, 2016). Dicha inmovilización microbiana del N en el suelo se debe a la adición de enmiendas orgánicas con una alta relación C/N o a una fuente de C rápidamente disponible en el suelo (Chen et al., 2021). La inmovilización microbiana del N depende del tipo de enmienda orgánica empleada, de la dosis utilizada, del tipo de C orgánico complejo añadido y la relación C/N de dicho carbono orgánico (Chen et al., 2017). Así, residuos frescos con una C/N superior a 18 estimulan la inmovilización microbiana del N, como es el caso de los SCG (Cruz y Cordovil, 2015).

Wakasawa et al. (1998) y Vardon et al. (2013) establecieron que cuando los SCG eran adicionados con un fertilizante inorgánico no se producía tal efecto inhibitorio, pero Hardgrove y Livesley (2016) encontraron resultados contrarios al adicionar fertilizantes inorgánicos (urea, nitrato de amonio y NPK) junto con 5% de SCG. Estos autores concluyeron que con esta combinación (SCG + Fertilizante) había un dominio del efecto fitotóxico sobre los cambios de biodisponibilidad del N en el suelo. Estos autores hipotetizaron que mayores cantidades de N podrían compensar en parte el efecto inhibitorio de los SCG.

#### 4.6.2. Influencia sobre la fertilidad química del suelo

En este capítulo se ha utilizado una nomenclatura específica para las muestras: “Dosis de SCG – dosis de N”. Para esta última se utilizan las siguientes siglas: DA, dosis alta de N; DM, dosis media de N; DB, dosis baja de N.

La influencia del efecto combinado de los SCG junto con las diferentes dosis de N se muestra en la **Tabla 26**. La adición de SCG disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) el pH del suelo de la Vega proporcionalmente a las cantidades añadidas debido al carácter ácido de los SCG (**Tabla 6**). Hardgrove y Livesley (2016) encontraron la tendencia contraria en un ensayo en invernadero al adicionar diferentes concentraciones de SCG (2.5, 5, 10 y 20%), la cual atribuyeron a que no hubo una suficiente percolación en el perfil de las macetas, lo que conduce a una disminución de los iones  $H^+$ . Sin embargo, encontraron una disminución del pH tras la adición de SCG en un ensayo de campo. Así mismo, la adición del fertilizante nitrogenado también disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) el pH en nuestro estudio, lo que coincide con lo reportado por Liu et al. (2014), el cual lo atribuye a que la adición de  $NH_4NO_3$  al suelo produce la nitrificación de  $NH_4^+$  liberando  $H^+$  iones los cuales generan acidez. La misma tendencia encontraron Hargrove y Livesley (2016) al adicionar SCG (5% p:p) junto con fertilizantes nitrogenados (30-60% urea, < 10% nitrato de amonio, NPK 21.2: 1.9: 5.7). Por lo tanto, el efecto combinado de los SCG junto con el N disminuye el pH del suelo significativamente ( $p < 0.05$ ) hasta un valor mínimo de 7.3 en la muestra 15%SCG-DA (**Tabla 26**).

Con a la  $CE_{25}$ , el tratamiento que más influyó sobre esta propiedad fue la adición de N al suelo (**Tabla 26**). Altas dosis de N generan  $CE_{25}$  muy altas, aumentando la salinidad del suelo hasta 8 veces con respecto a la muestra control. Nuestros resultados coinciden con los de Liu et al. (2014) el cual adicionó N en forma de  $NH_4NO_3$  (400 kg/ha), lo que produjo un aumento de

**Tabla 26.** Efecto de los diferentes tratamientos sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo.

Muestra	pH	CE <sub>25</sub> (dS/m)	CO (%)	N total (%)	C/N	P asimilable (ppm)	K asimilable (ppm)
Control	8.3 ± 0.0f	0.97 ± 0.02a	1.80 ± 0.06ab	0.125 ± 0.011ab	14 ± 1ab	64 ± 3a	358 ± 8ab
0%SCG-DB	8.3 ± 0.0f	0.95 ± 0.01a	1.80 ± 0.03a	0.111 ± 0.004a	16 ± 1abc	68 ± 5a	301 ± 21a
0%SCG-DM	8.0 ± 0.0e	1.95 ± 0.16de	1.72 ± 0.05a	0.134 ± 0.013abc	13 ± 1a	69 ± 8a	367 ± 12abc
0%SCG-DA	7.5 ± 0.0c	9.48 ± 0.29f	1.80 ± 0.04a	0.146 ± 0.020abc	13 ± 2a	68 ± 11a	386 ± 14c
1%SCG-DB	8.2 ± 0.0f	1.05 ± 0.01b	2.28 ± 0.15cd	0.185 ± 0.030cd	13 ± 3a	59 ± 36a	405 ± 14c
1%SCG-DM	8.2 ± 0.0f	1.28 ± 0.06bc	2.10 ± 0.03abc	0.187 ± 0.021bcd	11 ± 1a	56 ± 29a	373 ± 14abc
1%SCG-DA	7.5 ± 0.0c	9.52 ± 0.40c	2.11 ± 0.08bc	0.199 ± 0.015cd	11 ± 1a	58 ± 36a	382 ± 11bc
7.5%SCG-DB	8.0 ± 0.0e	1.42 ± 0.05bc	5.95 ± 1.14de	0.302 ± 0.013d	20 ± 4bc	69 ± 4a	463 ± 25d
7.5%SCG-DM	8.0 ± 0.0e	1.34 ± 0.04abc	6.04 ± 0.61de	0.348 ± 0.007e	17 ± 3abc	57 ± 32a	560 ± 37def
7.5%SCG-DA	7.4 ± 0.1b	8.30 ± 0.25f	5.18 ± 0.71def	0.458 ± 0.021fg	11 ± 1a	74 ± 7a	549 ± 1de
15%SCG-DB	7.8 ± 0.0d	1.82 ± 0.05de	8.19 ± 0.75ef	0.398 ± 0.020ef	21 ± 2c	66 ± 5a	681 ± 28fg
15%SCG-DM	7.8 ± 0.0d	1.74 ± 0.04d	9.13 ± 0.70f	0.448 ± 0.032fg	20 ± 2bc	64 ± 5a	666 ± 8efg
15%SCG-DA	7.3 ± 0.1a	7.68 ± 0.22e	8.48 ± 1.13f	0.511 ± 0.038g	16 ± 0abc	68 ± 8a	708 ± 9g

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). SCG, posos de café; DA, dosis alta de N; DM, dosis media de N; DB, dosis baja de N.

la salinidad del suelo, llegando hasta valores de 1.2 dS/m. En nuestro caso, al adicionar 3480 kg/ha de N se alcanzan valores de CE<sub>25</sub> muy superiores al límite de un suelo salino, establecido en 2.4 dS/m (Liu et al., 2014), lo que puede afectar negativamente al crecimiento de las plantas.

Con altas dosis de SCG (7.5 y 15%), parece que el efecto del N sobre la CE<sub>25</sub> disminuye, aunque todavía se mantiene en valores superiores a este límite. Otra explicación de la disminución de la salinidad podría ser que la transformación de residuos orgánicos produjo una mayor capacidad de intercambio catiónico (mayor retención de iones) (Morikawa y Saigusa 2008).

La adición de SCG influye significativamente ( $p < 0.05$ ) sobre las cantidades de CO en el suelo, incrementando su contenido proporcionalmente a las cantidades añadidas, lo que ya ha sido corroborado en apartados anteriores de la presente tesis doctoral. La adición de 1% SCG incrementa el CO en un 20% con respecto a la muestra control, la adición de 7.5% un 218%, y la adición de 15% un 378%. Con respecto al N del suelo, la adición de SCG incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) el N total del suelo lo que coincide con lo reportado por Cruz y Cordovil (2015) y Yamane et al. (2014), los cuales encontraron el doble de N en aquellas muestras adicionadas con SCG lo que atribuyeron a la acumulación de N insoluble en el suelo. En el mismo sentido, la adición de N incrementó significativamente las cantidades de N en el suelo. Por lo tanto, el efecto combinado de los SCG junto con el N enriqueció el suelo en este macronutriente alcanzando cantidades de 0.511% en la muestra 15%SCG-DA (tres veces el valor de la muestra control) (**Tabla 26**). Liu et al. (2014) encontraron que la adición de fertilizantes orgánicos, inorgánicos o una combinación de ambos, incrementaba el N total del suelo independientemente del tipo de fertilizante utilizado. Por otro lado, no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los distintos tratamientos combinados de N y SCG para el P asimilable, encontrándose en un rango entre 56 ppm (1%SCG-DM) y 74 ppm (7.5%SCG-DA) (**Tabla 26**). Teniendo en cuenta que los SCG

tienen un alto contenido en P (**Tabla 6**), este comportamiento podría explicarse por el proceso de retrogresión del P, que consiste en un bloqueo del mismo por los carbonatos del suelo, y teniendo en cuenta que el suelo tiene un 39% de carbonatos (**Tabla 3**), éste bloqueo tiene importancia.

El comportamiento del K asimilable es bastante similar al comportamiento del N en el suelo: los SCG incrementan significativamente el contenido de K asimilable en el suelo, proporcionalmente a las cantidades añadidas debido a que los SCG son ricos en K (3072 ppm) (**Tabla 6**), lo que coincide con lo reportado también por Cruz y Cordovil (2015) para la adición de SCG en cultivos de lechugas. El efecto del N sobre el K asimilable no es apreciable en la mayor parte de los casos, si bien en las muestras control (0% SCG) parece incrementarse con la adición de N. Este hecho no puede ser atribuido a la disminución del pH ya que en los suelos cálcicos esta disminución va asociada a una menor disponibilidad del K (Navarro y Navarro, 2013). Es muy conocida la sinergia entre el N y el K (Rietra et al., 2017) debido a procesos que involucran al suelo, la rizofera (interacciones catión-catión, catión-anión o anión-anión) y la planta (Pan, 2012), y se podría atribuir a este hecho.

#### **4.6.3. Influencia sobre el crecimiento de las lechugas y su contenido en elementos minerales**

La influencia de la acción combinada de los SCG junto con el fertilizante N sobre el crecimiento de las lechugas se observa en la **Figura 62**. La mayor parte de los tratamientos limitan el crecimiento de la lechuga como describiremos a continuación. El tratamiento combinado (SCG-N) que mejor funciona respecto al crecimiento de la lechuga corresponde a 1% de SCG con

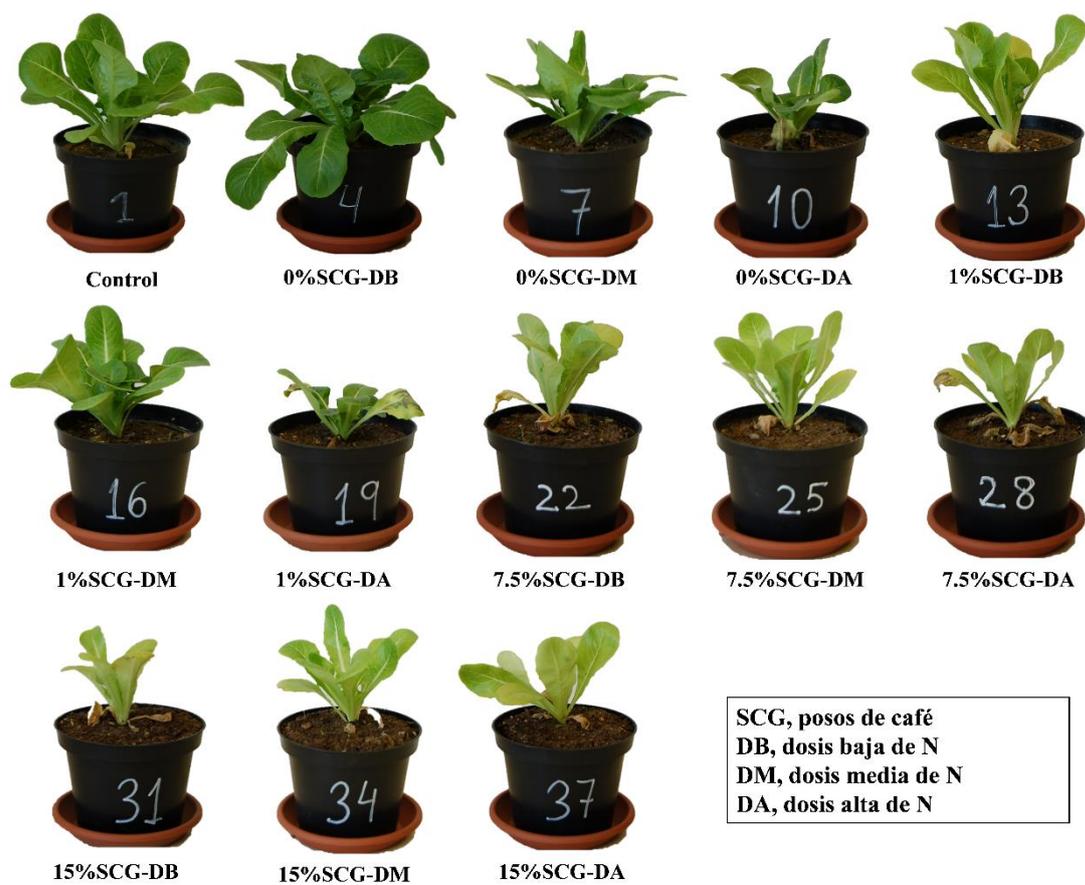
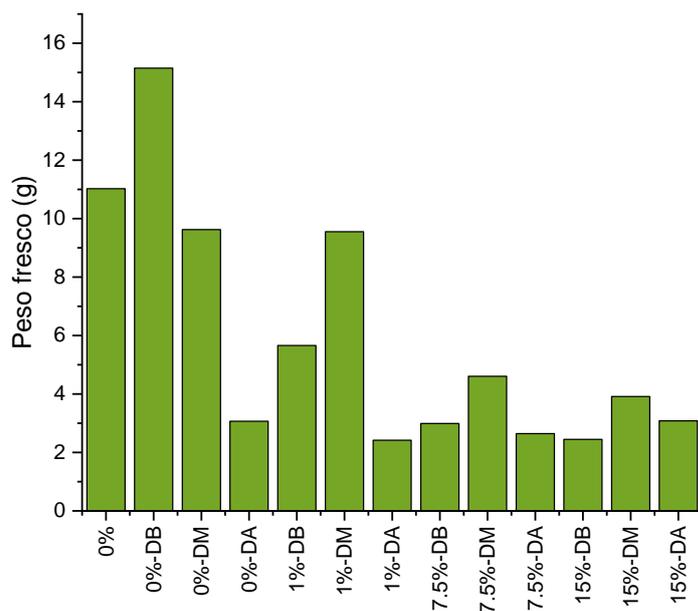


Figura 62. Peso fresco de las lechugas e imágenes de las lechugas tras 40 días de cultivo.

una dosis media de N, aunque no se alcanzan los valores de la muestra control.

La adición de SCG tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las lechugas (**Figura 62**), incluso a dosis muy bajas de SCG (1 %). Esta inhibición ha sido reportada tanto para este mismo vegetal (Cruz et al., 2012; Gomes et al., 2013; Cruz y Cordovil, 2015) como para otros cultivos (Caliskan et al., 2020; Cruz y Cordovil, 2015; Yamane et al., 2015). Una de las causas de la inhibición al crecimiento es la inmovilización microbiana de N en el suelo al adicionar SCG frescos (Cruz y Cordovil, 2015; Hardgrove y Livesley, 2016). En este sentido, en el apartado sobre la influencia de los SCG sobre la microbiología del suelo, hemos demostrado que la adición de SCG estimulaba la actividad global de los microorganismos al poseer los SCG moléculas fácilmente degradables (Comino et al., 2020). Por otro lado, Yamane et al. (2014) comprobó que las legumbres, capaces de satisfacer sus propias demandas de N a través de la fijación de N<sub>2</sub>, fueron más resilientes a los SCG que las especies no leguminosas, cuando se adicionaba en bajas dosis. En este trabajo se han adicionado tres dosis crecientes de N para superar esta posible inmovilización microbiana. Aunque, de acuerdo con la guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España (López-Bellido et al., 2010), las necesidades de N en la lechuga se encuentran entre 120-140 kg/ha, la cual corresponde a la dosis baja de nuestro ensayo. Se ha visto que la acción combinada de dosis media de N incrementa el peso de las lechugas, con respecto a las otras dosis de N, aunque no se alcanza el nivel de la muestra control, lo que coincide con los resultados de Hardgrove y Livesley (2016). Estos autores sugieren que el efecto fitotóxico de los SCG es dominante sobre la inmovilización microbiana o que la dosis de N empleada no fue suficiente para evitar la competencia entre los microorganismos y las plantas. Sin embargo, en nuestro ensayo, la adición de la dosis alta de N no genera lechugas de mayor tamaño, sino todo lo contrario, por lo que habría que buscar otra explicación para este hecho. La **Tabla 26** muestra que la adición de dosis medias y altas de N incrementó la salinidad del

suelo, con valores de hasta 9.52 dS / m en la muestra 1% SCG-DA. De acuerdo con Unlukara et al. (2008), el límite de salinidad de las lechugas está en 1.1 dS/m, clasificando a la lechuga como moderadamente sensible a la salinidad. Es por ello por lo que la adición de N en dosis altas no compensa las limitaciones de los SCG por la fijación de N en la masa microbiana, tal y como sugerían Hardgrove y Livesley (2016). Es más, en las muestras sin adición de SCG, la dosis media y alta de N inhiben el crecimiento de la planta (**Figura 62**) posiblemente por el incremento de la salinidad.

El contenido de macro y microelementos en lechuga se observa en la **Tabla 27**, **Figura 63** y **Figura 64**. En las muestras sin adición de SCG, las altas dosis de N aumentan los contenidos en planta de Ca, Mg, N y S y disminuyen los contenidos de K, Na y P. Esto coincide con lo reportado por Petridis et al. (2013), el cual reportó que un aumento de la aplicación de N al suelo incrementa las cantidades de N en las raíces de las plantas, pero disminuye las cantidades de P y K en las hojas de lechuga. Cuando se aplica SCG con nitrógeno, la combinación que más favorece la absorción de elementos es 1% SCG junto con dosis alta de nitrógeno, enriqueciendo la planta en Ca, K, Mg, N, Na y S, lo que se corrobora en el gráfico que representa la suma de todos los macroelementos (**Figura 63**). Sin embargo, cuando se incrementa la cantidad de SCG adicionado, se produce una disminución de la absorción de elementos con respecto a la muestra 1%-DA. En la literatura hay resultados contradictorios con respecto al efecto de los SCG frescos sobre la nutrición mineral de plantas. Así, con respecto a los macroelementos, Cruz et al. (2014b) encontró que la adición de SCG frescos disminuía los contenidos de Mg, P, Ca, Na e incrementó los contenidos de K en plantas de lechuga. Por el contrario, Caliskan et al. (2020) encontró un enriquecimiento en el pino piñonero de N, K, Mg y P y una disminución de

**Tabla 27.** Contenido de macro y microelementos en lechuga en función de los diferentes tratamientos aplicados.

Muestra	Ca	K	Mg	N	Na	P	S	Suma de macroelementos	Cu	Zn
	mg /100g								µg/100g	
0% SCG	199 ± 67ab	535 ± 15a	39.5 ± 8.0a	398 ± 9bc	95.5 ± 47.3bc	17.1 ± 3.7ab	10.7 ± 5.3a	1295 ± 137	548 ± 76ab	850 ± 85abc
0%SCG-DB	154 ± 20ab	243 ± 52a	42.1 ± 6.6ab	433 ± 83bc	29.9 ± 9.3ab	18.4 ± 3.6ab	14.5 ± 5.2ab	935 ± 128	308 ± 8a	505 ± 155ab
0%SCG-DM	188 ± 30ab	479 ± 58a	62.9 ± 21.8abc	636 ± 203bcde	76.8 ± 22.3abc	14.4 ± 3.4ab	24.0 ± 1.7bcd	1481 ± 239	872 ± 24abcd	594 ± 14abc
0%SCG-DA	496 ± 2bc	328 ± 47a	102 ± 9cd	1096 ± 333de	90.3 ± 54.7abc	11.2 ± 3.3a	31.9 ± 2.1d	2156 ± 372	1382 ± 372cdef	812 ± 52abc
1%SCG-DB	191 ± 25ab	370 ± 42a	47.8 ± 3.0abc	172 ± 23a	34.0 ± 3.1abc	25.6 ± 1.5cde	22.7 ± 4.3bcd	863 ± 47	587 ± 52ab	721 ± 116abc
1%SCG-DM	216 ± 47ab	388 ± 26a	54.7 ± 5.5abc	409 ± 15bcd	31.4 ± 0.8ab	19.7 ± 2.6abc	28.0 ± 4.8cd	1147 ± 101	804 ± 1abc	813 ± 38abc
1%SCG-DA	749 ± 28c	826 ± 12a	124 ± 14d	1250 ± 20e	206 ± 3c	20.9 ± 9.3abcd	46.7 ± 7.4e	3222 ± 6	1622 ± 224f	1038 ± 293c
7.5%SCG-DB	222 ± 47ab	345 ± 102a	65.5 ± 16.0abc	168 ± 65a	57.5 ± 21.2abc	29.8 ± 2.8de	23.3 ± 4.7bcd	911 ± 184	2539 ± 76g	1068 ± 201c
7.5%SCG-DM	149 ± 10ab	333 ± 37a	53.0 ± 13.7abc	381 ± 67bc	21.4 ± 10.8ab	16.4 ± 2.5ab	16.7 ± 2.8abc	971 ± 78	575 ± 414ab	400 ± 200a
7.5%SCG-DA	323 ± 42abc	316 ± 46a	75.1 ± 6.8bc	899 ± 113de	29.6 ± 9.5ab	11.6 ± 0.7a	18.7 ± 0.7abc	1674 ± 158	1584 ± 184f	720 ± 74abc
15%SCG-DB	166 ± 33ab	369 ± 121a	50.7 ± 9.0abc	227 ± 61a	44.5 ± 33.7ab	31.5 ± 5.1e	21.4 ± 3.0abcd	910 ± 177	957 ± 8bcde	1035 ± 66c
15%SCG-DM	143 ± 14a	367 ± 67a	43.0 ± 3.9ab	309 ± 21ab	25.1 ± 7.4a	17.2 ± 0.8ab	15.5 ± 1.9ab	903 ± 105	1472 ± 200ef	905 ± 252bc
15%SCG-DA	227 ± 27ab	344 ± 43a	61.0 ± 8.3abc	841 ± 208cde	40.4 ± 5.3ab	18.4 ± 1.5ab	16.1 ± 1.8ab	1433 ± 439	1428 ± 288def	808 ± 245abc

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). SCG, posos de café; DA, dosis alta de N; DM, dosis media de N; DB, dosis baja de N.

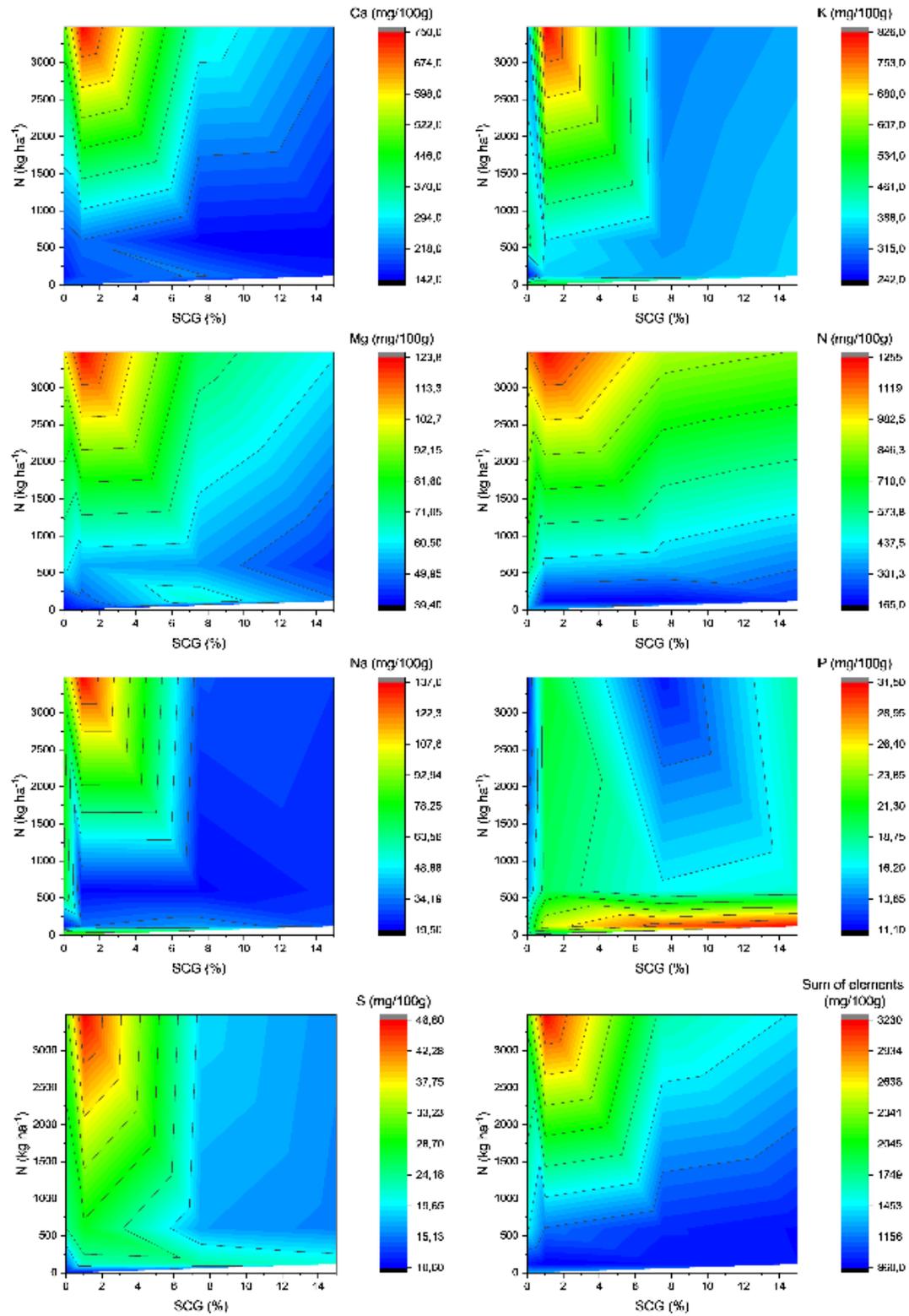
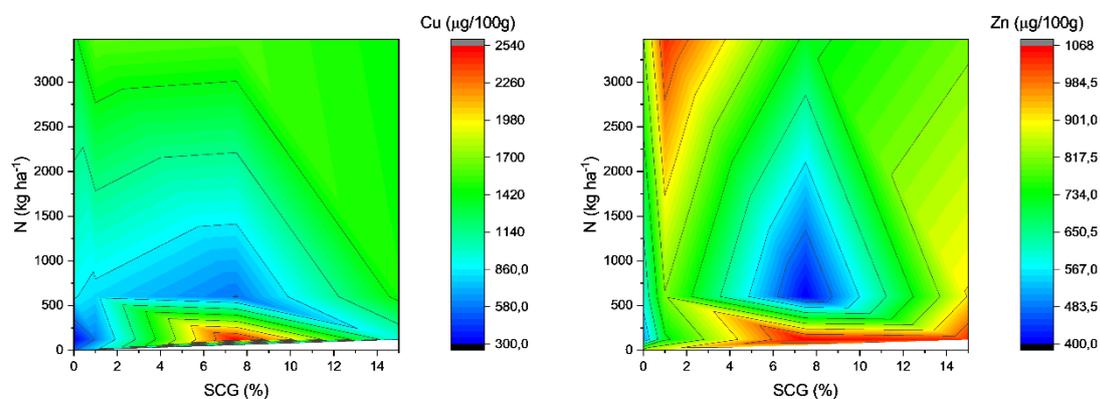


Figura 63. Gráfico de contorno 2 D (SCG frente a N) para los distintos elementos minerales.

Ca. Las diferencias en los resultados obtenidos pueden ser atribuidas al sustrato utilizado. En nuestro caso y en el trabajo de Caliskan et al. (2020), el sustrato utilizado es de naturaleza mineral, sin embargo, Cruz et al. (2014) utilizaron un sustrato de naturaleza orgánica (turba). Con respecto al N en la planta es importante señalar como a mayor cantidad de N en el suelo, no se produce un mayor contenido de N en la planta. En la **Tabla 26** observamos como la mayor cantidad de N en el suelo corresponde a la muestra 15%-DA, sin embargo, este N no parece estar biodisponible para la planta. Hardgrove y Livesley (2016) reportaron que en las muestras con un 5% de SCG (con o sin fertilizante) no se producía el proceso de nitrificación en el suelo.

Los microelementos Cu y Zn presentan un comportamiento algo distinto al de los macronutrientes, apareciendo dos máximos de concentración: uno en dosis bajas de SCG con dosis altas de N (comportamiento similar al de los macronutrientes), pero también presentan un máximo absoluto a dosis media de SCG y dosis baja de N (**Tabla 27** y **Figura 64**).



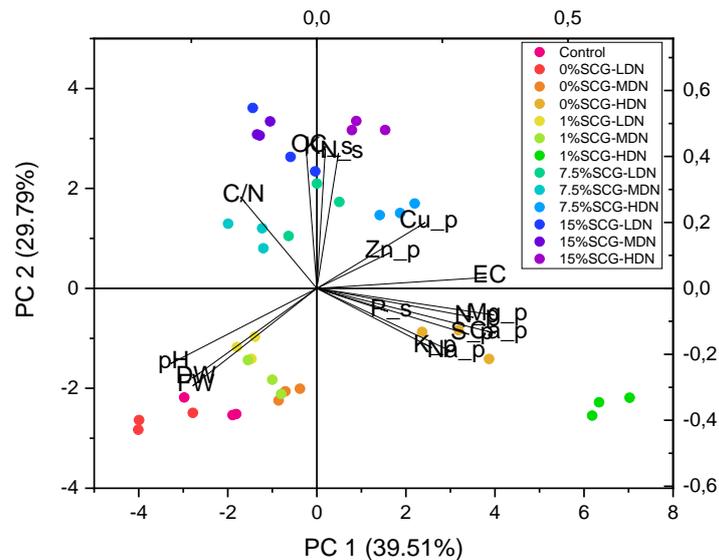
**Figura 64.** Gráfico de contorno 2 D (SCG frente a N) para los microelementos Cu y Zn.

Por el contrario, Cruz et al. (2014b) encontraron una disminución de los contenidos de Cu y Zn en lechuga, al adicionar SCG frescos, lo que podríamos atribuir al distinto sustrato utilizado por estos autores, como hemos dicho anteriormente. La capacidad quelante y movilizadora de los SCG ha sido

investigada por otros autores, y es una propiedad favorable en su utilidad como enmiendas orgánicas del suelo y merece una mayor experimentación.

#### 4.6.4. Análisis de correlaciones y componentes principales

El análisis de componentes principales (**Figura 65**) y los coeficientes de correlación (**Tabla 28**) fueron calculados para una matriz que contenía los elementos minerales de la lechuga (Ca, Mg, Na, K, N, Cu y Zn), los parámetros de crecimiento de la lechuga (peso fresco y peso seco) y los parámetros de suelo (pH, CE<sub>25</sub>, CO, N, P y K). Las puntuaciones (scores) de cada muestra fueron superimpuestas a las cargas (loadings) de cada parámetro (**Figura 65**). PC1 vs PC2 fue representado en un diagrama de dispersión y ambos componentes explicaron el 69.30% de la varianza del sistema.



**Figura 65.** Gráfico superpuesto de las puntuaciones obtenidas del PCA para las muestras (PC2 vs PC1) y cargas de los parámetros del suelo y elementos minerales de las lechugas. FW, peso fresco; DW, peso seco; \_s, elementos en suelo; \_p, elementos en planta; LDN, baja dosis de N; MDN, media dosis de N; HDN, alta dosis de N.

El peso fresco, el peso seco y el pH aparecen juntos, con los mayores valores de PC2, cerca de las muestras 0%, 0%-DB, 0%-DM, 1%-DB y 1%DM,

es decir, aquellas muestras con pesos de lechuga más altos y valores de pH más cercanos a la basicidad; esto además se corrobora con la fuerte correlación entre el peso fresco y peso seco ( $r = 0.980$ ), peso fresco y pH ( $r = 0.752$ ) y peso seco y pH ( $r = 0.809$ ). Los contenidos de CO, N, y K del suelo aparecen juntos, con los valores más bajos del PC2, cerca de las muestras con mayor adición de SCG, ya que la adición de este residuo incrementa los contenidos de estos macroelementos en el suelo, como ya indicamos anteriormente; esto también se ve reflejado por las fuertes correlaciones entre dichos elementos: CO y N ( $r = 0.911$ ), K y N ( $r = 0.934$ ) y OC y K ( $r = 0.947$ ). Por otro lado, los macroelementos en planta (Na, K, Ca, N y S) aparecen juntos con los mayores valores de PC1, cerca de las muestras 0%-DA y 1%-DA. Esta muestra se encuentra en los valores más altos de PC1 indicando el carácter biofortificador de la dosis baja de SCG y dosis alta de N; esto además se corrobora con la fuerte correlación entre los macroelementos en planta (se destacan aquellas correlaciones con un  $r$  superior a 0.700): Ca y Mg ( $r = 0.977$ ), Ca y N ( $r = 0.750$ ), Ca y S ( $r = 0.768$ ), K y Na ( $r = 0.939$ ), N y Mg ( $r = 0.743$ ) y Mg y S ( $r = 0.792$ ).

**Tabla 28.** Coeficientes de correlación de las variables seleccionadas (n=39).

	pH	CE <sub>25</sub>	CO	N <sub>s</sub>	C/N	P <sub>s</sub>	K <sub>s</sub>	Ca <sub>p</sub>	K <sub>p</sub>	Mg <sub>p</sub>	N <sub>p</sub>	Na <sub>p</sub>	P <sub>p</sub>	S <sub>p</sub>	Cu <sub>p</sub>	Zn <sub>p</sub>	PF
CE <sub>25</sub>	-0.868**																
CO	-0.430**																
N <sub>s</sub>	-0.602**		0.911**														
C/N		-0.419**	0.705**	0.373*													
P <sub>s</sub>					-0.369*												
K <sub>s</sub>	-0.550**		0.947**	0.934**	0.527**												
Ca <sub>p</sub>	-0.471**	0.746**			-0.481**												
K <sub>p</sub>		0.253						0.536**									
Mg <sub>p</sub>	-0.585**	0.784**			-0.433**			0.977**	0.469**								
N <sub>p</sub>	-0.675**	0.889**			-0.545**			0.750**	0.406*	0.743**							
Na <sub>p</sub>		0.358*	-0.451**	-0.451**	-0.324		-0.436**	0.695**	0.939**	0.610**	0.485**						
P <sub>p</sub>		-0.371*			0.386*						-0.491**						
S <sub>p</sub>	-0.325*	0.513**	-0.333*		-0.392*	0.378*		0.768**	0.591**	0.792**	0.542**	0.597**					
Cu <sub>p</sub>	-0.400*			0.334*													
Zn <sub>p</sub>										0.333*			0.378*				
PF	0.752**	-0.548**	-0.569**	-0.644**			-0.642**	-0.369*		-0.467**				-0.339*	-0.470**	-0.364*	
PS	0.809**	-0.599**	-0.535**	-0.633**			-0.619**	-0.404*		-0.525**	-0.344*			-0.414**	-0.465**	-0.331*	0.980**

CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C; CO, carbono orgánico; <sub>s</sub>, elemento en el suelo; <sub>p</sub>, elemento en la planta; PF, peso fresco; PS, peso seco. Significación estadística: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.6.5. Consideraciones finales

La adición de diferentes dosis de SCG junto con diferentes dosis de fertilizante nitrogenado en un ensayo *in vitro* tuvo diferentes efectos en el sistema suelo-planta. La adición de diferentes dosis de SCG a un suelo agrícola Mediterráneo inhibe el crecimiento de las lechugas y la suplementación con una dosis intermedia de N corrige parcialmente dicha limitación cuando la dosis de SCG es baja, pero a dosis medias y altas el efecto fitotóxico de los SCG es limitante. Las dosis altas de nitrógeno no eliminan la inhibición al crecimiento, sino que suponen además una toxicidad por salinidad en las plantas de lechuga. Con respecto a la nutrición mineral se observa como la combinación de 1% SCG junto con una dosis alta de N incrementa los contenidos de macroelementos y microelementos en planta. Sin embargo, una dosis del 7.5% SCG junto con una dosis baja de N favorece la acumulación de los microelementos Cu y Zn en lechuga, lo que puede atribuirse al efecto quelante de los SCG. Con respecto a la combinación óptima de los SCG junto con el N hay dos opciones: primar el crecimiento en cuyo caso se trataría 1% SCG-DM o primar el enriquecimiento de nutrientes en cuyo caso hablaríamos de 1%SCG-DA.



## **4.7. ENSAYO 7. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA SUELO-PLANTA DE SCG TRANSFORMADOS MEDIANTE COMPOSTAJE, VERMICOMPOSTAJE, CARBONIZACIÓN, LAVADO, HIDRÓLISIS E INCUBACIÓN EN SUELO**

### **4.7.1. Conocimiento previo**

Como ya se indicó en la Introducción de la presente tesis, los SCG se caracterizan por sus altos contenidos de materia orgánica representada por celulosa, hemicelulosa, lignina, proteínas, lípidos, polifenoles, ácidos clorogénicos, cafeína, etc. (Campos-Vega et al., 2015). Sin embargo, la adición directa de los SCG frescos a suelos agrícolas inhibe el crecimiento de ciertos cultivos (Hardgrove y Livesley, 2016; Ribeiro et al., 2017). Este efecto podría estar relacionado con la competencia por el N entre las raíces y los microorganismos del suelo (Kuzyakov y Zu, 2013), así como con la presencia de compuestos tóxicos en los SCG (Leifa et al., 2000). Por tanto, el compostaje de los SCG podría ser una alternativa rentable ya que permite la degradación de cafeína, polifenoles y taninos condensados; este tratamiento disminuye los efectos anti-fisiológicos y antinutricionales de los SCG sobre el crecimiento de las plantas, así como que da lugar a un producto final más transformado con una relación C/N más baja (An et al., 2019; Campos-Vega et al., 2015; Gummadi et al., 2012; Leifa et al., 2000; Santos et al., 2017). En este sentido, otros autores reportaron que el tipo de compost adicionado puede tener efectos significativos sobre el rendimiento y el contenido de ácidos fenólicos en las lechugas (Coria-Capuyán et al., 2009; Santos et al., 2017).

Ha sido ampliamente descrito en la bibliografía la absorción de diferentes micronutrientes por las plantas (como el Zn, Cu o Fe) en relación a la adición de enmiendas orgánicas. Sofu et al. (2016) reportaron que la adopción de un manejo orgánico, al comparar tres tratamientos de fertilización diferentes

(estiércol, polvo de roca y estiércol + polvo de roca) a suelos agrícolas, determinó rendimientos más altos y un mejor equilibrio de Cu en lechuga, aunque no se encontraron cambios para Fe y Zn en comparación con los controles (gestión convencional). Además, estos autores encontraron que el contenido de Fe + Zn + Cu en las hojas de lechugas verdes se correlacionó significativa y negativamente con la capacidad antioxidante total, así como con el contenido total de compuestos fenólicos (Santos et al., 2017). Otros investigadores encontraron que el fertilizante inorgánico de fósforo mejoró el crecimiento del maíz al reducir las concentraciones de Cu (66.3%) y Zn (91.9%) en las raíces y, por lo tanto, la absorción de metales por parte de la planta (Wu et al., 2017). Por otro lado, Kelly y Bateman (2010) no encontraron diferencias en el contenido de Zn, Cu y Fe al comparar lechugas cultivadas de manera orgánica y convencional.

Ribeiro et al. (2017) reportaron que los SCG podrían ser adecuados como enmienda orgánica de suelos si previamente se estabilizaban. En este sentido, se considerarán diferentes tratamientos estabilizadores de SCG en la presente Tesis Doctoral, como el prometededor compostaje y vermicompostaje (Murthy y Madhava Naidu, 2012), que podrían usarse para reciclar desechos industriales proporcionando una mejora de los nutrientes del suelo y finalmente un mejor crecimiento de la lechuga. Santos et al. (2017) reportaron que el compostaje de los SCG disminuyó los fenoles y taninos totales y aumentó el ácido gálico. Cruz et al. (2014b) encontraron que la presencia de la adición de 5% (v/v) de SCG compostado redujo significativamente los microelementos Cu y Fe, mientras que la adición de 30% (v/v) de SCG compostados directamente en el suelo (durante 4 meses) aumentó los niveles de Cu, Fe y Zn. Liu y Price (2011) encontraron que se pueden usar diferentes sistemas de compostaje (en el recipiente, pila estática aireada o vermicompostaje) para el compostaje de los SCG. El grupo de Ronga et al. (2016) reportaron que el compost de SCG podría

reemplazar a la turba (un sustrato de cultivo de alta demanda) para la producción de plantas en macetas.

Otros investigadores (Vardon et al., 2013) han reportado que la aplicación de biochar de SCG con fertilizante duplicó el rendimiento del sorgo, destacando su capacidad como enmienda del suelo. Sin embargo, sin la adición concomitante de fertilizantes inorgánicos a los suelos agrícolas, la aplicación aislada de biochar de SCG no aumentó el rendimiento de la biomasa (Vardon et al., 2013). Otros autores reportaron que el biochar redujo la toxicidad del compost y alivió el efecto inhibitorio de la capacidad de germinación de semillas en tratamientos con compost de paja de maíz y compost enriquecidos con SCG y efluente de levadura (Kopec et al., 2018). Del mismo modo, Kim et al. (2014) verificaron que el biochar de SCG (400 °C durante 20 min) facilita la superación del efecto fitotóxico de los SCG cuando se agrega a los suelos agrícolas y, por lo tanto, mejora el alargamiento de la raíz.

#### **4.7.2.Efecto de los tratamientos de los SCG sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo**

Las propiedades químicas y fisicoquímicas de las bio-enmiendas se muestran en la **Tabla 29**. Los SCG-frescos tienen un carácter ácido y alto contenido en C. Todos los compost derivados de los SCG se caracterizaron por su salinidad (alta  $CE_{25}$ ) y ambos SCGchar tuvieron contenidos de C superiores al 50%. El mayor contenido de fenoles se encontró en los SCG-frescos, etanol-SCG, SCG-H<sub>2</sub>O e SCG-hidro.

**Tabla 29.** Caracterización de las bio-enmiendas derivadas de los SCG.

Muestra	pH	CE <sub>25</sub> (dS/m)	CO (%)	N total (%)	C/N	Compuestos fenólicos totales (mg GAE/g)
SCG-frescos	5.8	6.03	49.43	2.220	22	7.644
Vermi-cabra	7.7	27.49	25.84	2.310	11	nd
SCG-vermi	7.8	48.28	40.63	5.770	7	nd
SCG-comp	7.3	22.55	29.33	2.653	11	0.008
SCGchar <sub>270</sub>	5.9	6.91	57.76	3.250	18	1.161
SCGchar <sub>400</sub>	7.2	11.95	69.22	4.400	16	nd
SCG-etanol	5.4	11.25	45.70	2.443	19	14.264
SCG-H <sub>2</sub> O	5.0	3.43	48.64	2.240	22	1.217
SCG-hidro	3.8	5.42	54.29	2.162	25	13.975

SCG, posos de café; CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C; CO, carbono orgánico; GAE, equivalentes de ácido gálico; nd, no detectado.

La influencia de los diferentes tratamientos sobre los parámetros químicos y fisicoquímicos del suelo se muestra en la **Tabla 30**. A pesar del carácter ácido de algunos materiales, como los SCG-frescos, SCG-H<sub>2</sub>O e SCG-hidro (**Tabla 29**), los valores de pH de los microcosmos se encontraron dentro de la neutralidad y basicidad, lo que está relacionado, como ya se ha indicado en otras ocasiones, por la capacidad tampón del suelo de Vega. Ha sido reportado previamente que la pirolisis de los SCG incrementa el pH del material fresco (Kim et al., 2018), lo que puede ser debido a la generación de cenizas durante la pirolisis (Nigussie et al., 2012). El vermicompostaje neutralizó el pH de los SCG, lo que coincide con Liu y Price (2011) y es atribuido a los hidróxidos básicos generados durante las primeras fases del proceso de vermicompostaje (Nogales et al., 2014). El compostaje con dolomita también incrementó el pH debido al carácter básico de la dolomita. En este sentido ninguna bio-enmienda puede ser perjudicial a causa de la acidez. Sin embargo, la salinidad de algunas bio-enmiendas si influyó negativamente en el suelo. Por ejemplo, la adición de SCG-vermi, comp-SCG y vermi-cabra incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) la CE<sub>25</sub> del suelo debido a la alta salinidad de estas bio-enmiendas (>20 dS/m, **Tabla 29**),

**Tabla 30.** Efecto de los diferentes tratamientos de los SCG sobre las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo.

Muestra	pH	CE <sub>25</sub> (dS/m)	CO (%)	N total (%)	C/N	P asimilable (ppm)	K asimilable (ppm)
SCG-frescos	7.9 ± 0.1 <sup>bc</sup>	1.38 ± 0.03 <sup>c</sup>	6.12 ± 0.44 <sup>c</sup>	0.437 ± 0.023 <sup>e</sup>	14 ± 0 <sup>e</sup>	53 ± 3 <sup>ab</sup>	747 ± 14 <sup>e</sup>
NoBE	8.4 ± 0.0 <sup>g</sup>	1.03 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.163 ± 0.006 <sup>a</sup>	9 ± 0 <sup>b</sup>	46 ± 1 <sup>a</sup>	421 ± 11 <sup>c</sup>
NPK	8.0 ± 0.0 <sup>de</sup>	1.91 ± 0.08 <sup>d</sup>	1.62 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.193 ± 0.049 <sup>a</sup>	9 ± 2 <sup>b</sup>	68 ± 3 <sup>cde</sup>	305 ± 13 <sup>a</sup>
NoBE-inc	8.4 ± 0.0 <sup>g</sup>	1.03 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.150 ± 0.000 <sup>a</sup>	10 ± 1 <sup>b</sup>	51 ± 2 <sup>ab</sup>	347 ± 6 <sup>b</sup>
SCG-inc	8.2 ± 0.1 <sup>f</sup>	1.37 ± 0.03 <sup>c</sup>	4.17 ± 0.24 <sup>d</sup>	0.347 ± 0.006 <sup>bc</sup>	12 ± 1 <sup>cd</sup>	61 ± 2 <sup>bcd</sup>	766 ± 18 <sup>ef</sup>
Vermi-cabra	8.0 ± 0.0 <sup>cde</sup>	3.08 ± 0.11 <sup>e</sup>	3.14 ± 0.68 <sup>b</sup>	0.337 ± 0.070 <sup>b</sup>	9 ± 0 <sup>b</sup>	140 ± 24 <sup>f</sup>	549 ± 5 <sup>d</sup>
SCG-vermi	7.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	4.76 ± 0.23 <sup>f</sup>	4.24 ± 0.24 <sup>d</sup>	0.613 ± 0.031 <sup>f</sup>	7 ± 0 <sup>a</sup>	79 ± 4 <sup>c</sup>	1047 ± 14 <sup>g</sup>
SCG-comp	8.0 ± 0.0 <sup>e</sup>	2.98 ± 0.07 <sup>e</sup>	3.44 ± 0.44 <sup>bc</sup>	0.383 ± 0.068 <sup>bcd</sup>	9 ± 0 <sup>b</sup>	59 ± 5 <sup>bc</sup>	544 ± 25 <sup>d</sup>
SCGchar <sub>270</sub>	8.0 ± 0.0 <sup>cde</sup>	1.34 ± 0.02 <sup>bc</sup>	5.71 ± 0.83 <sup>e</sup>	0.417 ± 0.055 <sup>cd</sup>	14 ± 1 <sup>c</sup>	61 ± 1 <sup>bcd</sup>	791 ± 4 <sup>f</sup>
SCGchar <sub>400</sub>	8.4 ± 0.0 <sup>g</sup>	1.16 ± 0.05 <sup>ab</sup>	5.95 ± 0.45 <sup>e</sup>	0.455 ± 0.092 <sup>c</sup>	13 ± 2 <sup>de</sup>	67 ± 5 <sup>cde</sup>	749 ± 22 <sup>e</sup>
SCG-etanol	8.0 ± 0.1 <sup>cd</sup>	1.50 ± 0.07 <sup>c</sup>	3.95 ± 0.62 <sup>cd</sup>	0.333 ± 0.031 <sup>b</sup>	12 ± 1 <sup>c</sup>	70 ± 3 <sup>cde</sup>	789 ± 6 <sup>f</sup>
SCG-H <sub>2</sub> O	8.8 ± 0.0 <sup>h</sup>	1.34 ± 0.11 <sup>bc</sup>	4.39 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.327 ± 0.006 <sup>b</sup>	13 ± 0 <sup>e</sup>	72 ± 3 <sup>de</sup>	555 ± 4 <sup>d</sup>
SCG-hidro	7.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.98 ± 0.28 <sup>d</sup>	3.75 ± 0.16 <sup>bcd</sup>	0.327 ± 0.006 <sup>b</sup>	11 ± 0 <sup>c</sup>	75 ± 10 <sup>e</sup>	766 ± 53 <sup>ef</sup>

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). SCG, posos de café; CE<sub>25</sub>, conductividad eléctrica medida a 25°C; CO, carbono orgánico

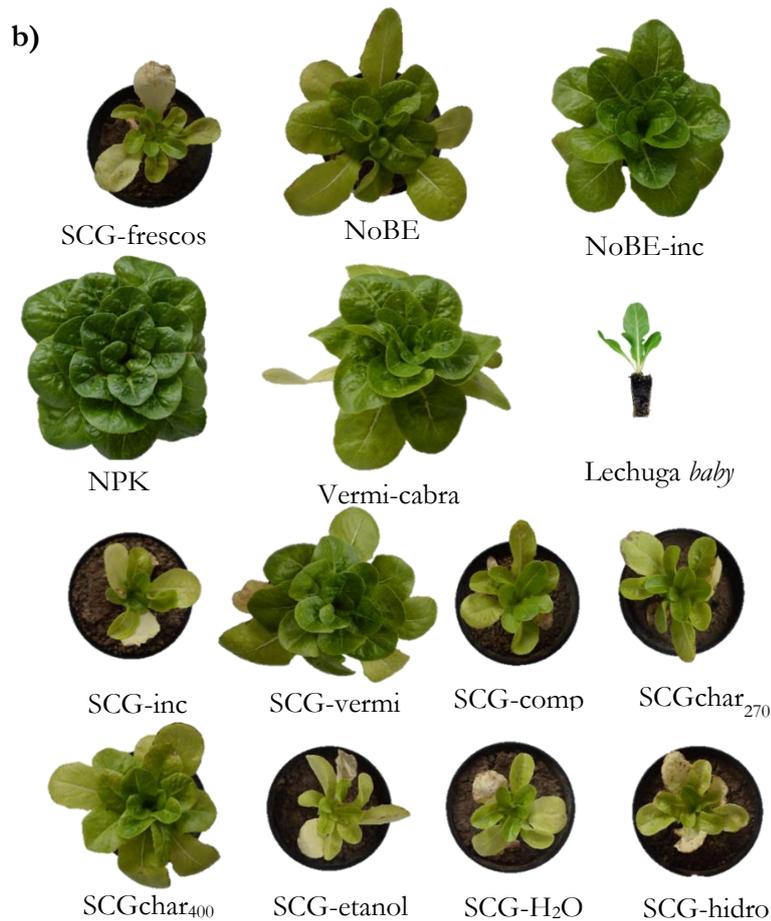
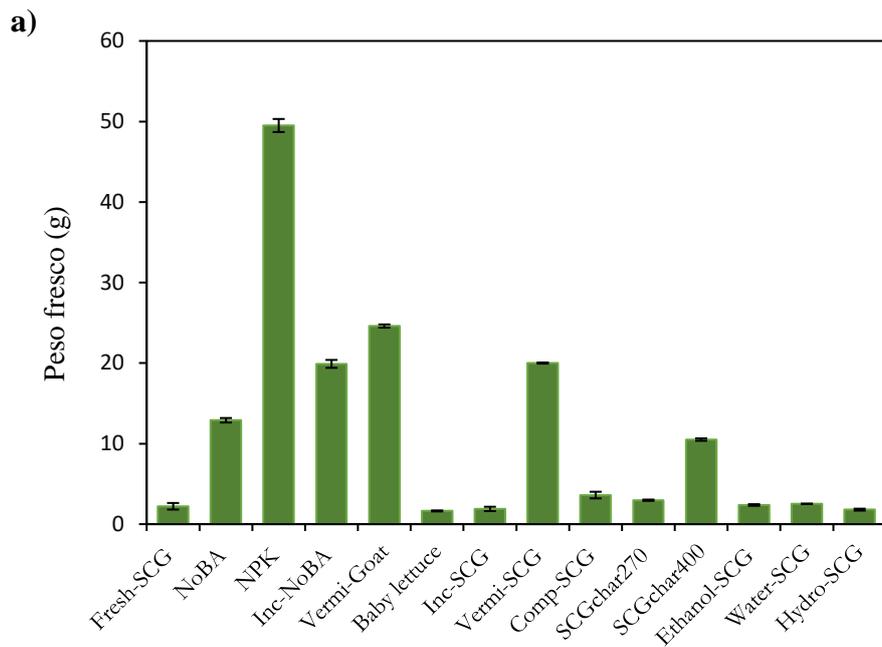
dando lugar a salinidades significativamente mayores que aquellas obtenidas al adicionar SCG. El vermicompostaje fue el tratamiento que incrementó en mayor medida la salinidad, lo que es contrario a lo que comúnmente es reportado para los vermicompost (Nogales et al., 2014). Sin embargo, esta propiedad podría estar directamente relacionada con las condiciones específicas del proceso de vermicompostaje. Las muestras de suelo adicionados con SCG-vermi podrían ser consideradas moderadamente salinas, lo que podría afectar a algunos cultivos (Navarro y Navarro, 2013). En este sentido, algunos estudios reportaron que  $CE_{25}$  mayores de 1.1 dS/m reducen significativamente el crecimiento de las lechugas (Ünlükara et al., 2008). En el caso de la relación C/N, los valores se encuentran entre 7 y 14, siendo las que tienen menor relación las muestras SCG-vermi, debido a su alto contenido en N. De hecho, SCG-vermi es el material más humificado con una C/N de 7 (**Tabla 29**). Sin embargo, las bio-enmiendas que aportaron mayor cantidad de C al suelo (y que pueden servir como sumideros de carbono) fueron los SCG y los biochar, siendo el SCGchar<sub>400</sub>, la bio-enmienda derivada de los SCG que aportó mayor cantidad de C (**Tabla 29**). Las bio-enmiendas vermi-cabra y SCG-vermi incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) las cantidades de P y K disponible, respectivamente, alcanzando valores de 140 ppm de P y 1047 ppm de K. Esto podría estar relacionado con las altas cantidades de K en los SCG-frescos (3800 ppm), como estableció Liu y Price (2011).

#### **4.7.3. Peso fresco de las lechugas cultivadas con los diferentes tratamientos de los SCG**

La adición de SCG-frescos disminuyó significativamente ( $p < 0.001$ ) el peso fresco de las lechugas en relación a las muestras NoBE (**Figura 66**), como ya se ha reportado previamente para este vegetal (Cruz et al., 2015; Hardgrove y Livesley, 2016), y para zanahoria y espinacas (Cruz y Cordovil, 2015). Otros

autores también encontraron el mismo efecto cuando diferentes enmiendas relacionadas con los SCG (SCG fresco mezclados con compost y cenizas) fueron directamente añadidos a suelos (Kopec et al., 2018; Ribeiro et al., 2017). De manera contraria, la fertilización inorgánica con NPK aumentó significativamente la biomasa de las lechugas con respecto a las muestras NoBE y a las muestras adicionadas con SCG-frescos (**Figura 66**).

Se encontró un efecto positivo sobre el peso fresco cuando el suelo fue previamente incubado durante 40 días previo al comienzo del experimento (*efecto barbecho*, NoBE-inc). El barbecho son los periodos no productivos que permiten al suelo descansar para tener elementos nutrientes suficientes para el próximo ciclo productivo (Wojtkowski, 2010). En este sentido, los pesos frescos de las lechugas NoBE-inc incrementaron significativamente ( $p < 0.001$ ) con respecto a las lechugas NoBE ( $19.9 \pm 0.49$  y  $12.9 \pm 0.28$ , respectivamente; **Figura 66**). Sin embargo, este efecto positivo del barbecho no fue encontrado cuando comparamos los pesos frescos de las lechugas cultivadas con SCG-frescos con las lechugas Inc-SCG ( $2.22 \pm 0.41$  y  $1.89 \pm 0.27$ , respectivamente; **Figura 66**). Este hecho puede estar probablemente relacionado con el corto periodo de incubación (sólo 40 días) lo que podría no ser suficiente para obtener la necesaria degradación de los compuestos anti-fisiológicos y anti-nutricionales de los SCG frescos como son la cafeína, los polifenoles y los taninos condensados (Campos-Vega et al., 2015; Gummadi et al., 2012; Santos et al., 2017). En este sentido, Cruz et al. (2015) encontraron que 4 meses de barbecho de los SCG (llamado “compostaje directo” en su estudio) fueron suficientes para eliminar la cafeína por medio de la degradación con microorganismos o lixiviación. El “pobre” efecto barbecho de los SCG (Inc-SCG, **Figura 66**) puede estar relacionado con la competencia por el N entre los microorganismos existentes y la planta, lo que podría afectar a la productividad de la lechuga (Cruz y Cordovil, 2015; Kuzyakov y Yu, 2013).



**Figura 66.** a) Peso fresco de las lechugas (diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ ). b) Imágenes de las lechugas después de 40 días de cultivo.

Un aspecto positivo del efecto inhibitorio de los SCG sobre el crecimiento de las plantas es que pueden ser utilizados como control de plagas en sistemas de rotación de cultivos con periodos de barbecho (Yamane et al., 2014).

El efecto inhibitorio de los SCG-frescos desaparece cuando los SCG son sometidos a diferentes tratamientos como el vermicompostaje o la pirolisis a 400°C, y en menor medida cuando se compostaron con dolomita o pirolizaron a 270°C (**Figura 66**). Además, se demostró que el vermicompostaje y la pirolisis a 400°C fueron los únicos tratamientos de los SCG que eliminaron completamente los fenoles de los SCG; por tanto, la limitación al crecimiento podría estar directamente relacionada con el contenido de fenoles totales en las bioenmiendas. En ese sentido, varios autores reportaron que tratamientos de los SCG como el compostaje y el vermicompostaje (Liu y Price, 2011; Santos et al., 2017) o la pirolisis (Kim et al., 2014; Kopec et al., 2018; Vardon et al., 2013) podrían generar un producto más adecuado para propuestas agrícolas, facilitando la superación del efecto fitotóxico de los SCG.

En este estudio también se ha evaluado y comparado la influencia sobre productividad de la lechuga de los SCG compostados y el vermicompost de cabra, el cual es un buen fertilizante empleado en agricultura orgánica (Hussain y Abbasi, 2018). La adición de SCG-vermi incrementó significativamente el peso fresco de las lechugas (**Figura 66**) aunque la adición de vermi-cabra también aumentó significativamente ( $p < 0.001$ ) la productividad de la lechuga (24.6 g) de una manera similar a la adición de SCG-vermi (20 g). Este hecho abre la posibilidad del uso de SCG-vermi como una alternativa útil a otras enmiendas orgánicas utilizadas tradicionalmente en agricultura orgánica, así como también una alternativa ecológica y sostenible a los fertilizantes inorgánicos como el NPK. A pesar de todo ello, la productividad de las lechugas fue significativamente mayor cuando se utilizó fertilizante inorgánico NPK (49.5 g) con respecto a cualquier otro tratamiento (**Figura 66**). Teniendo en cuenta sólo los resultados de los pesos frescos de las lechugas, la agricultura

convencional sería la práctica más recomendada para la producción de cultivos, pero en posteriores secciones discutiremos la capacidad nutricional de la lechuga en relación a su contenido en micronutrientes lo que generará un criterio diferente para la elección de fertilizante a escoger.

La adición de comp-SCG incrementó ligeramente la biomasa de las lechugas con respecto a las lechugas cultivadas con SCG-frescos ( $3.61 \pm 0.41$  g vs.  $2.22 \pm 0.41$  g peso fresco, respectivamente,  $p < 0.001$ ), aunque fue significativamente más bajo que las muestra control NoBE ( $12.9 \pm 0.28$  g, peso fresco; **Figura 66**). Durante la elaboración del comp-SCG, se añadió dolomita (que contiene Ca y Mg) para neutralizar la acidez de los SCG. Mulie et al. (2019) también añadió dolomita a un compost de estiércol y encontró que se triplicó el número de hojas del árbol. Kammoun et al. (2017) también reportaron el efecto positivo del compost adicionado de fosfoyeso (elaborado con mezcla de SCG y residuos de la industria del aceite, que contenían Ca y otros iones) sobre el crecimiento de patatas y el rendimiento del tubérculo.

En general, la pirolisis de los residuos puede aumentar el crecimiento de las plantas y el rendimiento a través de la mejora de las propiedades químicas del suelo (Palansooriya et al., 2019). En nuestro ensayo, la adición de SCGchar<sub>270</sub> y SCGchar<sub>400</sub> incrementaron significativamente el peso de las lechugas en relación a las lechugas cultivadas con SCG-frescos (**Figura 66**); sin embargo, en el caso del SCGchar<sub>270</sub> el incremento fue menor. Por tanto, es necesario aplicar mayores temperaturas para conseguir una completa ruptura de la materia orgánica. En este sentido, 400°C durante 30 min generó lechugas con un peso fresco de 10.5 g y 270°C durante 60 min unas lechugas de 2.97 g (**Figura 66**). En un ensayo de fitotoxicidad con semillas *Raphanus sativus* L., Comino et al. (2017) reportaron que el tratamiento térmico de los SCG a 270°C era suficiente para eliminar la toxicidad debido a la disminución de compuestos hidrofóbicos por mineralización, volatilización y transformación. Otros autores (Lima et al., 2018) también reportaron que la adición de biochar de la cascarilla

del café (530°C durante 10 a 12 h bajo condiciones limitadas de humedad) mejoró el crecimiento del maíz en un suelo arenoso. De manera similar, Kim et al. (2014) reportaron que después de 4 semanas de cultivo, las raíces del bok choy tuvieron una mayor elongación cuando fueron tratadas con SCGchar (400°C durante 30 min) comparado con aquellas cultivadas sólo con SCG, aunque tal elongación fue menor que las muestras control (sin SCG). Vardon et al. (2013) encontraron un resultado similar en la planta de sorgo, pero ellos especificaron que para incrementar el rendimiento del cultivo fue necesario acompañar la aplicación del biochar con fertilizante inorgánico. Consecuentemente, la adición de SCGchar podría parcialmente superar los problemas de fitotoxicidad generados por la adición de SCG.

La **Figura 66** muestra el comportamiento del peso fresco de las lechugas con diferentes productos derivados de los SCG. No hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) para las lechugas cultivadas con SCG-frescos, etanol-SCG, SCG-H<sub>2</sub>O o SCG-hidro. Este hecho señala que aquellos componentes de los SCG relacionados con la disminución de la productividad de las lechugas (como son los polifenoles) no fueron eliminados mediante lavado con agua o con etanol, o mediante hidrólisis a altas temperaturas (**Tabla 29**).

En resumen, los SCG y sus bio-enmiendas derivadas, tienen dos posibles comportamientos en relación al crecimiento de las lechugas (**Figura 66**): i. Cuando los polifenoles no son detectados (SCG-vermi, vermi-cabra y SCGchar<sub>400</sub>, **Tabla 30**) las lechugas tienen un comportamiento similar o mayor al de la muestra control NoBE. ii. Cuando los polifenoles siguen presentes (SCG-frescos, comp-SCG, SCGchar<sub>270</sub>, etanol-SCG, SCG-H<sub>2</sub>O e SCG-hidro, **Tabla 30**) la limitación al crecimiento de las lechugas es evidente.

#### 4.7.4. Comparación entre los SCG-frescos y otras bio-enmiendas en relación a los contenidos de Zn, Cu y Fe en lechugas

La adición de SCG-frescos incrementó significativamente ( $p < 0.001$ ) las concentraciones de Zn, Cu y Fe en las lechugas (**Tabla 31**) en relación a los tratamientos NoBE y NoBE-inc. Este es un efecto positivo de la adición de SCG-frescos como enmienda orgánica de suelos agrícolas ya que incrementa el valor nutricional de las lechugas. Por el contrario, Cruz et al. (2014) encontraron una disminución de los niveles de Zn y Fe en las lechugas cultivadas en suelos adicionados con diferentes concentraciones de SCG, y un incremento en Cu solo a dosis altas (10 a 20%) comparado con aquellas cultivadas en suelos sin adición de SCG. Estos resultados no son comparables con los reportados en esta tesis ya que el grupo de Cruz et al. (2014) no usa suelos agrícolas reales, sino que añadió los SCG-frescos a turba lo que tiene influencia sobre las características nutricionales de las plantas (Ceglie et al., 2015).

El efecto barbecho no tuvo influencia sobre los niveles de Zn, Cu y Fe en las hojas de lechugas cuando los suelos agrícolas (0% SCG) fueron previamente incubados durante 40 días antes del comienzo del experimento ( $p > 0.05$ ; **Tabla 31**). Resultados similares fueron obtenidos en lechugas cultivadas con SCG-frescos cuando se compararon con las lechugas Inc-SCG ( $p > 0.05$ ; **Tabla 31**). Probablemente el tiempo utilizado para el efecto barbecho no fue el suficiente para permitir la descomposición de algunos de los componentes de los SCG lo que facilitaría la absorción de estos elementos por la lechuga.

La adición de SCG-vermi disminuyó significativamente las concentraciones de Zn y Fe ( $p < 0.05$ ), y Cu ( $p < 0.001$ ) en las lechugas en comparación con las muestras adicionadas con SCG-frescos (**Tabla 31**). Estos resultados son similares a aquellos reportados por Cruz et al. (2014) para SCG compostados y podría estar relacionado con una reducción en la estructura del carbono de los SCG, disminuyendo su capacidad quelante. En este sentido, el vermicompostaje probablemente causó la descomposición de algunos

componentes naturales y orgánicos de los SCG, específicamente melanoidinas y polifenoles (**Tabla 29**), los cuales han sido reportados como agentes quelantes que facilitan la absorción de elementos, y por tanto la disponibilidad por la planta (Morikawa y Saigusa, 2011). Consecuentemente, el vermicompostaje podría debilitar la disponibilidad de Zn, Cu y Fe. Específicamente para el Fe, algunos investigadores han reportado cómo las melanoidinas de café pueden quelar este elemento (Rufián-Henares y de la Cueva, 2009), lo que podría ser una explicación del incremento de Fe en la planta. Resultados similares han sido establecidos por Coulibaly et al. (2018) describiendo un incremento en el rendimiento de cultivo y una disminución de Zn y Cu en *Lagenaria siceraria* cultivada con vermicompost. Además, las lechugas cultivadas con comp-SCG disminuyeron significativamente las concentraciones de Fe y con tendencia a la significación los niveles de Cu ( $p = 0.061$ ), cuando se compararon con lechugas cultivadas con SCG-frescos (**Tabla 31**). Este resultado podría ser explicado de una manera similar que para el vermicompost de SCG.

De manera similar a lo reportado para el SCG-vermi, la adición de SCGchar<sub>400</sub> disminuyó significativamente los contenidos de Zn ( $p < 0.01$ ), Cu ( $p < 0.001$ ) y Fe ( $p < 0.05$ ) con respecto a las muestras cultivadas con SCG-frescos (**Tabla 31**). Esto está en línea con los resultados encontrados por Kim et al. (2014) quienes establecieron que los SCGchar a 400°C retuvieron menos cantidad de nutrientes por la formación de complejos ligandos de metales que precipitan a los minerales en la superficie de las partículas del suelo, aunque otros investigadores encontraron un comportamiento contrario para biochar de SCG en condiciones similares (a 450°C, Vardon et al., 2013).

**Tabla 31.** Contenidos de Zn, Cu y Fe en lechugas (peso fresco) y cantidades bioamisolables de Zn, Cu y Fe en suelos cultivadas/tratados, respectivamente, con diferentes tratamientos de SCG.

Muestra	Zn (mg/100g)	Cu (mg/100g)	Fe (mg/100g)
<b>Lechugas</b>			
SCG-frescos	0.47 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.37 ± 0.79 <sup>a</sup>	12.9 ± 1.57 <sup>a</sup>
NoBE	0.18 ± 0.03 <sup>bc</sup>	0.81 ± 0.28 <sup>c</sup>	5.19 ± 3.96 <sup>bc</sup>
NPK	0.14 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.82 ± 1.11 <sup>b</sup>
NoBE-inc	0.14 ± 0.02 <sup>bd</sup>	0.26 ± 0.06 <sup>d</sup>	4.91 ± 2.79 <sup>bd</sup>
Vermi-cabra	0.22 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.31 ± 0.19 <sup>bc</sup>	3.21 ± 1.99 <sup>bd</sup>
Lechuga <i>baby</i>	0.32 ± 0.01 <sup>f</sup>	4.80 ± 0.25 <sup>f</sup>	1.46 ± 0.13 <sup>bf</sup>
SCG-inc	0.39 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.42 <sup>a</sup>	12.3 ± 7.47 <sup>ab</sup>
SCG-vermi	0.26 ± 0.04 <sup>g</sup>	0.35 ± 0.08 <sup>g</sup>	5.74 ± 2.83 <sup>bg</sup>
SCG-comp	0.48 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.63 <sup>h</sup>	5.60 ± 1.47 <sup>bh</sup>
SCGchar <sub>270</sub>	0.58 ± 0.11 <sup>h</sup>	2.40 ± 0.65 <sup>a</sup>	15.8 ± 9.22 <sup>ab</sup>
SCGchar <sub>400</sub>	0.21 ± 0.02 <sup>bi</sup>	0.65 ± 0.11 <sup>i</sup>	5.46 ± 0.80 <sup>i</sup>
SCG-etanol	0.38 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.52 <sup>a</sup>	10.6 ± 4.52 <sup>a</sup>
SCG-H <sub>2</sub> O	0.47 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.46 <sup>a</sup>	12.7 ± 3.98 <sup>a</sup>
SCG-hidro	0.44 ± 0.09 <sup>a</sup>	3.12 ± 0.86 <sup>a</sup>	17.2 ± 6.37 <sup>a</sup>
<b>Suelos</b>	<b>Zn bioasimilable (ppm)</b>	<b>Cu bioasimilable (ppm)</b>	<b>Fe bioasimilable (ppm)</b>
SCG-frescos	0.189 ± 0.029 <sup>a</sup>	0.711 ± 0.021 <sup>a</sup>	0.293 ± 0.021 <sup>ab</sup>
NoBE	0.131 ± 0.006 <sup>bc</sup>	0.776 ± 0.009 <sup>c</sup>	0.262 ± 0.009 <sup>abc</sup>
NPK	0.132 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.836 ± 0.017 <sup>b</sup>	0.256 ± 0.005 <sup>ab</sup>
NoBE-inc	0.126 ± 0.010 <sup>bd</sup>	0.779 ± 0.008 <sup>d</sup>	0.251 ± 0.003 <sup>bd</sup>
Vermi-cabra	0.560 ± 0.047 <sup>e</sup>	0.816 ± 0.023 <sup>bc</sup>	0.236 ± 0.025 <sup>be</sup>
SCG-inc	0.163 ± 0.014 <sup>f</sup>	0.710 ± 0.033 <sup>a</sup>	0.260 ± 0.010 <sup>a</sup>
SCG-vermi	0.419 ± 0.075 <sup>g</sup>	0.574 ± 0.050 <sup>f</sup>	0.314 ± 0.023 <sup>a</sup>
SCG-comp	0.239 ± 0.015 <sup>h</sup>	0.623 ± 0.021 <sup>g</sup>	0.257 ± 0.009 <sup>ab</sup>
SCGchar <sub>270</sub>	0.134 ± 0.005 <sup>bi</sup>	0.684 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.230 ± 0.006 <sup>f</sup>
SCGchar <sub>400</sub>	0.123 ± 0.002 <sup>bj</sup>	0.656 ± 0.037 <sup>h</sup>	0.214 ± 0.004 <sup>g</sup>
SCG-etanol	0.170 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.709 ± 0.049 <sup>a</sup>	0.279 ± 0.032 <sup>ab</sup>
SCG-H <sub>2</sub> O	0.177 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.649 ± 0.021 <sup>i</sup>	0.287 ± 0.013 <sup>a</sup>
SCG-hidro	0.178 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.958 ± 0.025 <sup>i</sup>	0.290 ± 0.010 <sup>a</sup>

Para las lechugas o las muestras de suelo, diferentes letras en la misma columna *vs.* <sup>a</sup> para SCG-frescos y <sup>b</sup> para NPK, indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). SCG, spent coffee grounds.

En este sentido, Gunes et al. (2014) también reportaron una reducción en la concentración de Zn, Cu y Fe en lechugas cultivadas en suelos alcalinos adicionados de biochar a 300°C derivado de estiércol de ave. Sin embargo, la adición de SCGchar<sub>270</sub> incrementó (aunque no significativamente) la concentración de Cu y Fe en lechugas en relación a las lechugas cultivadas en SCG-frescos (**Tabla 31**). Este hecho puede ser debido a la presencia (aunque escasa) de polifenoles (1.16 mg GAE/g, **Tabla 29**).

Para evaluar si el vermicompost derivado de los SCG puede ser una buena alternativa en la agricultura orgánica, sus efectos fueron comparados con el vermicompost de cabra (vermi-cabra). Las concentraciones de Zn, Cu y Fe no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en las lechugas cultivadas con SCG-vermi y vermi-cabra. Por tanto, el SCG-vermi podría ser considerado una alternativa a los estiércoles vermicompostaje ya que aporta más micronutrientes y una mayor biomasa. El comportamiento similar entre ambos vermicompost está también relacionado al contenido en polifenoles, ya que no fueron detectados en ninguno de ellos (**Tabla 29**).

La **Tabla 31** muestra que las concentraciones de Zn, Cu y Fe en etanol-SCG, SCG-H<sub>2</sub>O e SCG-hidro no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) con respecto a las lechugas cultivadas con SCG-frescos, excepto para el caso del Cu en las muestras cultivadas con etanol-SCG cuyos niveles disminuyeron significativamente. Este hecho señala que los componentes de los SCG (polifenoles) relacionados con la absorción y la biodisponibilidad de elementos (Zn, Cu y Fe), no se eliminaron mediante estos tratamientos (**Tabla 29**).

Las concentraciones de Zn, Cu y Fe en las lechugas cultivadas con SCG-frescos fueron también comparadas con las lechugas *baby* (no cultivadas). Las concentraciones de Zn y Fe fueron significativamente más altas, mientras que las de Cu fueron significativamente más bajas (**Tabla 31**). Este incremento en Zn y Fe en las lechugas cultivadas con los SCG frescos podría ser atribuido a las altas cantidades aportadas por esta bio-enmienda, como se observa en la

**Tabla 6;** esto podría estar relacionado con el mismo mecanismo previamente mencionado: quelación por medio de polifenoles u otros compuestos quelantes aportados por los SCG frescos, lo que permite la movilización de estos elementos hacia la planta. Sin embargo, el comportamiento del Fe es más complejo.

En el primer capítulo de Resultados y Discusión (Ensayo 1) hemos reportado que el contenido de Cu, Zn y Fe disponible incrementó significativamente debido a la adición d SCG ya que estos contienen más cantidad de Cu, Zn y Fe que lo suelos (**Tabla 3**), así como otros investigadores indicaron para el Cu (Cruz et al., 2014). Sin embargo, el incremento en Cu, Fe y Zn no puede ser única y exclusivamente atribuido a la entrada de estos minerales por adición de la bio-enmienda. Esto se evidencia por el hecho de que, cuando los SCG son pirolizados, este procedimiento no elimina los elementos minerales, sino que los concentra, ya que el rendimiento de la pirolisis es de un 30% (Vardon et al., 2013). Sin embargo, la planta se enriquece cuando se adiciona SCGchar<sub>270</sub>, pero no se puede decir lo mismo para el caso de los SCGchar<sub>400</sub>. La principal diferencia entre ambos es que los polifenoles desaparecen cuando los SCG son pirolizados a 400°C. Este hecho nos lleva indudablemente a una hipótesis diferente que al aporte de micronutrientes.

Finalmente, la biodisponibilidad de Zn, Cu y Fe en los suelos adicionados con diferentes bio-enmiendas derivadas de los SCG fue también analizada tras el cultivo. Se encontró una disminución significativa en las cantidades de Zn y un incremento significativo en el Cu en los microcosmos sin adición (NoBE, NPK y NoBE-inc) con respecto a los microcosmos adicionados de SCG-frescos (**Tabla 31**). Además, la adición de SCG-frescos incrementó significativamente las cantidades de Zn y Fe biodisponibles en el suelo en comparación con SCGchar<sub>270</sub> y SCGchar<sub>400</sub> y Cu sólo para SCGchar<sub>400</sub> y SCG-H<sub>2</sub>O. Por otro lado, la adición de vermi-cabra, SCG-vermi y comp-SCG incrementó significativamente el Zn biodisponible en el suelo en relación al tratamiento con

SCG-frescos. En la bibliografía, el compostaje y el vermicompostaje son procesos que pueden incrementar la concentración en metales pesados como el Zn y el Cu, en el producto final (Brunetti et al., 2019) aunque resultados contrarios han sido también descritos (Nogales et al., 2014). En cuanto al biochar, Kim et al. (2014) encontraron que la adición de SCGchar<sub>400</sub> disminuyó las cantidades de Zn y Cu biodisponibles, lo que coincide con nuestros resultados (**Tabla 31**). Por otro lado, la adición de SCG-hidro incrementó significativamente los contenidos de Cu biodisponible, lo que puede ser debido al pH ácido de esta bio-enmienda (**Tabla 29**).

#### **4.7.5. Comparación entre el tratamiento NPK y la adición de bio-enmiendas en relación a los contenidos de Zn, Cu y Fe**

Hay muchos trabajos en la bibliografía que comparan la agricultura convencional con la fertilización orgánica en relación a su impacto sobre el valor nutricional de cultivos (Gomiero, 2018). En este sentido, las concentraciones de Zn, Cu y Fe en las lechugas cultivadas con NPK fueron comparadas con las lechugas cultivadas con el resto de los tratamientos. La fertilización inorgánica disminuyó los contenidos de los tres micronutrientes en todos los casos, pero esta disminución fue solo estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el caso de SCG-frescos, etanol-SCG, SCG-H<sub>2</sub>O e SCG-hidro, y sólo para Zn y Cu en el caso de Inc-SCG y SCGchar<sub>270</sub>. De particular interés es la comparación entre los SCG-frescos y el NPK, dónde los SCG-frescos incrementaron significativamente los contenidos de Zn ( $p < 0.001$ ), Cu ( $p < 0.001$ ) y Fe ( $p < 0.01$ ) con respecto a las lechugas cultivadas con NPK (**Tabla 31**). Estos hechos refuerzan la idea de que aquellos tratamientos que incrementan en mayor medida el valor nutricional de las lechugas tienen compuestos quelantes que no han sido eliminados o dónde la transformación de estas moléculas no ha tenido lugar. Otros autores reportan que la fertilización inorgánica con P al suelo

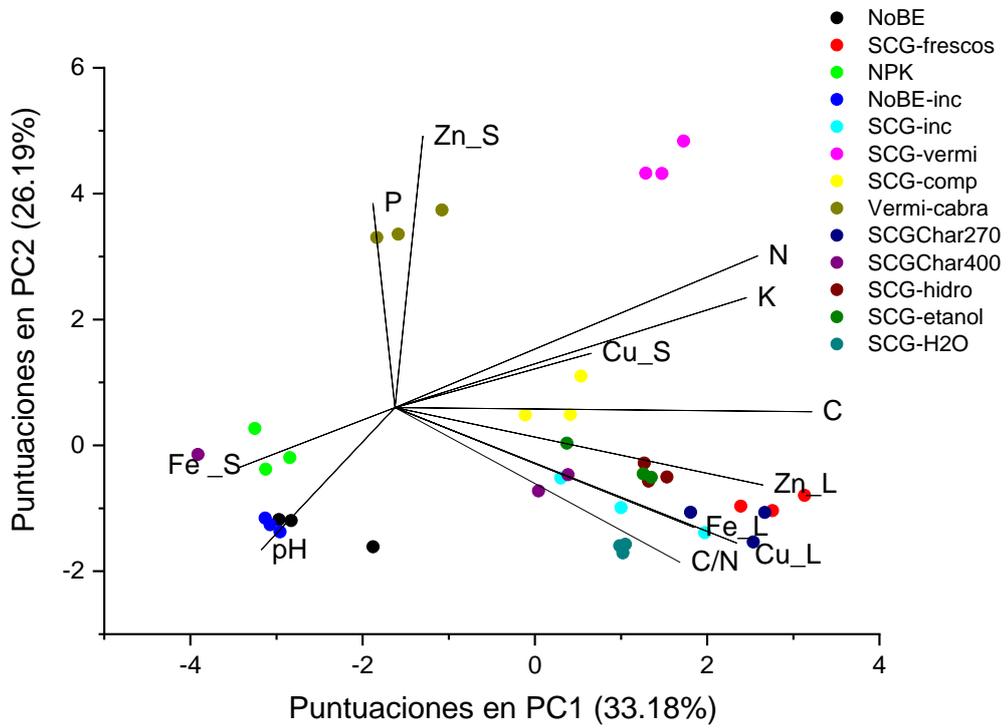
mejora el crecimiento del maíz, pero reduciendo las concentraciones de Cu y Zn en las raíces (Wu et al., 2017). Por el contrario, Pokhrel et al. (2015) reportaron que los fertilizantes orgánicos disminuyeron las concentraciones en planta de todos los micronutrientes cuando se compararon con los fertilizantes inorgánicos. Como ya hemos comentado en otras secciones de la tesis, el uso de SCG frescos como fertilizante orgánico es una alternativa más nutricional, sostenible y respetuosa con el medio ambiente que la agricultura convencional con fertilizantes inorgánicos como la adición de NPK. En este sentido, Kelly y Bateman (2010) compararon las concentraciones de Zn, Cu y Fe en los cultivos comerciales de lechuga orgánica y convencional, no encontrando diferencias entre ambas prácticas. De manera similar, Sofo et al. (2016) también observaron que las concentraciones de Zn y Fe no cambiaron en lechugas con fertilización orgánica, mientras que encontraron mayores niveles de Cu en estas lechugas. No obstante, el comportamiento de las enmiendas orgánicas no es el mismo en todos los casos. Así, en este estudio, el tipo de enmienda orgánica, vermicompost, biochar, hidrolizado, etc., influyó de manera diferente sobre los niveles de Zn, Cu y Fe en lechugas (**Tabla 31**).

En cuanto a las cantidades biodisponibles de Zn, Cu y Zn en el suelo de la Vega tras el cultivo, comparada con la adición de NPK, se encontró un comportamiento irregular entre los tratamientos (**Tabla 31**). La adición de SCG-frescos, vermi-cabra, Inc-SCG, SCG-vermi, comp-SCG, SCG-etanol, SCG-hidro y SCG-H<sub>2</sub>O incrementó las cantidades de Zn biodisponible en comparación con la adición de NPK. De manera contraria, el tratamiento con NPK incrementó las cantidades de Cu biodisponibles en comparación con todos los tratamientos excepto para el SCG-hidro (**Tabla 31**). La adición de NPK también incrementó las cantidades de Fe en comparación con SCG-H<sub>2</sub>O e SCG-hidro, sin embargo, se vieron disminuidas en comparación con SCGchar<sub>270</sub> y SCGchar<sub>400</sub>.

#### 4.7.6. Análisis de correlaciones y de componentes principales (PCA)

El PCA (**Figura 67**) y los coeficientes de correlación (**Tabla 32**) fueron calculados para una matriz que contiene los elementos minerales en planta (Zn, Cu y Fe) y los parámetros de suelo (Zn, Cu, Fe biodisponible, pH, CE<sub>25</sub>, C, N total, relación C/N y K y P disponibles). Las puntuaciones (scores) de cada muestra fueron representadas superpuestas sobre las cargas (loadings) de cada parámetro (**Figura 67**). PC1 vs. PC2 fueron representados en un gráfico de dispersión y ambos explican conjuntamente el 59.37% de la varianza. Los contenidos de Zn, Fe y Cu en lechugas y la relación C/N aparecen juntos, con puntuaciones altas en PC1, cerca de las muestras SCG-frescos, SCG-etanol, SCG-H<sub>2</sub>O, Inc-SCG, SCGchar<sub>270</sub>; esto establece una fuerte correlación entre los tres microelementos en las lechugas [Cu y Zn ( $r = 0.777$ ), Fe y Zn ( $r = 0.683$ ) y Fe y Cu ( $r = 0.699$ )] y también con la relación C/N en el suelo [Cu y C/N ( $r = 0.680$ ), Zn y C/N ( $r = 0.565$ ) y Fe y C/N ( $r = 0.585$ )]. Estos resultados apoyan la idea de que los tratamientos que incrementan en mayor medida el valor nutricional de las lechugas con aquellos con una mayor C/N (**Tabla 29**) y consecuentemente, incrementaron la relación C/N en el suelo (**Tabla 30**). Valores más bajos de C/N corresponden a materiales orgánicos más estabilizados, en los que un mayor número de radicales libres ha desaparecido, como es el caso de los polifenoles. Por tanto, mayores relaciones C/N pueden estar asociadas con una mayor capacidad de retención (Brunetti et al., 2019). Las muestras vermi-cabra aparecen cerca del P disponible, del Zn biodisponible y de la CE<sub>25</sub>, ya que estas propiedades fueron más altas en este tipo de muestras (**Tabla 31**); así, se encontraron correlaciones altamente significativas entre estas variables: P y Zn ( $r = 0.498$ ), P y CE<sub>25</sub> ( $r = 0.661$ ), Zn y CE<sub>25</sub> ( $r = 0.768$ ). En el otro lado de la gráfica, el pH aparece cerca de las muestras NoBE y NoBE-inc ya que estas muestras tienen pH más básicos. Cerca de estas muestras, el Fe

aparece junto a las muestras NPK debido a que la adición de este fertilizante parece movilizar el Fe.



**Figura 67.** Gráfico superpuesto de las puntuaciones obtenidas del PCA para las muestras (PC2 vs PC1) y cargas de los parámetros del suelo y elementos minerales de las lechugas. Zn\_L, Zn en lechuga; Cu\_L, Cu en lechuga; Fe\_L, Fe en lechuga; Zn\_S, Zn en suelo; Cu\_S, Cu en suelo; Fe\_S, Fe en suelo.

**Tabla 32.** Coeficientes de correlación lineal estadísticamente significativas.

	Zn_L	Cu_L	Fe_L	Zn_S	Cu_S	Fe_S	pH	EC	C	N	C/N	P	K
Zn_L													
Cu_L	0.777**												
Fe_L	0.683**	0.699**											
Zn_S	0.370*												
Cu_S		0.322*											
Fe_S													
pH				-0.508**									
EC				0.768**			-0.672**						
C	0.622**	0.542**	0.506**			-0.517**							
N	0.479**			0.420**		-0.636**	-0.375*	0.358*	0.821**				
C/N	0.565**	0.680**	0.585**					-0.469**	0.694**				
P				0.498**			-0.365*	0.661**					
K	0.511**	0.431**	0.486**			-0.433**	-0.482**		0.693**	0.734**			

Significación estadística: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Zn\_L, Zn en lechuga; Cu\_L, Cu en lechuga; Fe\_L, Fe en lechuga; Zn\_S, Zn en suelo; Cu\_S, Cu en suelo, Fe\_S, Fe en suelo.

#### 4.7.7. Consideraciones finales

En resumen, la adición de SCG frescos y sus bio-productos derivados como enmiendas orgánicas de suelos en un ensayo *in vitro* tuvo efectos diferentes en el sistema suelo-planta, lo que puede ser principalmente atribuido a las diferentes cantidades de polifenoles en cada tipo de bio-enmienda. Estos compuestos desaparecen completamente cuando los SCG fueron vermicompostados o pirolizados a 400°C. De hecho, aquellas bio-enmiendas con altos o medios contenidos de polifenoles (SCG-frescos, SCGchar<sub>270</sub>, SCG-etanol, SCG-H<sub>2</sub>O e SCG-hidro) limitaron el crecimiento de las plantas, pero mejoraron los niveles de Zn, Cu y Fe comparado con las bio-enmiendas con cero o contenidos muy bajos de polifenoles (SCG-vermi, comp-SCG y SCGchar<sub>400</sub>). La fertilización convencional con NPK produce lechugas con una mayor biomasa, pero con bajos contenidos en Zn, Cu y Fe comparado con el resto de bio-enmiendas. Por tanto, una mayor productividad y alimentos más nutritivos parecen ser incompatibles al mismo tiempo. Este hecho establece que la investigación futura en este campo deba estar centrada en el desarrollo de mezclas adecuadas de SCG-frescos o bio-enmiendas derivadas con NPK (fertilizante inorgánico) para mejorar tanto la productividad de la lechuga como el contenido de elementos para finalmente mejorar el valor nutricional de las lechugas.

## **4.8. ENSAYO 8. BIOENMIENDAS DERIVADAS DE LOS POSOS DE CAFÉ Y SU INFLUENCIA EN LA DINÁMICA DEL C Y N**

### **4.8.1. Antecedentes**

Más de 120 millones de Mg de bio-residuos se generan anualmente en Europa, los cuales se vierten en vertederos y solo una pequeña parte se incinera (Chojnacka et al., 2020). Una alternativa a este problema ambiental es la llamada *economía circular*, que es un proceso que mantiene los recursos dentro de la economía el mayor tiempo posible y elimina los desechos; estos recursos se pueden utilizar una y otra vez y crear productos de alto valor añadido (COM / 2014/398 / EC).

En línea con este novedoso concepto, se han utilizado ampliamente diferentes métodos de valorización de la biomasa. El más popular es el compostaje (dentro del cual destaca el vermicompostaje), pero en los últimos años se han utilizado otro tipo de técnicas para la transformación de materias primas, como la digestión anaeróbica, incineración, gasificación, pirolisis o carbonización hidrotermal (Chojnacka et al., 2020; Wang et al., 2018). La conversión termoquímica es la forma más frecuente de transformación de los residuos agrícolas (como los SCG) debido a su naturaleza lignocelulósica (Cao et al., 2017). Los subproductos resultantes de la pirolisis y el proceso de HTC se conocen como biochar e hidrochar (Kambo y Dutta, 2015). Estos subproductos se han caracterizado por diferentes procedimientos: análisis elemental (C, N, H, O) y proximal (carbono fijado, materia volátil, cenizas), relaciones H/C y O/C, morfología superficial, área superficial, análisis termogravimétrico, etc. (Afolabi et al., 2020; Kim et al., 2017; Yu et al., 2019).

A pesar de que el uso de subproductos, como son el biochar, el hidrochar o el vermicompost, como enmienda orgánica de suelos no es un concepto nuevo, existe mucho interés en valorar este tipo de residuos desde el punto de

vista agronómico-ambiental. Por ejemplo, el efecto del biochar y del hidrochar sobre las emisiones de gases de efecto invernadero se ha reflejado en los trabajos de Shalini et al. (2020), Schimmelpfenning et al. (2014) o Kamman et al. (2012). También se ha estudiado el impacto de este tipo de productos en la dinámica del C y N (Bera et al., 2021; Gálvez et al., 2012; Nguyen et al., 2017; Song et al., 2020).

La transformación de los SCG como residuo dentro de un esquema de economía circular genera productos de alto valor añadido y otros residuos de segunda generación con un alto contenido de C que deben ser valorados desde el punto de vista agrícola.

#### **4.8.2. Propiedades de los SCG y de las bio-enmiendas derivadas de los SCG**

Las propiedades fisicoquímicas de los SCG y de las bio-enmiendas derivadas de los SCG se muestran en la **Tabla 33**. La nomenclatura usada durante este capítulo de resultados y discusión será la siguiente: SCG, biochar de SCG a 270°C (B270), biochar de SCG a 400°C (B400), hidrochar de SCG a 160°C (H160), hidrochar de SCG a 200°C (H200), vermicompost de SCG (VC), SCG desengrasado (SCG<sub>d</sub>), biochar de SCG desengrasado a 270°C (B270<sub>d</sub>) y biochar de SCG desengrasado a 400°C (B400<sub>d</sub>). El único tratamiento que no incrementó el C con respecto a los SCG es el vermicompostaje. Dentro de los tratamientos, los que más incrementaron el C fueron las pirolisis y en menor medida la HTC. El desengrasado parece incrementar la eficiencia de la pirolisis en la concentración de C. Los mayores contenidos de N corresponden al VC seguido de ambos biochars a 400°C. Como consecuencia, los valores de C/N se encuentran en un rango entre 7 para el VC y 25 para el H200. Los biochars son los residuos con mayor contenido en C fijado y menor en materia volátil y los hidrochars y ambos

**Tabla 33.** Propiedades composicionales y químicas de los SCG y de las bioenmiendas derivadas de los SCG.

Residuo	Análisis elemental (%)					Análisis proximal (%)				LOI (%)	pH	CE <sub>25</sub> (dS m <sup>-1</sup> )	CaCO <sub>3</sub> (%)	WSC (µg g <sup>-1</sup> )	WSN (µg g <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> -N (µg g <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> -N (µg g <sup>-1</sup> )
	C	N	H	O	C/N	Humedad	Cenizas	Materia volátil	C fijado								
SCG	48.0	2.290	7.58	42.1	21	7.53	1.45	84.55	13.97	98.58	5.4	9.00	0.15	25.92	3.74	11.6	2.59
B270	58.1	3.157	6.67	32.1	18	4.06	2.09	68.70	29.20	97.91	6.4	3.15	0.18	6.56	0.72	7.64	nd
B400	69.8	4.253	5.78	20.2	16	2.53	3.72	38.83	57.21	96.53	8.4	1.78	0.34	0.63	0.5	3.12	nd
H160	52.0	2.210	8.08	37.7	24	3.58	0.41	86.10	13.45	99.64	4.6	4.41	0.08	31.36	3.8	160.53	6.37
H200	62.6	2.470	7.62	27.3	25	3.46	0.54	73.42	26.02	99.49	3.9	4.25	0.05	37.65	4.72	47.41	1.30
VC	40.6	5.77	5.60	48.0	7	10.38	19.11	63.38	18.31	80.09	7.8	48.28	2.34	10.85	2.96	58.39	21.61
SCG <sub>d</sub>	48.8	2.60	7.73	40.9	19	8.01	1.60	83.55	14.85	98.42	5.4	11.2	0.19	26.46	3.99	20.19	1.07
B270 <sub>d</sub>	63.0	4.09	6.15	26.8	15	4.85	3.07	60.72	36.59	96.55	5.9	5.60	0.32	4.67	0.58	13.37	nd
B400 <sub>d</sub>	72.2	4.46	5.99	17.4	16	4.06	2.85	46.30	50.32	97.68	8.6	2.20	0.23	0.94	0.22	3.03	nd

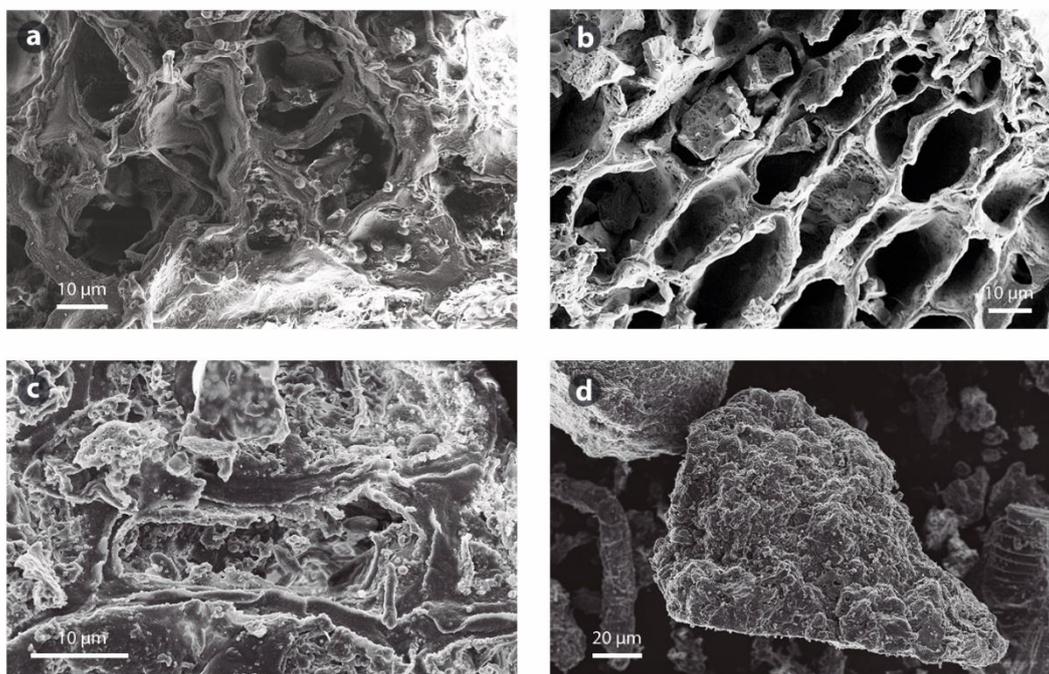
LOI: pérdida por ignición; CE<sub>25</sub>: conductividad eléctrica medida a 25°C; WSC: carbono soluble en agua; WSN: nitrógeno soluble en agua; nd, no detectado; SCG, posos de café; B270, biochar producido a 270°C; B400, biochar producido a 400°C; H160, hidrochar producido a 160°C; H200, hidrochar producido a 200°C; VC, vermicompost; SCG<sub>d</sub>, posos de café desengrasados; B270<sub>d</sub>, biochar producido a 270°C a partir de SCG<sub>d</sub>; B400<sub>d</sub>, biochar producido a 400°C a partir de SCG<sub>d</sub>.

SCG (desengrasados y no desengrasados) presentan el comportamiento contrario. El C fijado es mayor en ambos biochars a 400°C y menor en los SCG y H160. El contenido en cenizas varía entre 0.41 y 3.72%, excepto para el VC, el cual tiene una cantidad de cenizas del 10%. Debido a su alto contenido en cenizas, el LOI del VC es bastante bajo comparado con el resto de las enmiendas, que se encuentran en un rango entre 96-99 %.

En cuanto al pH y la conductividad eléctrica (ambas propiedades importantes en la dinámica de los nutrientes del suelo), los hidrochars y los SCG tuvieron un comportamiento ácido mientras que el B400 y el VC fueron residuos básicos. Además, el VC tuvo un valor extremo de salinidad (48 dS / m) y el valor más alto de carbonatos (2.34%), lo que corrobora su mayor concentración en materiales inorgánicos. En cuanto a las formas solubles de C y N, los SCG y los hidrochars tuvieron los valores más altos, por el contrario, la cantidad de estas formas en los biochars fue mínima (**Tabla 33**). Los residuos también diferían en su composición en las distintas formas de nitrógeno. El NH<sub>4</sub>-N varió entre 3 µg/g (ambos biochars a 400°C) y 160 µg/g (H160). No se detectó NO<sub>3</sub>-N en los biochars y el VC presentó un alto contenido de este nutriente.

Los diferentes tratamientos aplicados a los SCG (pirolisis, HTC, vermicompostaje y desgrasado), también modificaron la estructura física de los SCG, lo que se observa en las imágenes SEM (**Figura 68**). La **Figura 68a** muestra una estructura porosa típica de los SCG con los poros (aproximadamente 30 µm) rodeados de la pared de celulosa. Debido al proceso de pirolisis, la estructura de la partícula B400 (**Figura 68b**) muestra una forma de panal, con paredes más delgadas y con poros que parecen ser más tubulares. Sin embargo, el proceso HTC generó una modificación de la estructura, llenando los poros de diversos materiales carbonosos (**Figura 68c**). La partícula correspondiente al vermicompost no mantiene ninguna característica

estructural del grano de café. Corresponde a una estructura aglomerada típica de la digestión de las lombrices (**Figura 68d**).

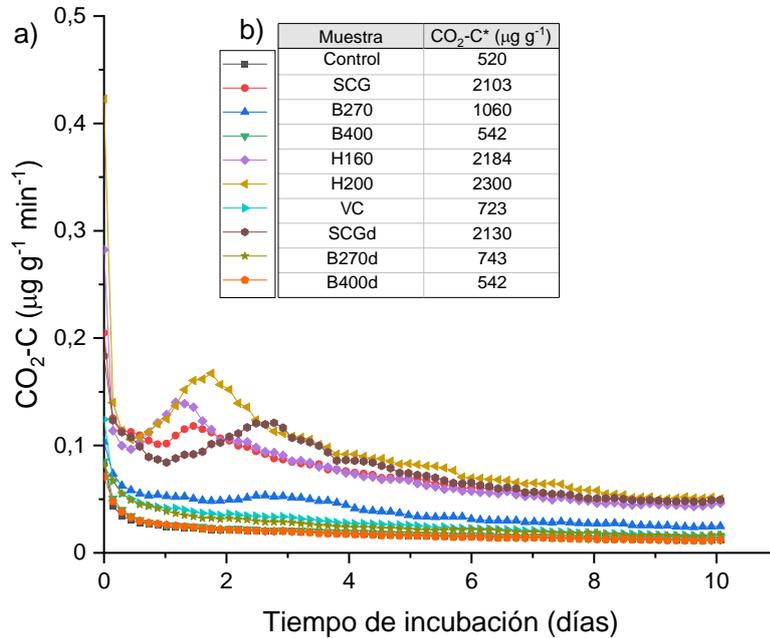


**Figura 68.** Imágenes SEM. a) SCG); b) Biochar a 400°C (B400); c) Hydrochar a 200°C (H200); d) Vermicompost (VC)

#### 4.8.3. Emisiones de CO<sub>2</sub> y C remanente

La dinámica y la cantidad total de CO<sub>2</sub> emitida durante el período de incubación se muestran en la **Figura 69**. La adición de H160 y H200 provocó un aumento rápido y significativo alcanzando un pico máximo de emisión a los 2 días seguido de una tendencia decreciente (**Figura 69a**). Este hecho fue corroborado por los valores más altos de CO<sub>2</sub>-C total emitidos por ambos hidrochars (**Figura 69b**). La adición de ambos SCG también generó un aumento, pero con picos en diferentes momentos de incubación: SCG en los 2 primeros días y SCG<sub>d</sub> posterior a los 2 días, ambos generando un CO<sub>2</sub>-C total emitido muy similar. La adición de B400 y B400<sub>d</sub> no modificó la generación de CO<sub>2</sub> con respecto a la muestra de control. La adición del resto de subproductos

(B270, B270<sub>d</sub> y VC) dan como resultado emisiones de CO<sub>2</sub> con valores intermedios.



**Figura 69.** Emisiones de CO<sub>2</sub> de los suelos incubados. a) durante los primeros 10 días, b) \*CO<sub>2</sub> acumulado a los 30 días. SCG, posos de café; B270, biochar producido a 270°C; B400, biochar producido a 400°C; H160, hidrochar producido a 160°C; H200, hidrochar producido a 200°C; VC, vermicompost; SCG<sub>d</sub>, posos de café desengrasados; B270<sub>d</sub>, biochar producido a 270°C a partir de SCG<sub>d</sub>; B400<sub>d</sub>, biochar producido a 400°C a partir de SCG<sub>d</sub>.

La cantidad de C agregado al suelo (**Tabla 34**) fue menor para VC y mayor para el biochar y varió entre 9.95 y 18.03 (µg/g) para VC y B400<sub>d</sub>, respectivamente. El C<sub>R</sub> en el suelo estimado ajustando la descomposición del C agregado a un modelo de dos compartimentos se muestra en la **Tabla 34** (como g de C agregado kg<sup>-1</sup> de suelo) y la **Figura 70** (como % de C agregado). SCG, SCG<sub>d</sub>, H160 y H200 generaron la tasa más alta de mineralización con una alta “active pool” ( $f = 4.18, 5.79, 2.98$  y  $5.72\%$ , respectivamente) y el máximo k<sub>2</sub> (**Tabla 34**). Por el contrario, el porcentaje de C<sub>R</sub> en el suelo cuando se agregaron B400 y B400<sub>d</sub> es cercano al 100% (**Figura 70**), lo que es corroborado por la

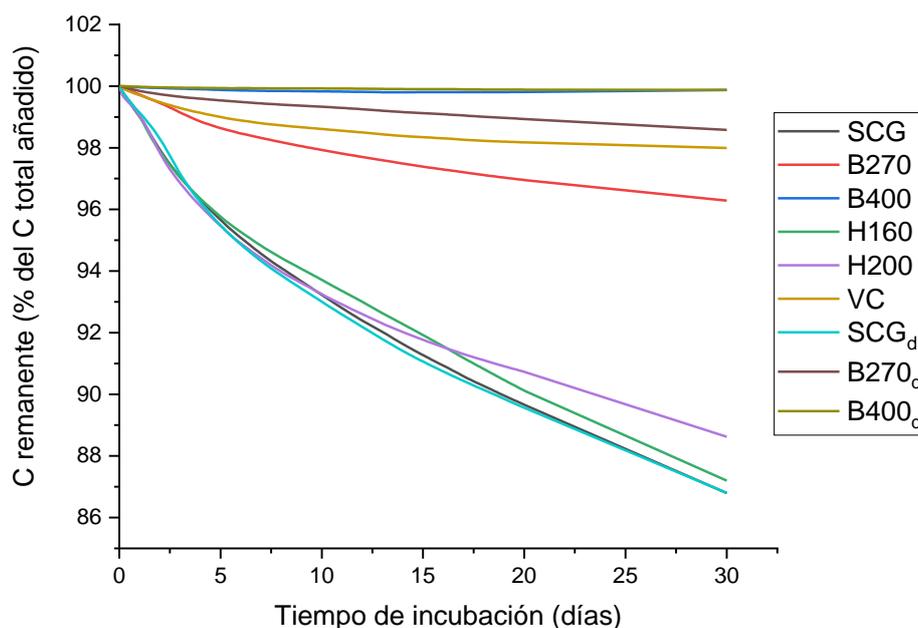
fracción más baja de C de la “active pool” ( $f = 0.2$ ) y la menor tasa de descomposición “slow pool” ( $k_2$  cerca de 0) (**Tabla 34**). VC y B270 tuvieron un comportamiento similar a los biochars a 400 ° C, pero menos acentuado.

El coeficiente de humificación ( $h$  en porcentaje, **Tabla 34**) indica el potencial de secuestro de C de los subproductos de SCG en 1 año. Según este parámetro, los residuos se pueden clasificar de la siguiente manera: B400<sub>d</sub>> VC> B270<sub>d</sub>> B270> H200> SCG<sub>d</sub>> H200> SCG> H160 (**Tabla 34**).

**Tabla 34.** Ecuación obtenida al ajustar el patrón de descomposición del C en el suelo a un modelo de dos compartimentos. Valores característicos de C.

Muestra	C añadido (g C kg <sup>-1</sup> soil)	Ecuación	C <sub>30d</sub> (g C kg <sup>-1</sup> soil)	$h$ (%) 20°C
SCG	11.99	$C_R(t) = 4.18 \times e^{-0.2081t} + (100 - 4.18) \times e^{-0.0034t}$	10.41	28.11
B270	14.54	$C_R(t) = 1.81 \times e^{-0.1565t} + (100 - 1.81) \times e^{-0.0007t}$	14.00	77.01
B400	17.46	$C_R(t) = 0.20 \times e^{-0.1809t} + (100 - 0.20) \times e^{-0.0000t}$	17.44	99.80
H160	13.00	$C_R(t) = 2.98 \times e^{-0.3311t} + (100 - 2.98) \times e^{-0.0036t}$	11.34	25.70
H200	15.64	$C_R(t) = 5.72 \times e^{-0.1939t} + (100 - 5.72) \times e^{-0.0020t}$	13.86	45.11
VC	10.15	$C_R(t) = 1.25 \times e^{-0.2267t} + (100 - 1.25) \times e^{-0.0003t}$	9.95	88.59
SCG <sub>d</sub>	12.20	$C_R(t) = 5.79 \times e^{-0.1542t} + (100 - 5.79) \times e^{-0.0027t}$	10.59	35.42
B270 <sub>d</sub>	15.75	$C_R(t) = 0.29 \times e^{-0.4984t} + (100 - 5.79) \times e^{-0.0004t}$	15.53	86.50
B400 <sub>d</sub>	18.05	$C_R(t) = 0.09 \times e^{-0.1683t} + (100 - 5.79) \times e^{-0.0000t}$	18.03	99.55

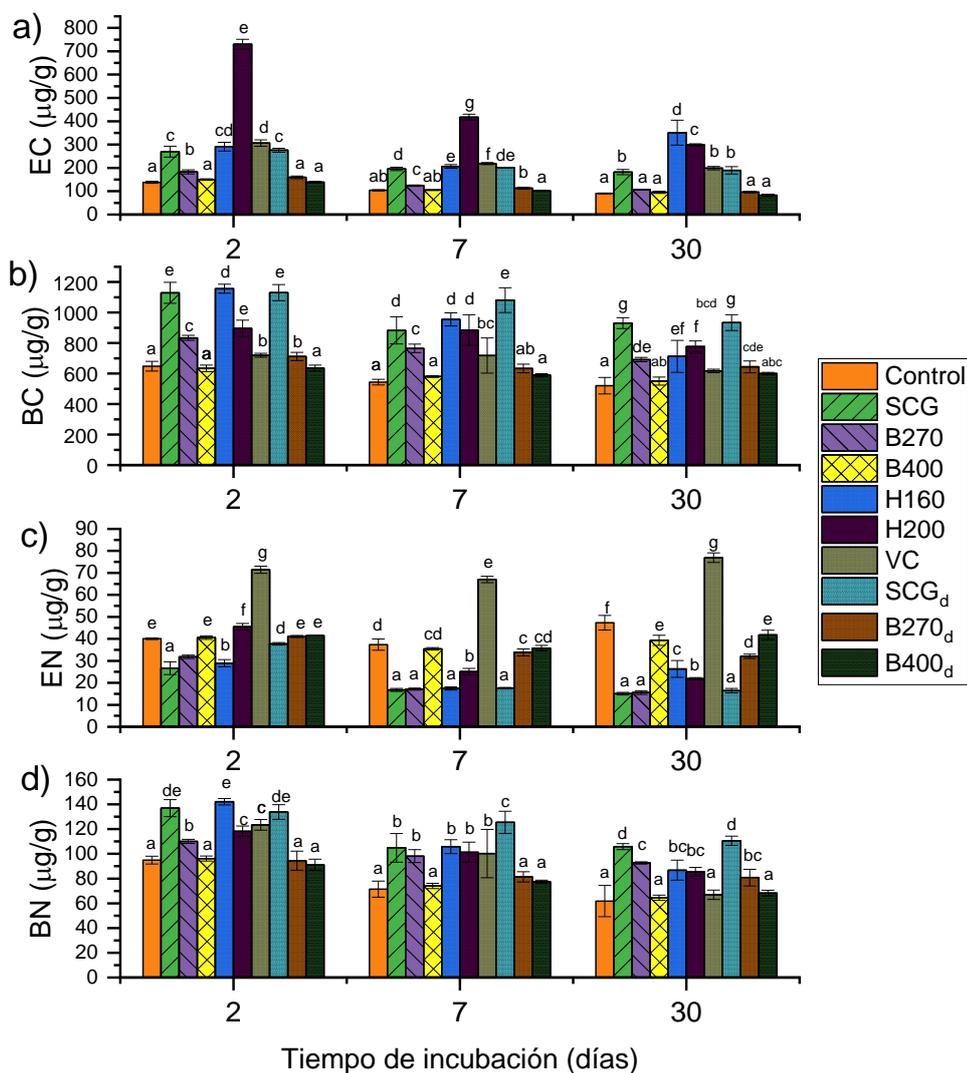
$C_R = f \times e^{-(k_1t)} + (100-f) \times e^{-(k_2t)}$ ; donde,  $f$ : fracción de C de la “active pool”;  $k_1$ : constante de la tasa de descomposición para la “active pool”;  $k_2$ : constante de la tasa de descomposición para la “slow pool”.  $C_{30d}$ : fracción del C añadido remanente en el suelo después de 30 days de incubación;  $h$ , coeficiente de humificación: fracción de materia orgánica exógena que permanece en el suelo después de 1 año en base a una temperatura media anual de 20 ° C. SCG, posos de café; B270, biochar producido a 270°C; B400, biochar producido a 400°C; H160, hidrochar producido a 160°C; H200, hidrochar producido a 200°C; VC, vermicompost; SCG<sub>d</sub>, posos de café desengrasados; B270<sub>d</sub>, biochar producido a 270°C a partir de SCG<sub>d</sub>; B400<sub>d</sub>, biochar producido a 400°C a partir de SCG<sub>d</sub>.



**Figura 70.** Fracción restante de C orgánico residual en el suelo a lo largo del tiempo con respecto al C total agregado. SCG, posos de café; B270, biochar producido a 270°C; B400, biochar producido a 400°C; H160, hidrochar producido a 160°C; H200, hidrochar producido a 200°C; VC, vermicompost; SCG<sub>d</sub>, posos de café desengrasados; B270<sub>d</sub>, biochar producido a 270°C a partir de SCG<sub>d</sub>; B400<sub>d</sub>, biochar producido a 400°C a partir de SCG<sub>d</sub>.

#### 4.8.4. Formas de C y N

A los 2, 7 y 30 días, la adición de subproductos de SCG aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido de EC excepto para las muestras B400, B270<sub>d</sub> y B400<sub>d</sub> (**Figura 71a**). Los valores más altos de EC se observaron en la muestra adicionada con H200 alcanzando el valor de 730  $\mu\text{g/g}$  ya que este residuo proporciona la mayor cantidad de WSC (**Tabla 33**). El EC disminuyó significativamente durante el tiempo de incubación, a excepción de la muestra H160, que disminuyó entre 2 y 7 días y aumentó hasta el día 30. A pesar de esta reducción, la adición de algunos subproductos (SCG, H160, H200, VC y SCG<sub>d</sub>) mantuvo valores de EC más altos que el control al final de la incubación.



**Figura 71.** Formas de C and N a 2, 7 y 30 días de incubación. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). EC, carbono extraíble; EN, nitrógeno extraíble; BC, carbono de la biomasa microbiana; BN, nitrógeno de la biomasa microbiana; SCG, posos de café; B270, biochar producido a 270°C; B400, biochar producido a 400°C; H160, hidrochar producido a 160°C; H200, hidrochar producido a 200°C; VC, vermicompost; SCG<sub>d</sub>, posos de café desengrasados; B270<sub>d</sub>, biochar producido a 270°C a partir de SCG<sub>d</sub>; B400<sub>d</sub>, biochar producido a 400°C a partir de SCG<sub>d</sub>.

En los tres tiempos ensayados, el tratamiento que incrementó en mayor medida el EN con respecto a la muestra control, fue la adición de VC

alcanzando el valor más alto a los 30 días de incubación (77  $\mu\text{g/g}$ , **Figura 71c**). Por el contrario, la adición de SCG, B270, H160, SCG<sub>d</sub> disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido de EN. El resto de subproductos (B400, B270<sub>d</sub> y B400<sub>d</sub>) no modificaron significativamente el valor de la muestra control. Durante el tiempo de incubación, el EN disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en el caso de SCG, B270, H200, SCG<sub>d</sub> y B270<sub>d</sub>, y el resto de subproductos tuvo un comportamiento irregular.

La adición de subproductos de SCG, a excepción de ambos biochars a 400 °C, incrementó el contenido C y N de la biomasa microbiana (BC y BN, respectivamente) (**Figura 71b y d**). Los incrementos más importantes en BC y BN fueron causados por la adición de SCG, H160 y SCG<sub>d</sub> a los 2 y 7 días. Durante el tiempo de incubación, la BC y la BN disminuyeron en la mayoría de las muestras de suelo.

La adición de subproductos de SCG modificó significativamente ( $p < 0.05$ ) los contenidos de nitratos y amonio y consecuentemente el valor de N mineral neto (**Tabla 35**). La adición de B270, H160, H200 y SCG<sub>d</sub> disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) los contenidos de NO<sub>3</sub>-N del suelo en comparación con la muestra de control en el segundo día de incubación. El único tratamiento que incrementó significativamente el contenido de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> fue el VC. En cuanto al tiempo de incubación, existe un comportamiento irregular entre los tratamientos. Por ejemplo, las muestras control, B400, VC y B400<sub>d</sub> tienden a incrementar los nitratos hasta los 30 días de incubación, mientras que la adición de SCG, H160, H200, SCG<sub>d</sub> disminuyó el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> entre 2 y 7 días y aumentó hasta los 30 días. Los valores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> son muy bajos en todos los casos, lo que dificulta el comentario.

El único tratamiento que incrementó significativamente el contenido de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> del suelo fue la adición de VC a los 2 días. El N mineral neto tiene un balance negativo en todos los casos, excepto en la muestra VC. Los balances más negativos tienen lugar en las muestras SCG, B270, H160, H200 y SCG<sub>d</sub>.

Los balances más cercanos a 0 corresponden a los biochars de 400 °C a los 2 y 7 días. Los balances negativos aumentan relativamente después de 30 días.

La adición al suelo de todos los subproductos de SCG no permitió que las emisiones de N<sub>2</sub>O aumentaran durante todo el período de incubación.

**Tabla 35.** NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and N mineral neto después de 2, 7 y 30 días de incubación.

Muestra	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> )			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> g <sup>-1</sup> )			N neto mineral (μg N g <sup>-1</sup> )		
	2 días	7 días	30 días	2 días	7 días	30 días	2 días	7 días	30 días
Control	28.59 <sup>e</sup>	27.26 <sup>e</sup>	37.64 <sup>e</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	1.02 <sup>a</sup>	-	-	-
SCG	2.42 <sup>b</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.74 <sup>a</sup>	0.40 <sup>a</sup>	0.66 <sup>bc</sup>	1.27 <sup>a</sup>	-26.06 <sup>a</sup>	-26.45 <sup>a</sup>	-36.65 <sup>a</sup>
B270	17.03 <sup>d</sup>	5.17 <sup>b</sup>	6.44 <sup>b</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	1.43 <sup>a</sup>	-11.74 <sup>a</sup>	-22.01 <sup>a</sup>	-30.79 <sup>a</sup>
B400	26.94 <sup>c</sup>	24.59 <sup>d</sup>	31.16 <sup>d</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.56 <sup>bc</sup>	1.47 <sup>a</sup>	-1.67 <sup>a</sup>	-2.11 <sup>a</sup>	-6.03 <sup>a</sup>
H160	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.89 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	2.73 <sup>b</sup>	-28.20 <sup>c</sup>	-27.26 <sup>b</sup>	-35.04 <sup>b</sup>
H200	0.00 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.79 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.47 <sup>bc</sup>	1.56 <sup>a</sup>	-28.29 <sup>d</sup>	-26.71 <sup>d</sup>	-36.31 <sup>d</sup>
VC	33.57 <sup>f</sup>	38.48 <sup>f</sup>	46.24 <sup>f</sup>	2.58 <sup>b</sup>	0.26 <sup>ab</sup>	1.50 <sup>a</sup>	7.27 <sup>c</sup>	11.48 <sup>f</sup>	9.08 <sup>f</sup>
SCG <sub>d</sub>	9.29 <sup>c</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	0.52 <sup>a</sup>	0.87 <sup>c</sup>	1.59 <sup>a</sup>	-19.07 <sup>b</sup>	-26.32 <sup>a</sup>	-36.34 <sup>a</sup>
B270 <sub>d</sub>	26.63 <sup>c</sup>	22.84 <sup>c</sup>	20.26 <sup>c</sup>	0.31 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	1.40 <sup>a</sup>	-1.94 <sup>d</sup>	-4.41 <sup>c</sup>	-17.00 <sup>c</sup>
B400 <sub>d</sub>	28.15 <sup>c</sup>	25.06 <sup>d</sup>	28.91 <sup>d</sup>	0.42 <sup>a</sup>	0.51 <sup>bc</sup>	1.42 <sup>a</sup>	-0.31 <sup>d</sup>	-1.68 <sup>d</sup>	-8.33 <sup>d</sup>

Diferencias estadísticamente significativas son indicadas mediante diferentes letras en la misma columna ( $p < 0.05$ ). SCG, posos de café; B270, biochar producido a 270°C; B400, biochar producido a 400°C; H160, hidrochar producido a 160°C; H200, hidrochar producido a 200°C; VC, vermicompost; SCG<sub>d</sub>, posos de café desengrasados; B270<sub>d</sub>, biochar producido a 270°C a partir de SCG<sub>d</sub>; B400<sub>d</sub>, biochar producido a 400°C a partir de SCG<sub>d</sub>.

#### 4.8.5. Caracterización de las bio-enmiendas derivadas de los SCG

Los diferentes tratamientos aplicados a los SCG (“slow pirolisis”, carbonización hidrotermal, vermicompostaje y desengrasado) modificaron de manera diferente las características fisicoquímicas iniciales de esta materia prima. En cada uno de los tratamientos mencionados, estas propiedades también se vieron influenciadas por las condiciones del proceso, como la temperatura o el tiempo de residencia.

Los resultados obtenidos para los biochars (**Tabla 33**) indicaron que a mayor temperatura de pirolisis, mayores fracciones carbonizadas y cenizas y menos materia volátil, lo que coincide con los resultados de Chatterjee et al.

(2020), Tomaczyk et al. (2020) y Kambo et al. (2015). El aumento en el contenido de C y N debido a la pirolisis también fue reportado por Stylianour et al. (2020) y Tangmankonworakoon (2019) para el biochar de SCG, y está relacionado con la formación de hidrocarburos aromáticos estables y la ruptura termoquímica de C-H y C-C (Das et al., 2021). La disminución en el contenido de oxígeno e hidrógeno (**Tabla 33**) se ha atribuido a la pérdida de dióxido de carbono, agua de monóxido de carbono e hidrocarburos (Gai et al., 2014). El contenido de WSC es mínimo en B400, lo que se explica que, a esta temperatura, aproximadamente el 80% de C lábil de la biomasa se transfiere a una fracción recalcitrante (Das et al., 2021). En el caso de B270, la cantidad de WSC es mayor debido a la menor temperatura aplicada.

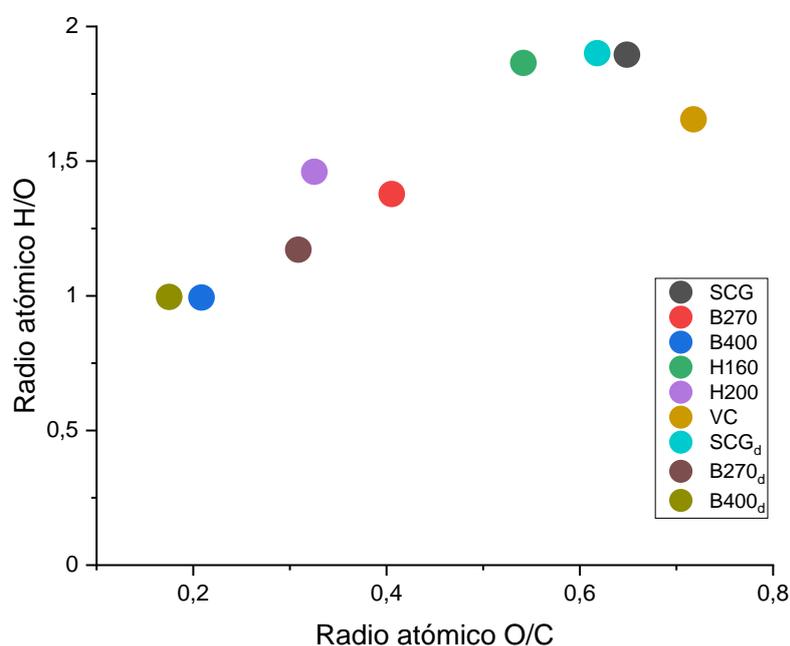
La carbonización hidrotermal (HTC) de los SCG aumentó el contenido de carbono y carbono fijado (**Tabla 33**) que se atribuye a reacciones de deshidratación y descarboxilación que tienen lugar durante el proceso (Afolabi et al., 2020; Kim et al., 2017), ya que el 60-84% del carbono puede retenerse en el hidrocarburo (Libra et al., 2011). Las elevadas cantidades de WSC detectadas en los hidrochars (**Tabla 33**) no concuerdan con los procesos termoquímicos que señalan otros autores. Así, según Wang et al. (2018), durante el proceso HTC se produce la hidrólisis de las moléculas dando lugar a fragmentos más cortos y posteriormente se producen reacciones de deshidratación, condensación y polimerización. Sin embargo, estas reacciones dependen del tiempo de residencia y de la temperatura aplicada (Wang et al., 2018). El proceso HTC aplicado en este ensayo (160 y 200 ° C durante 1 hora), parece no ser suficiente para dar lugar a las reacciones de condensación y polimerización. En la misma línea, Song et al. (2020) indicaron que el proceso HTC es más débil que la pirolisis y una gran parte del carbono orgánico disuelto no está completamente polimerizado, lo que conduce a una mayor concentración de WSC en estos residuos.

El vermicompostaje de los SCG redujo el contenido de carbono total e incrementó el nitrógeno, lo que conduce a una reducción en la relación C/N (**Tabla 33**) lo que está en completo acuerdo con Liu y Price (2011). La conservación de N en el vermicompost derivado de los SCG se atribuye en parte al mayor contenido de aceite en los SCG (Liu y Price, 2011) o la naturaleza rica en N de los SCG (Adi y Noor, 2009). Sin embargo, hay una pérdida de WSN cuando los SCG son vermicompostados, lo que coincide con los resultados de Alidali et al. (2016) para otros tipos de residuos.

Por otro lado, el proceso de desengrasado no parece tener efectos sustanciales sobre las propiedades fisicoquímicas de los SCG (**Tabla 33**). Por el contrario, otros autores (Vardon et al., 2013), encontraron diferencias entre los SCG desengrasados y los SCG no desengrasados en propiedades relacionadas con el uso de energía. En cuanto a los biochars derivados de los SCG desengrasados, se observan algunas diferencias con los derivados del SCG no desengrasados. La más llamativa de estas diferencias son los contenidos de C y N, algo más altos en el B270<sub>d</sub> y B400<sub>d</sub> (**Tabla 33**). Este hecho coincide con lo indicado por Vardon et al. (2013), el cual reporta que el principal objetivo del desengrasado es generar una mejor carbonización durante el proceso de pirolisis. Sin embargo, estas diferencias no han sido muy significativas en cuanto a la influencia de estos residuos en la dinámica de C y N, como se verá más adelante.

Las modificaciones composicionales de los diferentes subproductos de los SCG con respecto al SCG también pueden entenderse a partir del diagrama de van Krevelen (**Figura 72**) obtenido con los datos del análisis elemental (**Tabla 33**). La representación de la relación atómica H/O frente a la relación atómica O/C indica que los SCG y los SCG<sub>d</sub> exhiben relaciones H/C-O/C más elevadas que las muestras de hidrochar y biochar. La menor relación O/C está relacionado con los procesos de descarboxilación y la menor relación O/H con los procesos de deshidratación. El HTC y el proceso de pirolisis mueven las

proporciones atómicas de la parte superior derecha a la inferior izquierda. En el caso del H200, las relaciones H/C y O/C disminuyeron entre un 30 y un 100%, con respecto al SCG. La pirolisis a 400 °C generó subproductos con las relaciones H/C y O/C más bajas. El VC mostró una relación O/C más alta. Específicamente para los SCG, Afolabi et al. (2020) encontraron que las relaciones H/C y O/C de los hidrochars de SCG disminuyeron de manera similar a nuestros resultados.



**Figura 72.** Diagrama Van-krevelen. SCG, posos de café; B270, biochar producido a 270°C; B400, biochar producido a 400°C; H160, hidrochar producido a 160°C; H200, hidrochar producido a 200°C; VC, vermicompost; SCG<sub>d</sub>, posos de café desengrasados; B270<sub>d</sub>, biochar producido a 270°C a partir de SCG<sub>d</sub>; B400<sub>d</sub>, biochar producido a 400°C a partir de SCG<sub>d</sub>.

La **Figura 68** muestra importantes diferencias entre las partículas SCG y las correspondientes a B400, H200 y VC. Estas diferencias se pueden explicar por la estructura del grano de café procedente de la planta del Cafeto y por los procesos pirolíticos, HTC y vermicompostaje que sufren las partículas de SCG. Según Fadaei et al. (2017), la estructura de un grano de café verde está compuesta por una matriz intercelular con celulosa, galactomananos, arabinogalactanos,

lignina, agua ligada y carbohidratos estructurales. Esta estructura contiene bolsas de células biológicas con agua, proteína de aceite, azúcar, etc. Las partículas de SCG provienen de esa semilla tostada, molida e hidrolizada a baja temperatura para obtener la bebida de café. La **Figura 68a** corresponde a una partícula de SCG y muestra un vaciado parcial de las bolsas, lo que conduce a una cierta porosidad, también señalada por otros autores (Ballesteros et al., 2014). En la muestra B400 se observa una estructura porosa tipo panal (**Figura 68b**), generada, como señalan algunos autores (Kambo y Dutta, 2015; Stylianaou et al., 2020) por la liberación de los compuestos orgánicos más volátiles. Este hecho se ve corroborado por la disminución de la materia volátil en las muestras de biochar (**Tabla 33**). Las partículas de residuos de H200 (**Figura 68c**) muestran una morfología diferente a la de los biochars. Los poros están llenos de materiales, lo que coincide con Kambo y Dutta (2015). La obstrucción de los poros se debe a la liberación de compuestos solubles generados durante el proceso de HTC como lo indican Song et al. (2020) y es consistente con un incremento de la materia volátil en H200 con respecto a B400 (**Tabla 33**). La morfología de las partículas VC revela la destrucción del residuo SCG ya que no se aprecian estructuras de la semilla (**Figura 68d**).

#### 4.8.6. Dinámica del C en el suelo

El análisis de evolución de  $\text{CO}_2$  y  $C_R$ , mostró dos patrones principales y muy bien diferenciados (**Figura 69** y **Figura 70**): SCG, SCG<sub>d</sub>, H160 y H200 generaron mayores flujos de  $\text{CO}_2$  y consecuentemente menor  $C_R$ , mientras que biochars y VC no cambiaron o aumentaron levemente las emisiones de  $\text{CO}_2$ . La única excepción fue representada por B270 que mostró un comportamiento intermedio entre estos dos patrones generales. Estos resultados concuerdan con los de Gálvez et al. (2012), los cuales muestran un potencial de secuestro de C

y emisiones de CO<sub>2</sub> muy diferentes de los residuos del proceso de bioenergía fuertemente relacionados con su composición y propiedades.

Como se indicó anteriormente, el comportamiento de SCG e hidrochars es similar dado que son los residuos más lábiles probados. Zhang et al. (2014) afirmaron que la adición de SCG aumentó las concentraciones de carbono orgánico disuelto y como resultado aumentó la tasa de respiración del suelo alcanzando 0.06 µg CO<sub>2</sub>-C g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, un resultado muy similar al de nuestro estudio (aproximadamente 0.1 µg CO<sub>2</sub>- C g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, **Figura 69**). Con respecto a los hidrochars, nuestros resultados están en concordancia con los de Bargmann et al. (2014b) y Kamman et al. (2012), los cuales indicaron que los hidrochars exhibían emisiones de CO<sub>2</sub> significativamente más altas que los biochars. Específicamente, Bargmann et al. (2014b) encontraron que la adición de hidrochars en una dosis del 2% generaba un pico máximo de 0.17 µg CO<sub>2</sub>-C g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, similar a los hidrochars de SCG (**Figura 69**). Este hecho podría atribuirse a la presencia de C menos poliaromático y al predominio de compuestos alifáticos (Islam et al., 2021) haciendo que los hidrochars sean menos estables que los biochars (Bargmann et al., 2014b; Islam et al., 2021; Kamman et al., 2014b; Kamman et al., 2021). Según Eibisch et al. (2013), las principales causas de la degradabilidad de los hidrochars están relacionados con una gran cantidad de grupos funcionales hidrófilos, una baja relación C/N y un bajo contenido de lignina. En nuestro caso, los SCG, por su composición, podrían generar hidrochars con un comportamiento imprevisible, ya que tienen cantidades apreciables de lignina en su composición, pero también proteínas, azúcares (Alves et al., 2017). En los hidrochars ensayados ha predominado el carácter lábil de los compuestos más degradables, como se muestra en los resultados del trabajo (**Tabla 33**). Un indicador de su estabilidad son sus relaciones molares H/C y O/C (**Figura 72**) que, según lo indicado por Schimmelpfenning y Glaser (2012), corresponde a residuos de baja estabilidad. En cuanto al C<sub>R</sub> de los SCG y los hidrochars, los resultados a los 30 días son

similares al  $C_R$  con harina de colza o residuo de bioetanol (Gálvez et al., 2012), considerados por estos autores como residuos lábiles.

Por el contrario, los biochars son los residuos menos alterables ya que tienen pequeñas cantidades de WSC y altas cantidades de carbono fijado (**Tabla 33**), lo que explica la baja generación de  $CO_2$  y el alto C que queda cuando estos subproductos derivados de los SCG se agregan al suelo (**Figura 69** y **Figura 70**). Zhang et al. (2014) también reportaron que la adición de biochar de SCG no aumentó significativamente la respiración del suelo durante la incubación. La temperatura de pirolisis influye en este comportamiento: cuanto menor es la temperatura, mayores son las emisiones (Ameloot et al., 2013), siendo los productos B270 y B270<sub>d</sub> más estables que los SCG e hidrochars y más lábiles que el biochar producido a temperaturas más altas. Según Zhang et al. (2014), los biochars producidos a bajas temperaturas (250 y 400 ° C) aumentaron las tasas de respiración del suelo, lo que podría estar relacionado con las fracciones de C más lábiles del biochar (compuestos no pirolizados). Esta afirmación coincide parcialmente con el comportamiento del B270, pero no con el B270<sub>d</sub> ni con los biochars a 400 ° C (**Figura 69** y **Figura 70**). El comportamiento del B270<sub>d</sub>, más cercano a B400 y B400<sub>d</sub>, podría explicarse según lo indicado por Vardon et al. (2013), los cuales afirmaron que el desengrasado de los SCG aumenta el rendimiento del proceso de pirolisis. Los resultados de este estudio están en línea con los resultados de Gálvez et al. (2012) los cuales encontraron que el biochar obtenido mediante pirolisis lenta resultó en un  $C_R$  más alto debido a un alto contenido de reserva de C de degradación lenta. El efecto del biochar sobre las emisiones de  $CO_2$  es controvertido en la literatura: algunos estudios reportan que la adición de este subproducto reduce las emisiones de  $CO_2$  o no provoca ningún efecto en la emisión de  $CO_2$  y otros estudios reportan incrementos de emisiones de  $CO_2$  en los primeros días de incubación (Shalini et al., 2020). El VC tiene concentraciones intermedias de WSC (10.83  $\mu\text{g/g}$ , **Tabla 33**) y consecuentemente, su adición no generó altas emisiones de  $CO_2$ ,

nunca superando el límite de  $2 \text{ mg g}^{-1} \text{ día}^{-1}$  (límite establecido para considerar un compost “muy estable”, Santos et al., 2017). Esta estabilidad fue corroborada por su baja relación C/N (**Tabla 33**). Comparando con la respiración generada por otros tipos de compost reportados en la bibliografía (Gálvez et al., 2012), la adición de VC generó 10 veces más  $\text{CO}_2$  que el compost de residuos domésticos y el compost de sarmientos de vid, lo que podría atribuirse a la diferente dosis agregada (0.5%).

Por todo lo anterior y de acuerdo con la bibliografía, el WSC y la materia volátil parecen ser las características de los residuos que mejor justifican este comportamiento de los subproductos de SCG ensayados con respecto a las emisiones de  $\text{CO}_2$  y el  $\text{C}_R$ . Así, las enmiendas con alto contenido de WSC y materia volátil (**Tabla 33**), produjeron altas cantidades de emisiones de  $\text{CO}_2$  (**Figura 69**) y bajo  $\text{C}_R$  (**Figura 70**), lo que se corrobora por la correlación significativa entre WSC y  $\text{CO}_2$  ( $r = 0.970$ ;  $p < 0.001$ ), WSC y  $\text{C}_R$  ( $r = -0.937$ ,  $p < 0.001$ ), materia volátil y  $\text{CO}_2$  ( $r = 0.863$ ,  $p < 0.01$ ) y materia volátil y  $\text{C}_R$  ( $r = -0.910$ ,  $p < 0.001$ ). Por otro lado, también existen interesantes correlaciones con el C fijado que también explican el comportamiento de los residuos: C fijado y  $\text{CO}_2$  ( $r = -0.732$ ,  $p < 0.05$ ), C fijado y  $\text{C}_R$  ( $r = 0.790$ ,  $p < 0.05$ ).

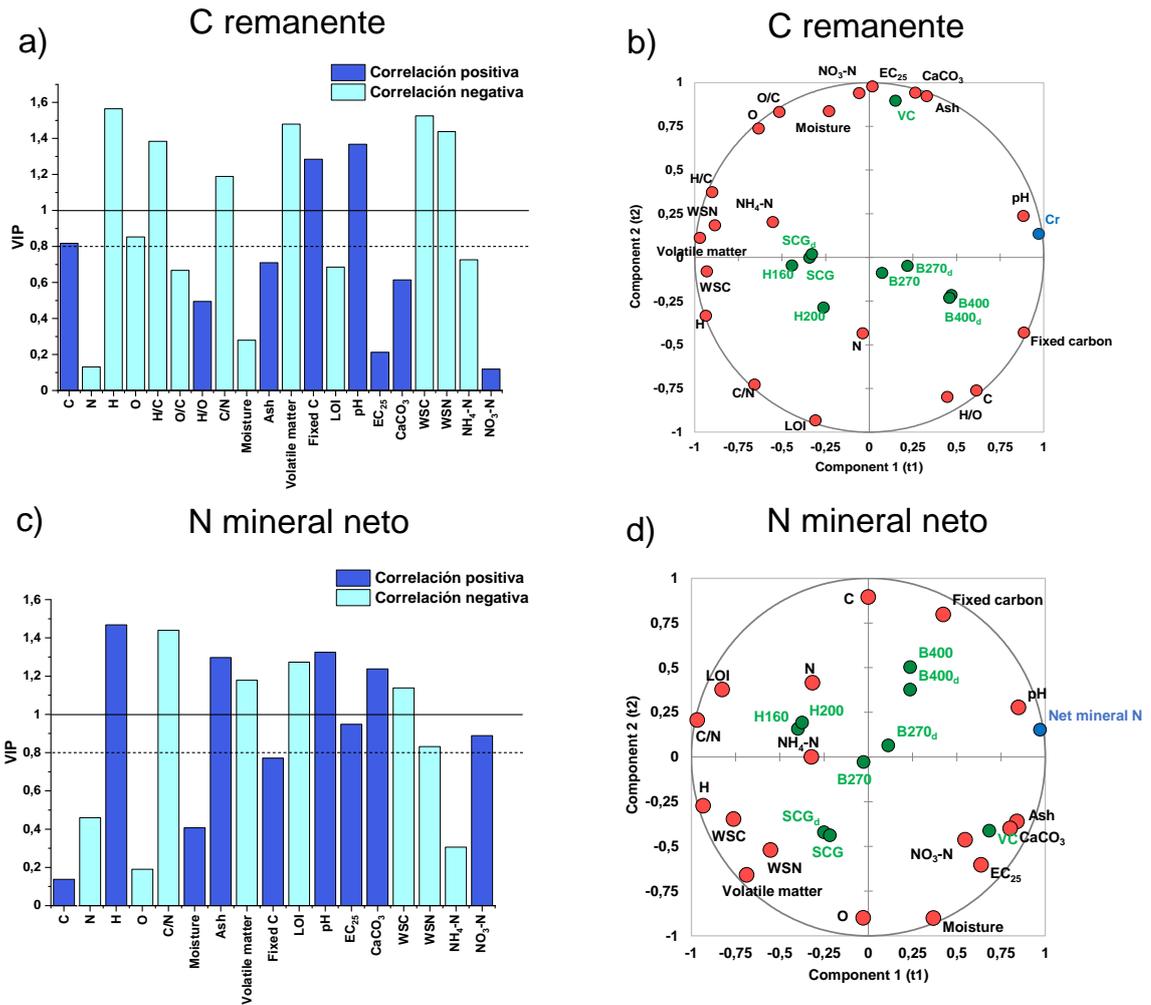
El análisis químico de las muestras de suelo incubadas permite el estudio de dos parámetros esenciales en la dinámica del C: el EC y la BC, ambos estrechamente relacionados con las emisiones de  $\text{CO}_2$  y  $\text{C}_R$ . La adición de subproductos de SCG con un mayor contenido de WSC (SCG,  $\text{SCG}_d$ , hydrochars y VC, **Tabla 33**), genera mayores reservas de EC en el suelo (**Figura 71a**). El comportamiento contrario es característico de los biochars. Por tanto, el EC del suelo se relaciona positiva y significativamente con el contenido de WSC en los residuos. La relación ocurre a los 2 días ( $r = 0.775$ ,  $p < 0.05$ ), 7 días ( $r = 0.830$ ;  $p < 0.01$ ) y 30 días ( $r = 0.887$ ;  $p < 0.01$ ). Un EC del suelo más alto significa una mayor cantidad de sustrato para la actividad microbiana (Bargmann et al., 2014b), lo que se confirma por la relación positiva entre EC

y BC ( $r = 0.463$ ;  $p < 0.001$ ). Como consecuencia del aumento de la actividad microbiana, se generan mayores emisiones de CO<sub>2</sub> y menor C<sub>R</sub> (**Figura 69** y **Figura 70**). Así, el contenido de EC en los suelos se correlaciona significativamente con las emisiones de CO<sub>2</sub> (por ejemplo, a los 30 días,  $r = 0.788$ ;  $p < 0,001$ ) y C<sub>R</sub> (por ejemplo, a los 30 días,  $r = -0.718$ ;  $p < 0.001$ ). Este hecho concuerda con los resultados de Bera et al. (2021). La BC como consecuencia de su relación con EC, se relacionó con las cantidades de WSC en el residuo ( $r = 0.507$ ,  $p < 0.01$ ). Por tanto, el BC es mayor en residuos de SCG, SCG<sub>d</sub>, hidrochars y VC y menor en los biochars, a excepción del B270, lo que confirma su comportamiento similar a los SCG y a los hidrochars. Zhang et al. (2014) también reportaron un aumento en BC (en un 110%) cuando se agregó SCG al suelo. En nuestro caso, el incremento con respecto a la muestra control a los 2 días de incubación (el valor máximo) fue del 83% (**Figura 71c**). Los últimos autores también encontraron que la adición de biochar de SCG no modificó el BC, lo que también podría atribuirse a la presencia de compuestos orgánicos tóxicos (Deenin et al., 2010). Posteriormente, el BC disminuyó durante el tiempo de incubación debido a la menor cantidad de EC (**Figura 71a**). La disminución de EC durante el proceso de descomposición se ha relacionado con el proceso de estabilización (Mohanty et al., 2013).

Para mostrar cómo las propiedades de las bio-enmiendas influyen en los parámetros del ciclo de C, se realizó una regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-R) en la que se estableció el C<sub>R</sub> como variable dependiente (**Figura 73 a y b**). Un resultado del PLS-R es la Importancia de la Variable para la Proyección (VIP) (**Figura 73a**). Este análisis PLS-R indica que el C<sub>R</sub> está muy relacionado con algunas propiedades de los residuos. Las variables con un VIP > 1 (las cuales son buenas candidatas para explicar el C<sub>R</sub>, Lew et al., 2019) son: H, H / C, C/N, materia volátil, C fijado, pH, WSC y WSN. C y O tuvieron un VIP entre 0.8 y 1, y, por lo tanto, también son buenos candidatos para explicar el C<sub>R</sub>, pero en menor medida. Las relaciones negativas o positivas del

$C_R$  con las propiedades de los residuos (**Figura 73a**) se pueden explicar porque estas propiedades corresponden a residuos más o menos biodegradables y por lo tanto con menor o mayor capacidad de fijar C en el suelo. Así: i) H, H/C e inversamente O, están relacionados con una naturaleza más reducida de los compuestos orgánicos (Das et al., 2021); ii) los valores más altos de C y C/N corresponden a materiales orgánicos que son relativamente más ricos en C; iii) la materia volátil representa la fracción menos condensada y más lábil (Das et al., 2021); iv) WSC y WSN están relacionados con la presencia de moléculas orgánicas más pequeñas y menos condensadas (más alifáticas) (Alidali et al., 2016); v) el C fijado corresponde a la fracción estable de C, contrario a la materia volátil (Afolabi et al., 2020; Bera et al., 2021) y vi) los pH más ácidos están relacionados con la presencia de cadenas alifáticas con grupos funcionales ácido e hidroxilo (Alidali et al., 2016; Das et al., 2021).

En el diagrama de dispersión de la **Figura 73b**, el componente 2 se representa frente al componente 1, los cuales explican el 96,09% de la varianza. Las relaciones entre  $C_R$  y las diferentes propiedades de las enmiendas se confirman al considerar estas mismas enmiendas como variables. Así, se produce un  $C_R$  alto con el B400 y B400<sub>d</sub> y en menor medida con el B270 y B270<sub>d</sub>. El  $C_R$  más bajo corresponde a los residuos SCG, SCG<sub>d</sub>, H160 y H200. El VC no parece tener una influencia significativa sobre  $C_R$ .



**Figura 73.** Análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-R) asociado a los dos primeros componentes. a) y c) Los VIP (Importancia variable para la proyección) para las variables explicativas del componente 1, con respecto al C remanente y el N mineral neto como variables dependientes. Los  $VIP > 1$  indican las variables explicativas que más contribuyen a los modelos PLS. Los  $VIP > 0.8$  indican una contribución importante al modelo PLS. b) y d) Diagrama de dispersión del componente 1 vs componente 2, en el que se muestran las correlaciones con el C remanente y el N mineral neto, para las propiedades de los biorresiduos y los propios residuos como variables. SCG, posos de café; B270, biochar producido a 270°C; B400, biochar producido a 400°C; H160, hidrochar producido a 160°C; H200, hidrochar producido a 200°C; VC, vermicompost; SCG<sub>d</sub>, posos de café desengrasados; B270<sub>d</sub>, biochar producido a 270°C a partir de SCG<sub>d</sub>; B400<sub>d</sub>, biochar producido a 400°C a partir de SCG<sub>d</sub>.

#### 4.8.7. Dinámica del N en el suelo

Según Mohanty et al. (2013), la dinámica del N del suelo está relacionada con el N total, otras formas de N y la relación C/N de las enmiendas orgánicas. Otros autores (Gálvez et al., 2012) consideran que la dinámica del N depende estrechamente de las formas lábiles de C, representadas por WSC, y la relación C/N. Esta relación indica globalmente la estabilidad de los residuos (Wilson et al., 2019). Los resultados relacionados con el ciclo del N (**Figura 71** y **Tabla 35**) muestran que los bio-residuos probados se pueden agrupar en tres grupos según sus efectos en las propiedades del suelo: i) SCG, SCG<sub>d</sub>, H160, H200 y B270, ii) B400, B400<sub>d</sub> y B270<sub>d</sub>, y iii) VC. El primer grupo genera una inmovilización significativa de N y aumento de BN. El segundo grupo tiene un efecto insignificante sobre las formas nitrogenadas. Sólo después de 30 días, el B270<sub>d</sub> provocó un ligero aumento en la inmovilización de N y BN. La adición de VC provoca un aumento del N mineral extraíble y del BN. De los datos reportados en la **Tabla 33**, se puede deducir que existe una clara relación, como en el caso del C, entre la composición de estos residuos y su influencia en el ciclo del N.

Por lo tanto, el primer grupo de bio-enmiendas se caracteriza por mayores WSC, WSN, C/N y proporciones más bajas de N total, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. El segundo grupo tiene una composición diferente y opuesta al anterior. El VC muestra cantidades moderadas de WSC, una C/N muy baja y altos contenidos de diferentes formas de N. En general, las características de los materiales con mayor relación con el efecto sobre el ciclo del N del suelo fueron el contenido de N y el WSC. De hecho, hubo relaciones positivas significativas entre el contenido de N de los materiales y el N extraíble y mineral para los 3 tiempos de muestreo. Además, hubo una correlación positiva entre WSC y BN después de 2 días de incubación ( $r = 0.80$ ).

En el caso de SCG, SCG<sub>d</sub>, H160, H200 y B270, las altas cantidades de WSC, correlacionadas positivamente con WSN ( $r = 0.953$ ;  $p < 0.001$ ),

estimularon la actividad y el crecimiento de los microorganismos, como se ve analizando el CO<sub>2</sub> del suelo y la dinámica de la BC y la consiguiente mineralización de materia orgánica exógena. Así, se observó un aumento de BN a los 2 días en el primer grupo de las bio-enmiendas con respecto a la muestra control (**Figura 71d**). Estos materiales presentan el menor contenido de N y los mayores valores de C/N (18-25) y por lo tanto su mineralización no aportó a los microorganismos todo el N requerido por la biomasa en crecimiento. En consecuencia, los microorganismos tomaron el N necesario del N disponible en el suelo provocando una reducción significativa del N extraíble y mineral del suelo (inmovilización de N). De hecho, se registró una disminución de EN en los primeros días de incubación. Ya se ha reportado la disminución en el EN del suelo relacionada con aumentos simultáneos en la BN en suelos enmendados (Bargmann et al., 2014b). La evidencia reportada anteriormente podría explicar la inmovilización microbiana causada por la adición de SCG, H160, H200, SCG<sub>d</sub> y B270 durante los 30 días (ver N mineral neto, **Tabla 35**). Este hecho es consistente con hallazgos previos relacionados con los hidrochars (Bargmann et al., 2014a; 2014b). Más específicamente, Bargmann et al. (2014a) encontraron que la adición de hidrochars (de astillas de remolacha y granos de cerveza usados) redujo la concentración de nitrato dentro de la primera semana después de la incorporación. En ese estudio se necesitaron 4 semanas para detectar NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, lo que está en línea con los resultados de este estudio, ya que a los 30 días se detectaron pequeñas cantidades de nitratos en H160 y H200 (**Tabla 35**). La inmovilización de N causada por la adición de SCG (ver N mineral neto, **Tabla 35**) concuerda bien con los resultados de Cruz y Cordovil (2015), quienes encontraron una absorción reducida de N por las plantas.

La adición de biochars (con la única excepción de B270) no incrementó la biomasa microbiana con respecto a la muestra control (**Figura 71d**), y como consecuencia no parece haber inmovilización microbiana de N con la adición de este subproducto. Durante el período de incubación, los valores de EN se

mantienen en valores similares al control (**Figura 71b**), excepto para el caso de B270, que tiene un comportamiento más similar al del primer grupo. Los biochars tienen más del 3% de N total (**Tabla 33**), lo que resulta en un mayor suministro de N al suelo. A partir de esto, se podría anticipar que su adición al suelo aumentaría el contenido de N disponible. Sin embargo, estos sustratos se caracterizan por la alta estabilidad de C y la baja cantidad de C y N fácilmente disponibles (WSC y WSN) (**Tabla 33**). Por lo tanto, los microorganismos podrían degradar y convertir en N fácilmente extraíble sólo una parte limitada del N total del residuo que no exceda las concentraciones de EN de la muestra de control.

Considerando las formas de N inorgánico, el uso de biochars resultó en una leve inmovilización de N, como se muestra en los valores negativos del N mineral neto (**Tabla 35**), mayor en el caso de B270. La inmovilización de N fue significativamente menor con respecto a los SCG e hidrochars. Un estudio de meta análisis realizado por Nguyen et al. (2017) concluyó que el uso de biochar redujo el nitrógeno inorgánico del suelo, sin embargo, el 95% de los casos se observaron un año después de la aplicación del biochar. Este retraso de la inmovilización también coincide con nuestros resultados, aunque en nuestro caso el ensayo solo alcanzó los 30 días. La inmovilización de N podría atribuirse a la inmovilización microbiana en el caso de residuos degradables, como son los SCG e hidrochars, lo que se corrobora con los valores de la BN (**Figura 71d**). Sin embargo, como se indicó anteriormente, no hay un aumento significativo de la BN con la adición de biochars, a excepción del B270, lo cual está en línea con los hallazgos de Bargmann et al. (2014b), los cuales afirmaron que sólo se encontró una pequeña cantidad de N inmovilizado en la biomasa microbiana con la adición de biochars derivados de la remolacha y granos de cerveza usados. Estos autores, en un estudio previo (Bargman et al., 2014a) plantearon una pregunta sobre las causas de la inmovilización de N: este fenómeno podría producirse por sorción en las áreas superficiales internas o

por inmovilización microbiana del N mineral. Dieguez-Alonso et al. (2018) y Bargmann et al. (2014b) concluyeron que la superficie específica BET es mayor en biochars que en hidrochars. En nuestro caso, no disponemos de estos datos para corroborar la hipótesis de Bargman et al. (2014a). Sin embargo, las imágenes SEM (**Figura 68**) sugieren que los B400 tiene una superficie estimada visualmente más grande, debido a su mayor porosidad que los hidrochars. Además, según Diéguez-Alonso et al. (2018) cuanto menor es el contenido de volátiles, mayor es la superficie específica, lo que corroboraría el hecho de que, en nuestro caso, los biochars tienen una superficie específica mayor que los hidrochars. Se necesitan más investigaciones para estudiar la inmovilización de N causada por los biochars.

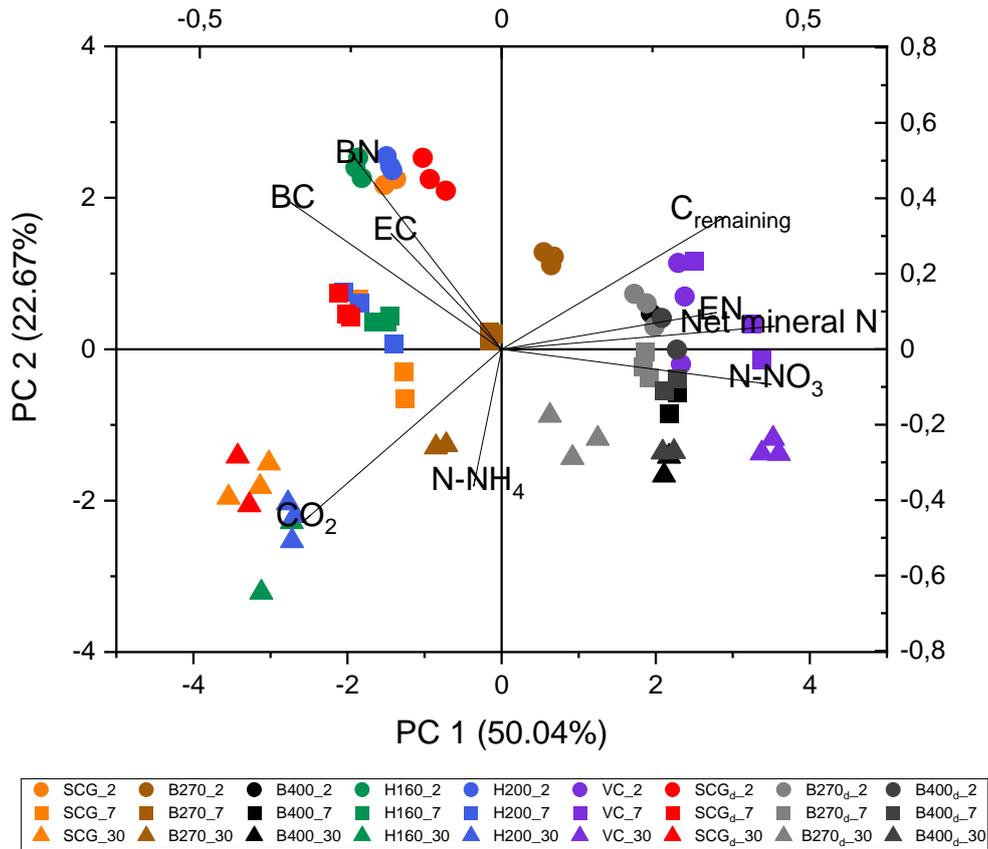
El VC no se puede incluir en los dos grupos mencionados anteriormente debido a sus altas cantidades tanto de N total como de WSN (**Tabla 33**). Como se muestra en la **Figura 71b**, hay un aumento de EN con respecto a la muestra control en todo el experimento, lo que podría indicar que hay suficiente N en la solución del suelo. El comportamiento de la BN es algo diferente. La BN es mayor que el control en los 3 tiempos ensayados, pero disminuye durante el tiempo de incubación, lo que puede ser atribuible a la disminución del EC, como se puede ver en la **Figura 71a**. En consecuencia, la adición de VC no indujo la inmovilización de N, como lo corroboran los valores positivos del N mineral neto (**Tabla 35**). En cuanto al efecto sobre la inmovilización de nitrógeno de otros compost usados en la literatura, depende del grado de madurez del compost utilizado: en general, el compost maduro no genera inmovilización de N, debido a su baja relación C/N y  $\text{NH}_4\text{-N}/\text{NO}_3\text{-N}$  (Wilson et al., 2019). Por otro lado, en el trabajo de Gálvez et al. (2012), la adición de compost de desechos domésticos y compost de sarmientos resultó en una inmovilización de N. Ambos compost tuvieron una relación C/N bastante alta (15 y 23, respectivamente), lo que podría considerarse como compost inmaduro.

Con respecto a las emisiones de  $N_2O$ , se demostró que todos los residuos probados son productos seguros por lo que respecta a los posibles efectos sobre este gas nocivo. Estos resultados están de acuerdo con Zhang et al. (2014) quienes reportaron que la enmienda del suelo con biochar de SCG no tuvo un efecto significativo en la tasa de emisiones de  $N_2O$ . Santos et al. (2017) también reportaron que, durante el proceso de compostaje de los SCG, las emisiones de  $N_2O$  fueron muy bajas.

Al igual que con el  $C_R$ , se realizó un análisis PLS-R, con el N mineral neto a los 30 días como variable dependiente, para mostrar cómo las propiedades de los residuos influyen en el ciclo del N (**Figura 73 c y d**). Contenido en cenizas, pH,  $CE_{25}$ ,  $CaCO_3$  eq. y  $NO_3^-$  muestran relaciones positivas con un  $VIP > 0.8$ . Las relaciones negativas son con el H, C/N, materia volátil, LOI, WSC y WSN. El N mineral neto debe entenderse como el resultado final de la actividad biológica. Los residuos cuyas propiedades conducen a un aumento de la actividad biológica provocaron un bloqueo de N y por tanto un N mineral neto menor (Bargmann et al., 2014a). Salvo para la  $CE_{25}$  y el  $CaCO_3$  eq., se ha discutido la relación del resto de las variables citadas con la biodegradabilidad del residuo. Para explicar la influencia de estas dos variables es necesario tener en cuenta que son muy diferentes en el VC con respecto al resto de residuos (**Tabla 33**). Entonces, la relación positiva con el N mineral neto se lleva a cabo de forma indirecta: el VC es el residuo que determina un N mineral neto más alto, lo que se debe a otras propiedades de este residuo (bajo LOI, alto contenido en nitratos, etc.). En la **Figura 73d**, el componente 2 se representa frente al componente 1, los cuales explican el 96.49% de la varianza. Cuando las bio-enmiendas se consideran variables en sí mismas, se corroboran las relaciones anteriores. Así, el mayor N mineral neto es generado por el VC, como ya se mencionó, seguido por el B400, B400<sub>d</sub>, B270 y B270<sub>d</sub> y por último los residuos más biodegradables (SCG, SCG<sub>d</sub>, H160 y H200).

#### 4.8.8. Comportamiento global del C y N en suelos incubados con diferentes bio-enmiendas derivadas de los SCG. Implicaciones en la calidad del suelo

Se realizó un análisis de componentes principales para reducir y explicar la variabilidad del sistema. Se seleccionó una matriz con los parámetros EC, EN, BC, BN, N-NO<sub>3</sub>, N-NH<sub>4</sub>, N mineral neto, CO<sub>2</sub> acumulado y C<sub>R</sub> a los 2, 7 y 30 días. La **Figura 74** muestra el espacio definido por PC1 y PC2 (que capturan el 72.71% de varianza) con los “scores values” de las muestras. El primer componente, explicó el 50.04% de la varianza, agrupa las muestras según el tratamiento aplicado. Los valores más altos en este PC corresponden a muestras de biochar y VC, con valores altos de C<sub>R</sub>, EN, N-NO<sub>3</sub> y N mineral neto. Por el contrario, los valores positivos en este PC corresponden a muestras más degradables como SCG, SCG<sub>d</sub>, H160 y H200, con altos valores de emisiones CO<sub>2</sub>, BC, BN y EC. El PC2, explicó el 22.67% de la varianza, agrupa las muestras según el tiempo de incubación. Los valores positivos corresponden a las muestras de 2 días cercanas a las variables BC, BN, EC y C<sub>R</sub> ya que los valores de estos parámetros disminuyeron durante la incubación (**Figura 70** y **Figura 71**). Los valores negativos corresponden a las muestras de 30 días próximas a la variable emisiones de CO<sub>2</sub> ya que a los 30 días el CO<sub>2</sub> acumulado es máximo (**Figura 69**). El comportamiento de N con respecto a los días no parece claro. Todo lo que se deduce de la PCA confirma lo comentado anteriormente.



**Figura 74.** Gráfico superpuesto de las puntuaciones del análisis de componentes principales obtenidas para las muestras (PC2 vs PC1) y cargas de los parámetros del suelo a los 2, 7 y 30 días. . SCG, posos de café; B270, biochar producido a 270°C; B400, biochar producido a 400°C; H160, hidrochar producido a 160°C; H200, hidrochar producido a 200°C; VC, vermicompost; SCG<sub>d</sub>, posos de café desengrasados; B270<sub>d</sub>, biochar producido a 270°C a partir de SCG<sub>d</sub>; B400<sub>d</sub>, biochar producido a 400°C a partir de SCG<sub>d</sub>.

Además, con base en el PCA, podemos discutir uno de los aspectos más interesantes de la evaluación de enmiendas orgánicas, que es su efecto sobre la calidad del suelo. En una revisión de Bünemann et al. (2018) sobre este tema, se recolectaron varios indicadores de calidad del suelo como son la mineralización del N, biomasa microbiana, respiración del suelo, C y N lábil, N disponible y C orgánico total. Estos indicadores de calidad del suelo (todos empleados en este trabajo) se utilizaron en más del 20% de los enfoques de

evaluación de la calidad del suelo revisados. Desde el punto de vista de la calidad del suelo, los subproductos de SCG empleados en este ensayo podrían tener diferentes impactos en el suelo, lo que sugiere que podrían cumplir con propósitos agronómicos y ambientales específicos. Así, por ejemplo, con respecto a la persistencia del C orgánico agregado en el suelo, los biochars son más efectivos, pero por otro lado no representan una fuente de N disponible y no mejoran la fertilidad biológica. Por el contrario, los SCG y los hidrochars, caracterizados por una alta degradabilidad, promueven el desarrollo de la biomasa microbiana y, por lo tanto, pueden mantener la fertilidad biológica del suelo. Sin embargo, debido a la relación C/N relativamente alta, pueden causar una inmovilización temporal de N en el suelo. El VC es un material que presenta interesantes propiedades agronómicas y medioambientales. Es una buena fuente de N disponible, pero al mismo tiempo presenta una buena persistencia en el suelo y promueve un aumento limitado pero significativo de la biomasa microbiana.

#### **4.8.9.Consideraciones finales**

Todas las transformaciones aplicadas a los SCG generan subproductos bastante diferentes de los SCG originales y con propiedades químicas, fisicoquímicas y morfológicas muy distintas. Se ha demostrado una relación clara entre las propiedades de las bio-enmiendas probadas y sus efectos sobre los ciclos C y N. Los SCG, SCG<sub>d</sub> e hidrochars son bio-residuos que estimulan la actividad biológica del suelo, debido a que contienen moléculas carbonosas fácilmente degradables. El proceso de carbonización hidrotermal (generador de hidrochars) acentúa esta característica. Como consecuencia, los SCG y los hidrochars conducen a corto y medio plazo a la inmovilización de N, una menor conservación de C orgánico en el suelo y mayores emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. La pirolisis de SCG, que da lugar a los biochars, elimina gran parte

del C fácilmente degradable de estos residuos, lo que conduce a una menor inmovilización de N y una mayor fijación de C orgánico en el suelo. Por lo tanto, las dos vías de transformación térmica conducen a desechos con características y efectos divergentes en el suelo. El vermicompostaje de SCG genera un producto con moléculas carbonosas estables, pero con un alto contenido de diferentes formas de N. Es el único de los subproductos de los SCG que no genera inmovilización de N e incluso puede considerarse como fertilizante nitrogenado. Todos los materiales probados no provocaron un aumento en las emisiones de N<sub>2</sub>O. Por lo tanto, los subproductos de SCG podrían lograr diferentes objetivos cuando se agregan al suelo. Los resultados del presente estudio muestran que las investigaciones sobre el impacto de los residuos orgánicos en la calidad y fertilidad del suelo son muy útiles para evaluar su compromiso entre el propósito agronómico y ambiental y permitir la identificación del material más adecuado para un objetivo específico.

## **4.9. ENSAYO 9. USO POTENCIAL DE LOS SCG Y OTROS DERIVADOS DE LA BEBIDA DEL CAFÉ COMO QUELATOS EN LA BIOFORTIFICACIÓN AGRONÓMICA DE PLANTAS COMESTIBLES**

### **4.9.1. Conocimiento previo**

La biofortificación agronómica es el método más rápido y económico para superar las deficiencias en micronutrientes de Fe y Zn (Prasad et al., 2020). Esta biofortificación se realiza a través de la adición de fertilizantes enriquecidos en estos micronutrientes en formas orgánicas (quelatos) o inorgánicas (sales comerciales) (Cakmak et al., 2018; Kozik et al., 2011; Mohammadi y Khoshgoftarmanesh, 2014). Poniendo como ejemplo el Zn, el  $ZnSO_4$  es la fuente inorgánica de Zn más extendida debido a su bajo coste y a su alta solubilidad en agua (Cakmak et al., 2008). Diferente de las sales inorgánicas de Zn, los quelatos de Zn, especialmente el Zn-EDTA, es bastante efectivo en aportar Zn a las plantas, ya que supone una mayor absorción y confiere una mayor biodisponibilidad de Zn comparado con el  $ZnSO_4$  (Zhao et al., 2019). El Programa HarvestPlus creado por el Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) se centra en varios programas de biofortificación de cultivos importantes, incluidos arroz, trigo, maíz, frijoles, batata, mandioca y mijo perla, para mitigar la desnutrición de micronutrientes como Fe, Zn y provitamina A.

El uso de enmiendas orgánicas es otra alternativa para mejorar la asimilación de micronutrientes por las plantas (Diacono y Montemurro, 2010), ya que la reserva suministrada por este tipo de enmiendas podría ser menos inmediata y más duradera. Así mismo, el uso de residuos de la industria agroalimentaria como enmiendas orgánicas, es una alternativa que ha cobrado mucha importancia en los últimos años, debido a la necesidad de generar procesos en la llamada *economía circular* (Velenturf et al., 2019).

Al mismo tiempo que esta toxicidad, como ya hemos comentado en otros apartados de esta tesis doctoral, la adición de SCG al suelo puede aumentar la nutrición mineral en la planta, que se atribuye a la presencia de compuestos quelantes en los SCG, como los polifenoles (Morikawa y Saigusa, 2008) y melanoidinas (Rufián-Henares y de la Cueva, 2009). Estos últimos son compuestos generados durante la reacción de Maillard, de carácter polifenólico, por lo que también deben tener efectos fitotóxicos y capacidad quelante (Rufián-Henares y de la Cueva, 2009). En este sentido, Morikawa y Saigusa (2008) estudiaron la influencia de la adición de residuos de café "compostados" con sulfato de hierro durante 60 días en la absorción de Fe por rábano para verificar si el SCG "compostado" podría actuar como agente biofortificante.

#### **4.9.2. Capacidad quelante de los SCG y las melanoidinas**

La capacidad quelante de los SCG y las melanoidinas presentó un comportamiento similar en relación al Fe y Zn (**Tabla 36**). Ambos materiales frescos tenían una mayor afinidad hacia el Zn y menos afinidad hacia el Fe. La funcionalización de los SCG aumentó su contenido en Fe 108 veces y en Zn 18000 veces, mientras que, en el caso de las melanoidinas, la funcionalización aumentó el contenido en Zn 32 veces y en Fe 156 veces. Por lo tanto, los SCG parecen tener más afinidad por el Zn y las melanoidinas más afinidad por el Fe. La capacidad quelante de los SCG y las melanoidinas ha sido ampliamente estudiada previamente (Takenata et al., 2005; Tokimoto et al., 2005; Wang et al., 2013b), sin embargo, esta capacidad nunca se ha centrado con fines agronómicos. Sólo el grupo de investigación de Morikawa y Saigusa (2008) generó un "compost" de residuos de café funcionalizado con Fe, mezclando 800 g SCG + 200 g FeSO<sub>4</sub>, a altas temperaturas (60 ° C) y a largo plazo (60 días). El "compost" de los residuos de café resultante tenía una concentración final de 40000 mg Fe kg<sup>-1</sup>, 10 veces más que los SCG-Fe (**Tabla 36**), debido a

la metodología utilizada por estos autores. Otros estudios que han demostrado la capacidad quelante de los SCG son aquellos sobre el uso de SCG como descontaminante de aguas contaminadas con metales pesados (Dávila-Guzmán et al., 2016; Mohamed y Yee, 2019).

**Tabla 36.** Contenido total de Fe y Zn en los bioquelatos de SCG y las melanoidinas

Muestra	Fe (ppm)	Zn (ppm)
Suelo	38034	79
SCG	37	ND
SCG-Fe	4025	nd
SCG-Zn	nd	17924
Mel	205	77
Mel-Fe	6495	nd
Mel-Zn	nd	11984

SCG: posos de café, Mel: melanoidinas, ND: no detectado, nd: no determinado

La capacidad quelante de las melanoidinas podría atribuirse a su carga aniónica (Rufian-Henares y de la Cueva, 2009), y, además, esta propiedad es responsable de su capacidad antioxidante (Wang et al., 2011) y de su actividad antibiótica (Rufián- Henares y de la Cueva, 2009). Del mismo modo, Wen et al. (2004) también describieron un polímero extraído de la preparación de café (posiblemente melanoidinas), con propiedades quelantes de metales para el Fe, Zn y Cu.

Los SCG son ricos en polisacáridos, lignina y proteínas (Ballesteros et al., 2014). Además de sus componentes nutricionales, los SCG también contienen melanoidinas y polifenoles, siendo el ácido clorogénico el ácido fenólico más abundante en los SCG (Alves et al., 2017). Por lo tanto, su actividad quelante podría atribuirse tanto a las melanoidinas, como a los polifenoles (Morikawa y Saigusa, 2008). Otros autores han establecido que el ácido clorogénico no está involucrado en los procesos de adsorción de metales pesados, pero son las proteínas las responsables de esta capacidad quelante (Tokimoto et al., 2005).

Estos resultados están en línea con lo declarado por Shen et al. (2019), quienes afirmaron que la actividad quelante de metales de las melanoidinas del pan aumentó con el aumento de la cantidad de aminoácidos, siendo la alanina el aminoácido con mayor capacidad quelante. Del mismo modo, Mohammadi y Khoshgoftarmanesh (2014) elaboraron bioquelados de Zn con aminoácidos, ya que estos compuestos podrían coordinar el ion Zn por sus grupos amino y carboxilo. En resumen, las moléculas con grupos funcionales, como los grupos amino, hidroxilo y carboxilo, son aquellas que parecen tener funciones de retención de elementos. Se debe tener en cuenta que la mayoría de los componentes de SCG y melanoidinas (también componentes de SCG) no tienen una composición definida, sino una mezcla de aminoácidos, polifenoles y otros compuestos con estos grupos funcionales.

Comparando las cantidades queladas entre los quelatos comerciales y los bioquelatos, las cantidades queladas por estos últimos fueron menores. Los SCG contiene 0.4% Fe y 1.8% Zn, mientras que las melanoidinas contienen 0.64% de Fe y 1.2% de Zn (calculado a partir de los datos de la **Tabla 36**). De acuerdo con las especificaciones de los quelatos comerciales, el EDDHA-Fe contiene el 6% de Fe y el EDTA-Zn contiene el 14% de Zn, como se indicó en el apartado de Materiales y métodos.

#### **4.9.3.Efectos de los bioquelatos en el contenido de Fe en el sistema suelo-planta**

Para valorar la eficiencia de los bioquelatos en plantas y suelos, se utilizaron diferentes ecuaciones extraídas de la bibliografía. De acuerdo con Zhao et al. (2019), se calculó la eficiencia de utilización de Fe y Zn para la lechuga con respecto a la cantidad total de Fe y Zn añadidos al suelo:

$$\text{Eficiencia de utilización (\%)} = \frac{\text{Absorción en el tratamiento} - \text{Absorción en el control}}{\text{Cantidad de micronutriente añadido}} \times 100$$

Del mismo modo, se calculó la eficiencia de reserva asimilable/disponible de Fe y Zn en el suelo:

$$\text{Eficiencia de reserva asimilable (\%)} = \frac{\text{Extraído en el tratamiento} - \text{Extraído en el control}}{\text{Cantidad de micronutriente añadido}} \times 100$$

El factor de transferencia para los micronutrientes también se calculó para relacionar los parámetros determinados en el suelo y la planta (Almendros et al., 2013):

$$\text{Factor de transferencia} = \frac{\text{Concentración total en la planta}}{\text{Concentración extraída del suelo}}$$

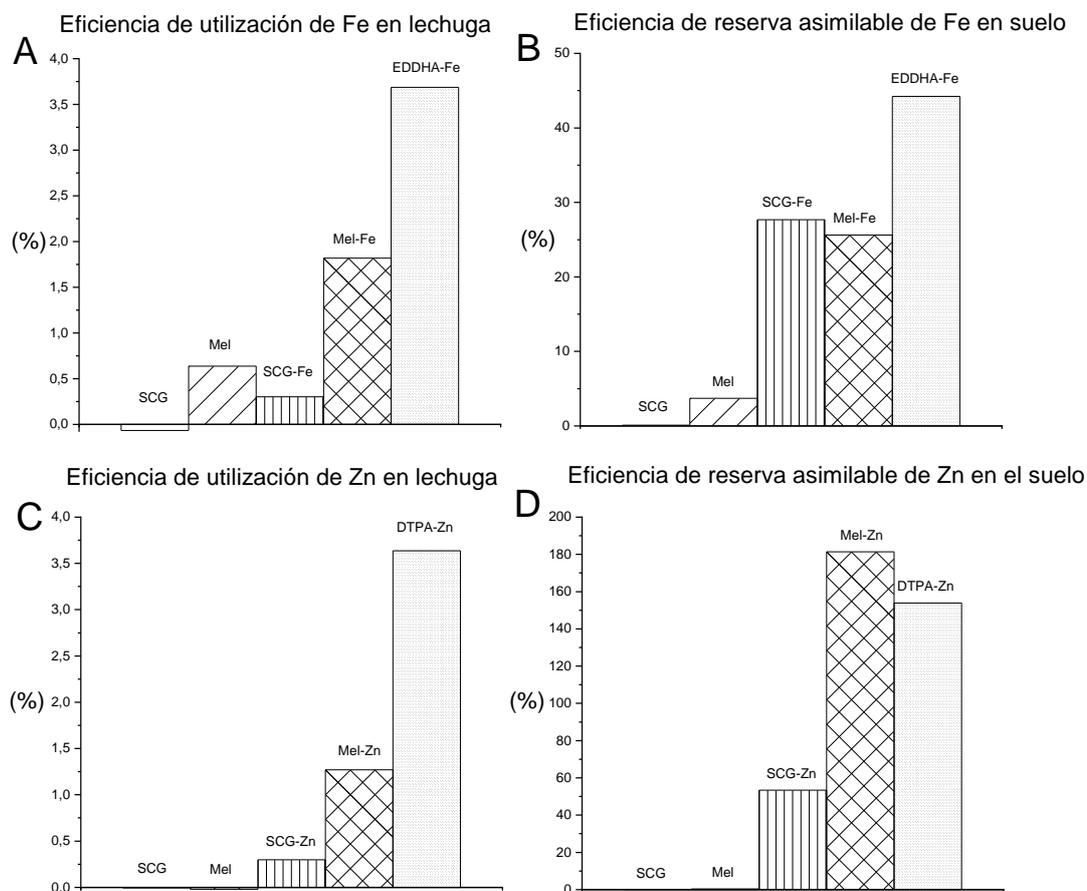
Los niveles de Fe en las lechugas variaron entre 0.669 mg 100 g<sup>-1</sup> en las lechugas cultivadas sólo con NPK, a 1.085 mg 100 g<sup>-1</sup> en lechugas con EDDHA-Fe, aunque las diferencias no fueron significativas (**Tabla 37**). Tanto el quelato comercial como los bioquelatos aumentaron el contenido de Fe en las lechugas. Entonces, la adición de EDDHA-Fe indujo un aumento en la concentración de Fe en las hojas de lechuga de un 62% con respecto a la muestra NPK, mientras que la adición de SCG-Fe y Mel-Fe aumentó en menor medida las cantidades de Fe en las hojas de lechuga (28 y 30%, respectivamente). Lo que se muestra en la **Figura 75a** corrobora lo anterior: la eficiencia de utilización de EDDHA-Fe fue la más alta, seguida de la muestra Mel-Fe. La eficiencia de utilización del SCG-Fe fue muy baja, incluso obteniendo valores más bajos que las melanoidinas sin funcionalizar. Este hecho significa que la cantidad de Fe suministrada por los SCG-Fe fue alta (**Tabla 36**), pero la lechuga absorbió muy poca cantidad. Este hecho podría explicarse debido a que los iones Fe podrían estar unidos a moléculas incrustadas en la masa sólida de SCG y, por lo tanto, para estar disponibles, deben separarse de la masa sólida o degradarse, lo que necesitaría más tiempo. En el caso de melanoidinas o quelatos comerciales, los iones Fe son parte de moléculas solubles. Morikawa y

Saigusa (2008) obtuvieron una concentración final de 100 mg kg<sup>-1</sup> en materia seca en rábano después de la adición de residuos de café "compostados" con sales de Fe. La biofortificación con SCG-Fe generó lechugas con 0.857 mg de Fe por 100 g de materia fresca, lo que corresponde a 137 mg kg<sup>-1</sup> en materia seca. Esta cantidad es mayor que la obtenida por los autores citados, aunque el compost de residuos de café contenía 10 veces más Fe que el bioquelato SCG-Fe. Este hecho podría explicarse de la siguiente manera: los iones Fe del compost de café están aún más incrustados dentro de la masa sólida.

**Tabla 37.** Contenidos de Fe y Zn en lechugas (peso fresco). Las diferencias significativas son indicadas por distintas letras en la misma columna ( $p < 0.05$ ).

Muestra	Fe (mg/100g)	Zn (mg/100g)	Peso fresco (g)
NPK	0.669 ± 0.190 <sup>a</sup>	0.094 ± 0.005 <sup>a</sup>	35.3 ± 0.7 <sup>c</sup>
SCG	0.795 ± 0.276 <sup>a</sup>	0.106 ± 0.015 <sup>a</sup>	29.0 ± 1.7 <sup>a</sup>
Mel	0.765 ± 0.040 <sup>a</sup>	0.095 ± 0.008 <sup>a</sup>	34.2 ± 0.5 <sup>bc</sup>
SCG-Fe	0.857 ± 0.089 <sup>a</sup>	nd	30.4 ± 0.7 <sup>ab</sup>
SCG-Zn	nd	0.485 ± 0.030 <sup>c</sup>	29.0 ± 0.2 <sup>a</sup>
Mel-Fe	0.868 ± 0.358 <sup>a</sup>	nd	35.6 ± 1.9 <sup>c</sup>
Mel-Zn	nd	0.260 ± 0.010 <sup>b</sup>	32.3 ± 1.6 <sup>abc</sup>
EDDHA-Fe	1.085 ± 0.025 <sup>a</sup>	nd	35.4 ± 1.9 <sup>c</sup>
EDTA-Zn	nd	0.560 ± 0.014 <sup>d</sup>	32.0 ± 2.2 <sup>abc</sup>

SCG: posos de café; Mel: melanoidinas; nd: no determinado



**Figura 75.** A y C: eficiencia de utilización de Fe y Zn de los bioquelatos y quelatos en lechuga. B y D: eficiencia de reserva de Fe y Zn disponibles de los bioquelatos y quelatos en el suelo. SCG, posos de café; Mel, melanoidinas.

Específicamente para las lechugas, algunos autores han estudiado la biofortificación con diferentes quelatos comerciales sintéticos (Giordano et al., 2019; Kozik et al., 2011; Tiksiniski y Komosa, 2008). En estos trabajos, las lechugas biofortificadas tenían un contenido de aproximadamente 80-400 mg kg<sup>-1</sup> de materia seca, pudiendo afectar a la composición mineral por el genotipo de lechuga (Giordano et al., 2019). Los valores de Fe obtenidos en este trabajo fueron similares. Por lo tanto, expresando los datos de la **Tabla 37** en materia seca: 137.8 mg kg<sup>-1</sup> en SCG-Fe, 127.3 mg kg<sup>-1</sup> en Mel-Fe y 177.5 mg kg<sup>-1</sup> en

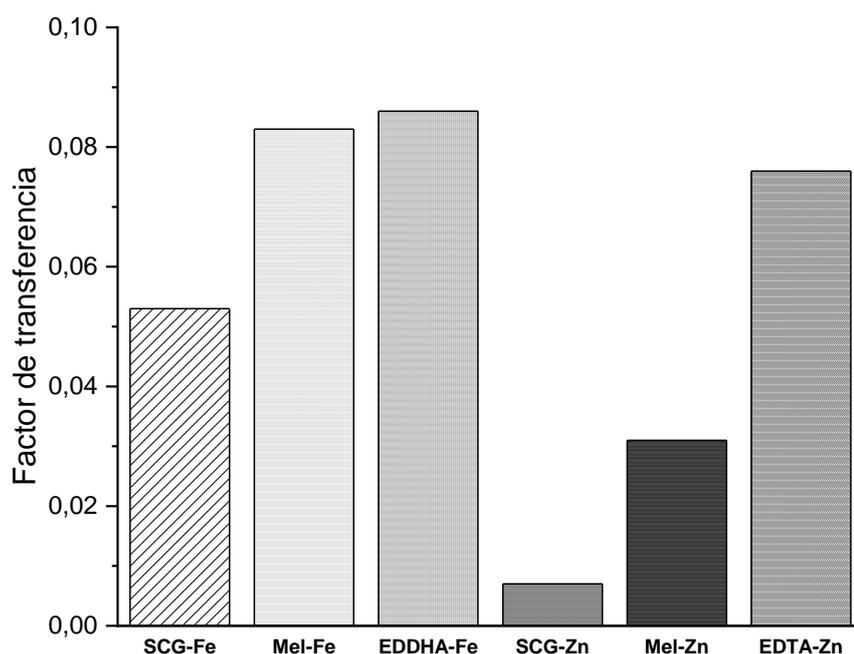
EDDHA-Fe. Los valores máximos de 400 mg kg<sup>-1</sup> en materia seca obtenidos por Kozik et al. (2011) corresponden a la adición de aproximadamente 200 ppm de hierro (10 veces más que en nuestro ensayo) generando una reducción significativa del rendimiento de lechuga. La adición de altas cantidades de Fe en forma de quelatos comerciales también podría provocar síntomas de exceso de hierro, que se manifiesta en forma de clorosis y manchas necróticas marrones (Tiksinski y Komosa, 2007).

En el caso de los suelos, la adición de SCG-Fe aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) el Fe disponible en el suelo, seguido de EDDHA-Fe y Mel-Fe (**Tabla 38**). La adición de SCG-Fe aumentó en un 78% el contenido de Fe en el suelo, sin embargo, su eficiencia de reserva disponible fue menor que al adicionar EDDHA-Fe (**Figura 75b**), por la misma razón que en el caso de la planta; la adición de SCG-Fe suministra la doble cantidad de Fe que el quelato comercial, sin embargo, este hierro parece estar menos disponible o extraíble por la planta. Este hecho es consistente con los valores del factor de transferencia (**Figura 76**). El SCG-Fe fue el tratamiento con el factor de transferencia más bajo, pero la adición de Mel-Fe logró valores de factor de transferencia muy cercanos al EDDHA-Fe. El hecho de que las melanoidinas funcionalizadas con Fe presenten factores de alta transferencia son muy notables en suelos calcáreos, donde el Fe normalmente está bloqueado (Navarro y Navarro, 2013). Del mismo modo, Morikawa y Saigusa (2008) también aumentaron el Fe extraíble en un suelo calcáreo mediante la adición de compost de residuos de café funcionalizados con hierro.

**Tabla 38.** Fe y Zn asimilable, pH y conductividad eléctrica (CE<sub>25</sub>) en suelo. Las diferencias significativas son indicadas por distintas letras en la misma columna ( $p < 0.05$ ).

Muestra	Fe asimilable (ppm)	Zn asimilable (ppm)	pH	CE <sub>25</sub> (dS/m)
Suelo nativo*	6.86	1.35	8.2	1.3
NPK	6.695 ± 0.404 <sup>a</sup>	1.256 ± 0.056 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.774 ± 0.147 <sup>a</sup>
SCG	6.716 ± 0.176 <sup>a</sup>	1.247 ± 0.044 <sup>a</sup>	7.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.666 ± 0.109 <sup>a</sup>
Mel	7.066 ± 0.057 <sup>b</sup>	1.301 ± 0.095 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.831 ± 0.072 <sup>a</sup>
SCG-Fe	12.231 ± 0.180 <sup>d</sup>	nd	8.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.868 ± 0.048 <sup>a</sup>
SCG-Zn	nd	49.003 ± 1.681 <sup>c</sup>	7.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.067 ± 0.086 <sup>a</sup>
Mel-Fe	9.258 ± 0.570 <sup>c</sup>	nd	8.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.721 ± 0.100 <sup>a</sup>
Mel-Zn	nd	6.699 ± 0.859 <sup>b</sup>	8.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.708 ± 0.009 <sup>a</sup>
EDDHA-Fe	11.117 ± 0.313 <sup>e</sup>	nd	8.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.816 ± 0.088 <sup>a</sup>
EDTA-Zn	nd	5.872 ± 0.237 <sup>b</sup>	8.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.843 ± 0.359 <sup>a</sup>

\*muestra de suelo previa al ensayo; SCG: posos de café; Mel: melanoidinas; CE<sub>25</sub>: conductividad eléctrica medida a 25°C; nd: no determinado.



**Figura 76.** Valores del factor de transferencia (concentración total en planta / concentración extraída del suelo) de bioquelatos y quelatos comerciales. SCG, posos de café; Mel, melanoidinas.

#### 4.9.4. Efectos de los bioquelatos en el contenido de Zn en el sistema suelo-planta

Los niveles de Zn en las lechugas oscilaron entre 0.094-0.560 mg 100g<sup>-1</sup>, siendo estadísticamente más altos ( $p < 0.05$ ) en las lechugas cultivadas con EDTA-Zn (**Tabla 37**). Los bioquelatos SCG-Zn y Mel-Zn también aumentaron las cantidades de este micronutriente en hojas de lechuga significativamente, un 416% y 177%, respectivamente, actuando como agentes biofortificantes. A pesar de los grandes aumentos logrados con los quelatos y bioquelatos comerciales, el umbral de los valores totales de Zn en las hojas establecidos por Alloway (2008) (150-200 mg kg<sup>-1</sup> de materia seca en especies de plantas sensibles), nunca se excedió. En este ensayo, los valores alcanzados en las hojas de lechuga expresadas en mg de micronutrientes por kg de materia seca fueron 63 para SCG-Zn, 48 para Mel-Zn y 93 para DTPA-Zn. Kozik et al. (2009) encontraron que la aplicación de 10 mg kg<sup>-1</sup> de Zn en forma de Zn (II) DEDTA + Zn (II) DTPA en un suelo calcáreo puede aumentar el Zn en las hojas de lechuga hasta aproximadamente 63 mg kg<sup>-1</sup> de materia seca. Sin embargo, Mohammí y Khoshgoftarmanesh (2019) en hojas de lechuga emplean quelatos de zinc-amino sintetizados (Zn-arginina, Zn glicina y Zn-glutamina), que generaron lechugas con 100 mg de Zn kg<sup>-1</sup> de materia seca. Este resultado es bastante interesante porque corrobora el hecho de que los aminoácidos podrían actuar como agentes quelantes. Esto también podría explicar por qué los SCG actúan como buenos agentes biofortificantes, ya que tienen aminoácidos en su composición, como ya se mencionó.

La eficiencia de utilización de los quelatos de Zn refleja un comportamiento similar al del Fe (**Figura 75 a y c**). Los SCG-Zn fue el quelato con la eficiencia de utilización más baja (0.30%), lo que podría explicarse de la misma manera que para el Fe. Por el contrario, el EDTA-Zn fue el quelato que tuvo una mayor eficiencia de utilización alcanzando el valor de 3.70%. La eficiencia de las melanoidinas es intermedia (1.27%). Zhao et al. (2019) también

utilizaron EDTA-Zn ( $4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) para enriquecer el trigo (siendo este cultivo el más utilizado en ensayos de biofortificación) y obtuvieron valores de eficiencia de utilización de aproximadamente el 2%. Almendros et al. (2013) encontraron que la adición de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de Zn-EDTA tenían una eficiencia de utilización del 2.58% en el cultivo de lino. Sin embargo, en otro estudio realizado por los mismos autores con cebolla, la adición de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de Zn-EDTA tuvo una eficiencia de utilización del 0.2%. Estos autores también declararon que esta tasa depende del quelato aplicado, la tasa de aplicación y el suelo analizado. Además, según Broadley et al. (2007), las concentraciones de Zn en los tejidos en diferentes especies de plantas pueden diferir considerablemente cuando se cultivan en condiciones comparables.

Como se indicó anteriormente, la adición de SCG-Zn proporcionó  $89.61 \text{ mg kg}^{-1}$  al suelo y, por lo tanto, fue el bioquelato que aumentó en mayor medida el Zn disponible en los suelos con respecto a las muestras control, alcanzando el valor de 49 ppm de Zn extraíble (**Tabla 38**). Además, este bioquelato aumentó 7 veces y 10 veces el Zn biodisponible obtenido con la adición de Mel-Zn y EDTA-Zn, respectivamente (**Tabla 38**). Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados de la eficiencia de reserva disponible de Zn en el suelo (**Figura 75d**), Mel-Zn fue el bioquelato con una mayor eficiencia de reserva disponible, es decir, en relación con la cantidad agregada, es el bioquelato que deja más reserva disponible de Zn cuando se agrega al suelo. Este parámetro podría ganar importancia en cosechas sucesivas. Una mejor tasa de eficiencia sería encontrada en plantas pertenecientes al segundo o tercer cultivo. Es la primera vez que se calcula este parámetro, por lo tanto, no es posible comparar nuestros datos con los obtenidos por otros estudios.

El factor de transferencia para Zn (**Figura 76**) siguió este orden: EDTA-Zn (0.076) > Mel-Zn (0.031) > SCG-Zn (0.007). Almendros et al. (2013) y (2015) también calcularon el factor de transferencia para diferentes quelatos sintéticos comerciales y complejos orgánicos naturales de Zn. Estos autores reportaron

valores de factores de transferencia de aproximadamente 1.8 para 10 mg kg<sup>-1</sup> de EDTA-Zn en cultivo de lino (Almendros et al., 2013) y factores de transferencia de aproximadamente 0.15 para 10 mg kg<sup>-1</sup> de EDTA-Zn en cebolla (Almendros et al., 2015), los cuales fueron mayores que los obtenidos en nuestro ensayo.

#### **4.9.5. Efectos de los bioquelatos en otras propiedades del sistema suelo-planta**

El pH del suelo fue analizado (**Tabla 38**) debido a la gran influencia de este parámetro fisicoquímico en la movilización de microelementos (Navarro y Navarro, 2013). Ningún tratamiento influyó significativamente en el pH, debido a la capacidad de amortiguación del suelo de Vega. Por lo tanto, el aumento de Fe y Zn en las lechugas debido a la adición de bioquelatos y quelatos no estuvo relacionado con el pH.

En cuanto al efecto de los diferentes tratamientos en la CE<sub>25</sub>, no hubo grandes cambios en esa propiedad, a pesar de la alta CE<sub>25</sub> de los SCG (4.5 dS m<sup>-1</sup>, **Tabla 6**). Todos los tratamientos aumentaron la salinidad de las muestras con respecto al suelo nativo (**Tabla 38**), sin embargo, entre los diferentes tratamientos no hubo diferencias significativas ( $p < 0.005$ ). Según los datos de Grattan y Grieve (1999), la salinidad del suelo no aumenta la absorción de nutrientes, sino todo lo contrario. Por lo tanto, el aumento de Fe y Zn en lechugas no pudo atribuirse a la salinidad del suelo.

Según Storksdieck y Harrel (2007), la biofortificación no debe determinar la biomasa del cultivo. En este sentido, no hubo grandes diferencias entre los tratamientos (**Tabla 38**). El peso fresco de las hojas de lechuga osciló entre 29.0 y 35.6 g, siendo estadísticamente mayor ( $p < 0.05$ ) en las lechugas cultivadas con Mel-Fe. La adición de SCG, en cualquier forma, no provocó una inhibición importante en la planta, logrando pesos de aproximadamente 30 g (**Tabla 37**). Este hecho es un punto positivo y novedoso de esta investigación, ya que nos

permite utilizar un residuo fresco, que siempre ha generado una inhibición del crecimiento de las plantas cuando se adicionó sin ninguna transformación (como compost, mezcla con fertilizantes inorgánicos, pirolisis, etc.) (Cruz y Cordovil, 2015; Hardgrove y Livesley, 2016; Yamane et al., 2014). Por lo tanto, podemos afirmar que la utilización de bio-residuos en pequeñas cantidades acompañadas de un fertilizante inorgánico, podría ser una alternativa para estimular la nutrición mineral de las plantas y no generar problemas de toxicidad en los cultivos.

#### **4.9.6. Implicaciones nutricionales del consumo de lechugas biofortificadas**

La ingesta diaria de Fe y Zn se calculó como el aporte de las lechugas (biofortificadas o no) teniendo en cuenta la cantidad de lechuga por ración y su consumo diario (Mercasa, 2020). Así, la ingesta de lechugas se refirió al tamaño de ración habitual en España (Salvador i Castells, 2000).

Como se indicó anteriormente, el uso de diferentes subproductos del café podría incrementar significativamente los niveles de Fe y Zn en lechugas (**Tabla 37**). Por tanto, podría ser posible calcular la contribución del consumo de lechuga a la ingesta diaria de Fe y Zn en la dieta española (**Tabla 39**). Por un lado, la ingesta media de lechuga en España es de 1.74 kg / habitante / año (Mercasa, 2020) lo que supone una ingesta diaria de 4.77g. Con tal ingesta, se alcanzan contribuciones muy bajas de la ingesta dietética recomendada de ambos minerales (del 0.05 al 0.65%) ya que la ingesta podría llegar a 0.005 mg Zn / día (**Tabla 39**). Sin embargo, el panorama es completamente diferente si se hace una estimación más realista utilizando la contribución del consumo de una porción de lechuga (150 g; Salvador i Castells, 2000). Con respecto al Fe, una porción de lechuga proporcionaría 1.004 mg Fe para lechugas normales cultivadas con NPK (**Tabla 39**). Sin embargo, estos niveles aumentarían hasta

1.286 o 1.302 mg Fe / porción si se usaran bioquelatos derivados de subproductos del café (SCG-Fe y Mel-Fe) para cultivar lechugas. Así, la contribución a la ingesta dietética de referencia (IDR) de Fe aumentaría desde el 12.55% (para lechugas regulares) hasta el 16.26% para aquellas lechugas cultivadas con el bioquelato orgánico Mel-Fe (Instituto de Medicina, 2005). Estos datos podrían ser muy importantes teniendo en cuenta la prevalencia de anemia ferropénica (24.8%) en la población mundial (OMS, 2008).

**Tabla 39.** Contribución del consume de lechuga a la ingestiga diaria de Fe y Zn en la dieta Española.

<i>Muestra</i>	<b>Elemento mineral</b>	<b>Ingesta diaria<sup>1</sup></b> (mg/day)	<b>IDRs<sup>2</sup></b> (%)	<b>Ingesta de ración<sup>3</sup></b> (mg/ración)	<b>IDRs<sup>2</sup></b> (%)
<i>NPK</i>	<i>Fe</i>	0.032	0.40	1.004	12.55
	<i>Zn</i>	0.005	0.05	0.141	1.28
<i>SCG</i>	<i>Fe</i>	0.038	0.48	1.193	14.91
	<i>Zn</i>	0.005	0.05	0.159	1.45
<i>SCG-Fe</i>	<i>Fe</i>	0.041	0.51	1.286	16.08
<i>SCG-Zn</i>	<i>Zn</i>	0.023	0.21	0.728	6.62
<i>Mel</i>	<i>Fe</i>	0.037	0.46	1.148	14.35
	<i>Zn</i>	0.005	0.05	0.143	1.30
<i>Mel-Fe</i>	<i>Fe</i>	0.041	0.51	1.302	16.28
<i>Mel-Zn</i>	<i>Zn</i>	0.012	0.11	0.390	3.55
<i>EDDHA-Fe</i>	<i>Fe</i>	0.052	0.65	1.628	20.35
<i>EDTA-Zn</i>	<i>Zn</i>	0.027	0.25	0.840	7.27

<sup>1</sup>Considerando el consumo de lechuga durante un año.

<sup>2</sup>Ingestas Dietéticas de Referencia (IDRs) para un hombre adulto (19-50 años) por día.

<sup>3</sup>Considerando la ración completa ingerida un día en particular

Finalmente, en el caso del Zn, la contribución de la ingesta de lechuga a los niveles diarios de Zn es menor que los del Fe, aunque no deben subestimarse. Por ejemplo, el consumo de una porción regular de lechuga (cultivada con fertilización NPK) significa una ingesta de 0.141 mg de Zn, lo que contribuye a un 1.28% de la IDR. Sin embargo, si se consume una lechuga biofortificada con Mel-Zn, el aporte a la IDR aumenta hasta un 3.55% (0.390 mg Zn) e incluso un 6.62% (0.728 mg Zn) en el caso de una lechuga

biofortificada con SCG-Zn (**Tabla 39**). Estos son resultados importantes ya que los bajos niveles de ingesta de Zn son un componente del hambre oculta relacionada con una mayor frecuencia de infecciones agudas y diarrea (Brown et al., 2004).

#### **4.9.7. Consideraciones finales**

En general, los quelatos comerciales EDDHA-Fe y EDTA-Zn lograron mejores tasas de evaluación (eficiencia de utilización, eficiencia de reserva disponible y factor de transferencia). Sin embargo, desde el punto de vista de la eficiencia, los bioquelatos de melanoidinas se acercaban más a los quelatos comerciales que los bioquelatos de SCG. Este hecho podría explicarse de la siguiente manera: cuando el zinc y el hierro se suministran en forma de quelatos comerciales o cuando las melanoidinas se funcionalizan, estos compuestos son solubles y su posibilidad de movilización inmediata es mayor. En el caso de los bioquelatos de SCG, los iones Fe y Zn podrían unirse a moléculas incrustadas en la masa sólida de SCG y, por lo tanto, para estar disponibles, deben degradarse para que la planta los asimile. No obstante, este hecho podría tener un punto positivo: el bioquelato derivado de SCG podría actuar como una reserva a medio y largo plazo de hierro o zinc para garantizar el suministro a cultivos posteriores. Además, los SCG son un bio-residuo generado en la preparación de la bebida del café (Murthy y Naidu, 2012), por lo tanto, su reutilización es económica, mientras que las melanoidinas son un residuo sólido difícil de manejar debido a su baja densidad y hábito escamoso y, además, su obtención es muy laboriosa (extracción, preconcentración, filtración, diafiltración y secado por atomización) y costoso. Los quelatos comerciales también presentan problemas de toxicidad y equilibrio de nutrientes en las plantas (Mohammadi y Khoshgoftarmanesh, 2014), como se indicó anteriormente. Además, como se ha comentado en los capítulos anteriores, los

SCG afectan positivamente a las propiedades físicas del suelo, químicas y fisicoquímicas y biológicas, lo que hace de este residuo una buena elección para su uso en fines agrícolas.

## **4.10. SÍNTESIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.10.1. Los posos de café como residuos y sus productos de transformación**

Los posos de café son unos residuos que proceden de una semilla rica en carbohidratos, lípidos, proteínas y ácido clorogénico. Posteriormente, durante el tostado de la semilla de café es dónde tienen lugar una serie de reacciones, las cuales son los responsables de la generación de compuestos oscuros, denominados melanoidinas. El grano tostado es finalmente molido y sometido a una hidrólisis suave. El residuo sólido resultante mantiene la composición del grano tostado, aunque se concentra en proteínas debido a la extracción de otros compuestos durante la preparación de la bebida del café. Esta composición ha sido muy estudiada por muchos autores y se sigue investigando en este tema, lo que se pone de manifiesto en los últimos trabajos de McNutt y He (2019) y Battista et al. (2020).

Más específicamente, es su composición destaca el alto contenido en C, lo que hace que los SCG sean interesantes desde el punto de vista agronómico. Como hemos visto en otros capítulos de la presente memoria, el C de los SCG es un C fundamentalmente lábil, destacando su alto contenido en materia volátil (85%) y C soluble (26%) y bajo contenido en C fijado (14%). Los SCG contienen cantidades moderadas de N y P, siendo significativo su contenido en N soluble. Destaca su alto contenido en K (3000 mg/kg). En cuanto a los microelementos, resaltan los contenidos significativos en Cu y Fe. Como consecuencia de los grupos funcionales característicos de los SCG, éstos poseen un pH relativamente bajo para los suelos de la región y una conductividad eléctrica relativamente alta. Como aspectos negativos, los SCG poseen un contenido alto en compuestos fenólicos totales y se caracterizan por ser materiales muy repelentes al agua, dotando al suelo de hidrofobicidad. Un componente importante de los SCG, son las melanoidinas, extensamente

estudiadas por Rufián-Henares y Pastoriza (2015). Las melanoidinas son compuestos de alto peso molecular, de estructura poco definida, con un gran número de grupos funcionales. Esto convierte a las melanoidinas en uno de los componentes de los SCG con una gran perspectiva para el uso agronómico como se verá en apartados posteriores. Sin embargo, estos compuestos son difíciles de obtener, tanto a nivel de estructuras, tiempo y a nivel económico. Una buena línea de investigación sería buscar métodos de obtención a nivel industrial de las melanoidinas.

Esta composición presenta una doble cara. Una cara positiva desde el punto de vista agronómico debido a su alto contenido en C, proteínas y azúcares. Y, por otro lado, un aspecto negativo debido a su composición en compuestos tóxicos como lo demuestran los trabajos de Cruz y Cordovil (2015) y Hardgrove y Livesley (2016). La corrección de estos problemas de toxicidad conlleva un tratamiento posterior de los SCG como mencionaremos en los párrafos siguientes. En la bibliografía hay varias propuestas para la reutilización de estos residuos, como la gasificación, pirolisis, carbonización hidrotermal (Alves et al., 2017). Uno de sus usos más estudiados es el uso agronómico debido a su elevado contenido en C, al estímulo de actividad biológica que puedan generar en el suelo y a la pobreza de C que tienen los mismos. También los contenidos en N, P, K potencian esta opción. No obstante, su carácter fitotóxico limita en gran medida sus posibilidades como fertilizante orgánico. La combinación de sus potenciales y limitaciones promueven el tratamiento posterior de este producto para, sin eliminar sus beneficios, corregir en gran medida sus limitaciones. En la bibliografía (Alves et al., 2017; Vardon et al., 2013), se han propuesto fundamentalmente los siguientes procesos de transformación: compostaje, vermicompostaje, pirolisis, carbonización hidrotermal y desengrasado.

El compostaje tradicional en pila estática y el vermicompostaje de los SCG han sido profundamente estudiados por Liu y Price (2011) y González-

Moreno et al. (2020). El compostaje tradicional genera un producto de mayor madurez, una C/N más baja (siempre en un rango óptimo de  $< 25:1$ ). Pero en nuestros ensayos los SCG no han alcanzado una madurez suficiente y se ha observado que siguen teniendo limitaciones en cuanto al crecimiento vegetal. A su vez este producto tiene un  $CE_{25}$  alta (22 dS/m). El vermicompostaje genera productos más maduros y se ha comprobado que no generan toxicidad y hasta una cantidad el 25% generan un vermicompost de calidad. Sin embargo, es un procedimiento costoso cuya elaboración lleva meses. En este trabajo hemos visto que el vermicompost de SCG es rico en N, pudiendo actuar como abono nitrogenado, eliminando completamente la toxicidad propia de los SCG.

La pirolisis o carbonización en atmósfera pobre en oxígeno, es un procedimiento muy estudiado ya que genera subproductos de alto valor añadido como el biogás y un producto sólido carbonoso conocido como biochar. En esta memoria se han ensayado dos tipos de biochar, uno a 270°C y otro a 400°C. Comparativamente, el biochar a 270°C, debido a su temperatura de carbonización menor, tiene niveles más bajos de C y N, mayor contenido en materia volátil y menor contenido en C fijado que el biochar a 400°C.

La carbonización hidrotermal o transformación en medio acuoso a alta temperatura y presión ha sido menos estudiada en el caso de los SCG, aunque se pueden citar los trabajos Afolabi et al. (2020) y Kim et al. (2017). La HTC se orienta fundamentalmente a la extracción de azúcares, concretamente manooligosacáridos, y de surfactantes, como productos de alto valor añadido (Pérez-Burillo et al., 2019). Los productos sólidos resultantes de la HTC se conocen como hidrochar y sus características depende de la temperatura de carbonización de temperatura y empleada. En la bibliografía (Xiao et al., 2012) se utilizan rangos de temperatura entre 180 y 250°C, aunque en el trabajo de Pérez-Burillo et al. (2019) se describe la temperatura de 185°C es clave en la transformación de los productos. En esta memoria se han empleado tres tipos de hidrochar: a 160, 180 y 200°C. Los hidrochars empleados tienen un alto

contenido en polifenoles lo que les hace ser aún más tóxicos que los SCG desde el punto de vista agronómico. No obstante, presentan un pH más ácido, una menor  $CE_{25}$  que los SCG y unas formas de C aún más lábiles (C soluble en agua), lo que hacen que estimulen aún más la actividad biológica que los propios SCG.

También en la bibliografía se han utilizado los SCG para la obtención de grasa y se ha estudiado la generación de biochar a partir de los SCG desengrasados (Vardon et al., 2013). En nuestro caso, los SCG desengrasados tienen un comportamiento muy similar a los productos de origen bien sean los SCG o los biochar. Aunque no se ha descrito en la bibliografía, también se han ensayado productos derivados de los SCG por lavado, bien con agua caliente o etanol. Estos productos no han demostrado una mejora sustancial de este residuo desde el punto de vista agronómico ya que no eliminan la toxicidad, que era el objetivo de estos tratamientos.

#### **4.10.2. Los efectos de los SCG y sus productos derivados sobre el suelo. Influencia del tipo de suelo**

El objetivo de este trabajo es el empleo de los SCG para su uso agronómico como enmienda orgánica de suelos. Este objetivo se ha enfocado, en primer lugar, considerando los SCG como un residuo orgánico habitual, es decir, como una turba, compost de residuos vegetales, estiércol, etc. Posteriormente, debido a sus limitaciones y a alguna de sus efectos que comentaremos más adelante, se ha intentado emplear desde otra perspectiva, la cual describiremos en siguientes apartados.

El primer efecto, obvio, de los SCG es el aumento significativo de C que genera en el suelo. En este sentido no difiere de otros residuos. Hemos encontrado aumentos de hasta un 340% con respecto a la muestra control cuando se añadía un 10% de SCG al suelo. Este aumento siempre ha sido

proporcional a las cantidades añadidas. Desde el punto de vista edáfico y ambiental, este efecto ya constituye una ventaja, por el secuestro de C en el suelo que supone. Debido a la degradabilidad de los SCG, el C evoluciona con el tiempo de incubación, sin embargo, a los tiempos ensayados y con las cantidades añadidas, siguen dejando mucho C remanente en el suelo. En esta memoria se ha visto que incrementan en mayor medida las fracciones más lábiles de la materia orgánica del suelo.

Como efectos muy significativos de la adición de SCG podemos citar su influencia sobre las propiedades físicas del suelo. Se ha encontrado una disminución de la DA, aumento de la capacidad de retención de agua, principalmente la retenida a menor potencial, lo que genera un efecto levemente adverso que es la disminución del agua utilizable por las plantas. También se ha encontrado una modificación intensa de la forma y el tamaño de los agregados. Los SCG tienen una tendencia muy fuerte a la interacción con las partículas minerales del suelo, principalmente con las arcillas, lo que se ha observado con las imágenes SEM. Esta interacción conduce hacia un aumento del tamaño de los agregados y lo más importante a una estabilización de los mismos. Podría ser ésta la influencia más destacable desde el punto de vista de las propiedades físicas de los SCG. Igualmente se observa que los agregados tienden a redondearse, lo que tiene un efecto inmediato en la macroporosidad del suelo. Las propiedades físicas de los propios SCG conducen a un aumento destacado de la hidrofobicidad en todos sus aspectos. Este efecto que *a priori* puede ser considerado negativo, resulta ser contradictorio porque, efectivamente, impide la humectación del suelo, pero es quien contribuye más a la estabilidad de la estructura.

Los efectos más estudiados han sido sobre las propiedades químicas ya éstos son muy evidentes. Este aspecto ha sido estudiado en la bibliografía. Podemos citar los trabajos de Cruz y Cordovil (2015) y Yamane et al. (2014). En esta memoria se ha visto que la adición de SCG disminuyen el pH en los

primeros instantes de la adición ya que presentan un pH muy diferente al de los suelos Mediterráneos carbonatados, ya que estos tienen un pH de 8.2. Este resultado podría tener una perspectiva muy positiva desde el punto de vista agronómico porque permitiría una mayor movilización de los micronutrientes (Navarro y Navarro, 2013), pero las condiciones de los suelos Mediterráneos con un alto contenido en carbonatos, hace que, en un corto periodo de tiempo, el pH evolucione hacia valores similares a los naturales del suelo. También se ha observado un incremento de la conductividad eléctrica, pero incluso en las dosis más altas (15%), no alcanzan valores de riesgo en cuanto a salinización. De la misma manera que ocurre con el pH, estos incrementos de la CE se van mitigando con la evolución del tiempo. Aunque ya se ha mencionado en el apartado anterior, la adición de SCG incrementa los contenidos de K, P, N, siendo muy destacable los valores de K. En cuanto a micronutrientes se han observado incrementos significativos de los Fe, Zn y Cu asimilables. Claramente se incrementa la fertilidad química del suelo. No obstante, este incremento no se refleja en el crecimiento de las plantas, ya que dominan los efectos fitotóxicos, que comentaremos posteriormente. Por un efecto de dilución, la adición de SCG disminuye los contenidos de carbonato cálcico en el suelo, lo que es positivo para una agricultura soportada sobre suelos carbonatados, como es el caso de la agricultura Mediterránea.

Una importante acción de los SCG como enmienda orgánica de suelos es el incremento de la actividad biológica, tanto bacteriana como fúngica, la cual se ha puesto de manifiesto por el estudio de distintos parámetros y también se ha observado mediante SEM, lo que confirma claramente estos efectos. Globalmente la adición de SCG incrementa significativamente la respiración del suelo, demostrada mediante distintas pruebas de forma continua o discontinua. Uno de los ensayos que a este respecto no deja lugar a dudas es su incremento neto de la actividad deshidrogenasa. Mediante estudios de ADN se ha demostrado que no solamente se altera el número de bacterias en el suelo, sino

que se modifican sustancialmente las poblaciones bacterianas. Mediante estos estudios se ha comprobado que aumentan las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, las bacterias degradadoras de fenoles (dada la composición de los SCG) y las bacterias degradadoras de petróleo. Así mismo, se han encontrado una densificación de las redes de interacción bacteriana. Las fotografías de SEM corroboran de manera inequívoca el crecimiento de la actividad fúngica sobre las partículas de SCG. Hongos que muchos de ellos se encontraban en fase de formación de esporas. La actividad fúngica tiene un efecto indirecto de fijación de C inorgánico, lo que también es favorable desde el punto de vista medioambiental. En algunos ensayos, cuando se ha fijado el suelo para evitar la destrucción de las bacterias por los haces de electrones, también se ha observado un incremento muy elevado de la actividad bacteriana. No se han determinado las especies, pero se han observado cocos y bacilos.

Todos los efectos mencionados en el suelo se han observado también para los bio-productos derivados y se ha observado que son similares. No obstante, se requeriría de mayor investigación al respecto ya que los cambios en la composición deben de modificar dichos efectos en el suelo, aunque no de una manera muy significativa. Sobre todo, habría que investigar sobre el efecto en las propiedades físicas ya que se tienen muy pocos datos de los bio-productos.

En alguno de los ensayos se ha trabajado con dos suelos agrícolas contrastados, típicos del Mediterráneo, principalmente en contenido en carbonatos, con sus consecuencias fundamentalmente en el pH y en la mineralogía de las distintas fracciones del suelo. En general, la tendencia en los efectos de los SCG es muy similar. Las diferentes propiedades iniciales de los suelos modifican las tendencias, pero de una forma leve. Lo más destacado es que la interacción de las partículas de suelo, fundamentalmente, la arcilla con los SCG está muy relacionada con la naturaleza mineral de las partículas. Así, las arcillas de tipo 2:1, fundamentalmente esmectitas, tienen una mayor interacción con las

partículas de los SCG, lo que hace que la intensidad de los efectos sea mucho mayor en el caso de suelos ricos en estas fases minerales. En la bibliografía, los efectos de los SCG se han estudiado en muy pocos tipos de suelos y en algunos casos, se han estudiado con turbas. Este es uno de los puntos que requieren un mayor esfuerzo en la búsqueda de nuevo conocimiento sobre los efectos de los SCG en el suelo. Habría que ensayar fundamentalmente suelos de naturaleza granulométrica muy diferente y de composiciones mineralógicas muy contrastadas. En esta memoria se ha visto que, en cuanto a los elementos nutrientes del suelo y las propiedades físicas del mismo, el suelo de Vega mostró mejores valores que el suelo Rojo. En este mismo sentido, los SCG aumentaron la riqueza de las especies microbianas en mayor medida en el suelo de Vega con respecto al suelo Rojo.

#### **4.10.3. Los efectos de los SCG y sus productos transformados sobre las plantas de cultivo y consecuencias nutricionales**

Se ha demostrado que la adición de SCG tiene un efecto limitante en el crecimiento de las lechugas, manifestándose en una pérdida porcentual de peso de aproximadamente un 75%. La fitotoxicidad de los SCG se manifiesta desde concentraciones muy bajas (desde 1%) y se ha comprobado que no existe un umbral máximo para esta fitotoxicidad, ya que, a partir de cantidades muy bajas, la planta disminuye de tamaño. La bibliografía es contradictoria con respecto al efecto de los SCG sobre el crecimiento de las plantas. El grupo de Cruz et al. (2015) no encontraron limitación de crecimiento en las plantas. Sin embargo, hay otros que sí la encuentran y lo atribuyen principalmente a dos causas: 1) fitotoxicidad propia de algunos componentes de los SCG como son los polifenoles (Hardgrove y Livesley, 2016); 2) otros autores la atribuyen a la competencia por el N con los microorganismos del suelo (Cruz y Cordovil,

2015). Los SCG, por su alto contenido en C lábil, son transformados por los microorganismos del suelo, inmovilizando el N disponible para las plantas. En uno de los ensayos de la presente memoria se ha comprobado que dicha limitación por la inmovilización del N es solamente parcial, ya que la adición de cantidades crecientes de N en formas altamente asimilables (nitratos y amonio) sólo corrige, en parte, la falta de crecimiento en la planta. Por tanto, se trata principalmente una limitación por toxicidad. Los distintos tratamientos aplicados a los SCG para eliminar la toxicidad no son efectivos salvo el vermicompostaje, mediante el cual estos compuestos fitotóxicos desaparecen. Otros tratamientos como la HTC, incrementa los compuestos polifenólicos en el hidrochar, generando un bio-residuo aún más fitotóxico. La pirolisis para la generación de biochar no resuelve totalmente el problema, ya que la pirolisis a baja temperatura (270°C), descrita en la bibliografía como el límite en el que desaparecen dichos compuestos (Comino et al., 2020), no resulta eficaz en su eliminación. En el caso del biochar a 400°C, se ha comprobado que la fitotoxicidad se ha eliminado en gran medida. No obstante, dichos biochar siguen manteniendo algún tipo de limitación ya que el peso fresco de las lechugas con esta enmienda no llega a alcanzar los datos de la muestra control. Los SCG desengrasados y lavados con agua o etanol, tampoco son eficaces para la eliminación de los polifenoles, incluso en el caso de los últimos, los polifenoles se incrementan.

Se comprueba que la adición de SCG y de sus productos derivados limitantes al crecimiento (hidrochar a distintas temperaturas, biochar a 270°C, desengrasados y lavados), supone un incremento significativo del contenido en nutrientes en planta, principalmente micronutrientes. Este hecho se produce a todas las concentraciones ensayadas y abre una vía interesante en la investigación de los SCG y productos derivados en su empleo agronómico, como podría ser el empleo de estos bio-materiales para la generación de plantas biofortificadas en nutrientes. En un ensayo con cantidades muy bajas, cercanas

a la toxicidad, pero sin llegar a la misma, se ha comprobado que la combinación de SCG y productos derivados con una cantidad estándar de abonos inorgánicos (NPK) constituye una posible vía en el empleo de estos productos. Las lechugas obtenidas contienen cantidades significativamente mayores de Fe, Cu y Zn que las lechugas sólo cultivadas con fertilizante inorgánico. Nutrientes que están considerados importantes en la nutrición humana y de los que hay descritas numerosas deficiencias a nivel mundial (Kumar et al., 2019).

Un paso más allá en esa línea es la generación de bio-enmiendas derivadas de los SCG y sus bio-productos derivados, funcionalizados con dichos micronutrientes. Además de los SCG y derivados, también se funcionalizaron las melanoidinas, debido a su capacidad quelante. Se podría denominar a estos nuevos fertilizantes como *bioquelatos*. La comparación de estos bioquelatos con los quelatos comerciales de Fe y Zn ha demostrado que su eficacia es menor, pero presentan ventajas que no son desdeñables. Al tratarse de productos ricos en C, mejoran otras propiedades del suelo, como se ha demostrado anteriormente en otros ensayos. Paralelamente generan un incremento en la planta de estos nutrientes significativamente mayor que en el caso de los controles y, lo más importante, crea una reserva en el suelo de estos micronutrientes para posteriores fases de cultivo. La fijación de estos elementos en estos materiales orgánicos impediría su lavado, lo que no ocurre con el caso de los quelatos comerciales, frenando de esta manera un grave problema medioambiental por la posibilidad de contaminación de los acuíferos. Además, se trata de productos que permitirían una reutilización de un material cuyo empleo agronómico presentan grandes limitaciones a pesar de su beneficio para el suelo.

La ingesta de alimentos es la principal vía para la adquisición por parte de los organismos de los elementos necesarios para el metabolismo. Se han descrito numerosas deficiencias en vitaminas y elementos minerales nutrientes (Kumar et al., 2019). Hay dos vías fundamentales de corregir estas deficiencias:

la fortificación de alimentos mediante la adición directa de los nutrientes deficitarios (von Grebner et al., 2014). Otra, la más eficaz, tal como se describe en la bibliografía es la biofortificación (Cakmak et al., 2018). A su vez, la biofortificación tiene dos modalidades: la denominada biofortificación genética que consiste en modificar genéticamente las plantas para que asimilen preferencialmente alguno de los nutrientes. Otra es la denominada biofortificación agronómica que es la más asequible en los países en desarrollo, que consiste en emplear los abonos que movilizan los elementos nutrientes para que de esta manera aumenten su contenido en la planta. Tal y como se ha indicado en los apartados anteriores, el sólo empleo de los SCG y algunos de sus productos derivados tienen ya un efecto biofortificador. No obstante, la funcionalización de dichos bio-productos mediante su mezcla con sales minerales es tecnológicamente sencilla y económica, produce un abono bioinorgánico (bioquelato) que en algunos casos consigue valores de contenido en planta muy similares a los de los quelatos comerciales. Una forma de evaluar la efectividad de estos productos es calcular cuánto contribuyen a la ingesta dietética de referencia para un determinado elemento. Por ejemplo, en el caso del Fe, se ha comprobado que la contribución de la ingesta dietética de referencia aumenta un 4% en las lechugas cultivadas con el bioquelato melanoidina-Fe, con respecto a las lechugas cultivadas sólo con NPK.

#### **4.10.4. Consecuencias ambientales del empleo de los SCG y sus productos derivados como enmiendas orgánicas**

Uno de los problemas principales a los que se enfrenta la sociedad es la degradación de suelos cuya causa fundamental es la pérdida de materia orgánica. La dualidad inorgánico-orgánico que tienen los suelos es la que diferencia de los materiales orgánicos puros y materiales inorgánicos puros y es la que le confiere la mayoría de sus propiedades. Otro de los problemas ambientales a

los que se enfrenta la humanidad es el aumento en la atmósfera de gases con efecto invernadero. Otros problemas medioambientales son la pérdida de biodiversidad y de agua en la litosfera, así como la contaminación por movilización de elementos, debido a la alteración de los ciclos biogeoquímicos. Otro problema, ya no ambiental, es la generación de alimentos para una población creciente. Estos graves problemas pueden parecer que no tienen un nexo común, sin embargo, todos convergen en la pérdida de la calidad del suelo. Entendiendo como calidad del suelo la capacidad de un suelo para funcionar dentro de los límites del ecosistema y el uso de la tierra para mantener la productividad biológica, mantener la calidad ambiental y promover la salud de las plantas y los animales (Bünemann et al., 2018).

Una primera cuestión es si los SCG y sus derivados incorporan en mayor o menor medida C al suelo. En varios experimentos se ha medido la generación de CO<sub>2</sub> a la atmósfera cuando estos productos son degradados en el suelo. Esto podría contemplarse como una navaja de doble filo. Porque, por un lado, incrementan los gases de efecto invernadero, pero también parte del C que se añade al suelo con esos residuos se incorpora al suelo. Estos bio-residuos en un vertedero tienden a convertirse totalmente en CO<sub>2</sub> sin transformarse en el suelo (Murthy y Madhava Naidu, 2012).

El problema de la actividad biológica del suelo tampoco es menor. Una de las grandes reservas de biodiversidad está en los suelos (Cameron et al., 2018). Por tanto, el incremento de la actividad biológica del suelo incide en este aspecto (incremento de la biodiversidad).

Hemos comprobado por otra parte, que los SCG tienen capacidad quelante y secuestrante de elementos tóxicos (Kim et al., 2014). Pero este bloqueo de elementos no es permanente, sino que muchos de estos elementos pueden llegar a ser disponibles para las plantas lo que supone una ventaja desde el punto de vista vegetal.

En conjunto, la adición de los SCG y sus productos derivados supone un incremento de la calidad del suelo que se manifiesta en muchas propiedades que son las que se utilizan para evaluar la calidad. Ya que, para evaluar la calidad del suelo han sido usados tradicionalmente indicadores físicos, químicos y biológicos, los cuales son propiedades del suelo medibles que afectan a la capacidad de éste de ejercer una de sus funciones (Bastida et al. 2008).

#### **4.10.5. Recomendaciones sobre el uso de los SCG y sus productos derivados como enmienda orgánica**

El empleo directo de los SCG frescos como enmienda orgánica no es recomendable. Sólo sería factible como indican Cruz et al. (2015) hacerle un compostaje directo en suelo para su transformación. Esto se debe, en parte, a que su contenido en formas lábiles de C, estimulan la actividad biológica y compiten por el N con las raíces, pero se debe sobre todo a su efecto fitotóxico por la presencia en ellos de compuestos fitotóxicos.

Hay varias opciones para su transformación. La vía del compostaje-vermicompostaje, la cual genera productos directamente utilizables como enmienda orgánica, sobre todo el vermicompostaje, aunque presentan algunos inconvenientes como la alta salinidad y tampoco se puede olvidar que su obtención requiere de tiempo y recursos económicos.

La pirolisis es una vía con ciertos atractivos por la generación de biocombustibles. El producto sólido, el biochar, mantiene algunas propiedades negativas como es la hidrofobicidad y a ciertas temperaturas pierda la fitotoxicidad. Esta línea de transformación requiere de un aparataje específico que esté adaptado al gran nivel de producción. No es una opción fácil para un agricultura o pequeña explotación.

La carbonización hidrotermal es otra vía para la obtención de productos de alto valor añadido y de un residuo de segunda generación (al igual que el

biochar), que es el hidrochar. Sobre los hidrochars, se puede comentar algo muy parecido a lo indicado para los SCG frescos. Son productos que presentan aún más contenido en moléculas transformables por los microorganismos y un mayor contenido en polifenoles que los convierte en productos con mayor capacidad fitotóxica. La obtención de estos productos es altamente costosa en tiempo y energía y no está al alcance de agricultores y pequeñas empresas, ya que es un proceso industrial que necesita de un alto grado de control.

El uso directo de los SCG y de algunos de sus bio-productos derivados, puede estar mejor orientado si tenemos en cuenta su capacidad movilizadora de elementos nutrientes en el suelo y se combina con paliativos para sus efectos fitotóxicos. También, la funcionalización de estos productos con micronutrientes para generar, lo que hemos denominado en el texto bioquelatos, asociados a abonos inorgánicos convencionales, es la opción que finalmente consideramos más viables para el uso de estos productos. No obstante, se requiere de una mayor investigación al respecto y esto constituye una línea futura de trabajo dentro de este campo.



## **5. CONCLUSIONES**



1. Los SCG presentan un alto contenido en C, pero bioquímicamente son heterogéneos. Contienen moléculas recalcitrantes, tipo lignina, junto con moléculas muy transformables como son las proteínas. No obstante, su rasgo más destacado es la presencia melanoidinas, lo que tiene consecuencias fundamentales en su uso como enmienda orgánica, dada su fitotoxicidad.
2. Los SCG se incorporan a la matriz inorgánica de los suelos e interaccionan fundamentalmente con las partículas de arcilla, por lo que, dependiendo de la naturaleza mineralógica de las mismas, dicho grado de incorporación variará entre distintos tipos de suelo.
3. Los SCG tienen efectos sobre las propiedades físicas del suelo: aumentan la porosidad, disminuyen la densidad aparente, modifican la forma y el tamaño de los agregados, aumentan la capacidad de retención de agua, disminuyen el agua utilizable por las plantas y aumentan la estabilidad estructural.
4. Un efecto importante de los SCG es la modificación de las propiedades relacionadas con la hidrofobicidad del suelo: aumento del ángulo de contacto y el tiempo de penetración de la gota de agua.
5. La adición de SCG mejora la fertilidad química del suelo, incrementando los contenidos en macronutrientes N, P y K y en micronutrientes Cu, Fe y Zn. Disminuye el pH del suelo y aumenta la salinidad del mismo. Con respecto al contenido en carbonatos, disminuyen su contenido en el suelo por dilución.
6. Los SCG incrementan el contenido de CO en el suelo proporcionalmente a las cantidades añadidas. Mejoran los niveles de todas las fracciones de la materia orgánica del suelo (ácidos húmicos, fúlvicos, carbono extraíble total), incrementando en mayor medida las fracciones más lábiles.
7. Los SCG modifican las poblaciones microbianas del suelo. Acrecentaron la abundancia de bacterias degradadoras de ácidos fenólicos y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Los SCG incrementaron la complejidad de las redes de interacción microbiana, así como la diversidad bacteriana.

8. La tendencia del efecto de los SCG en los dos tipos de suelos ensayados (Suelo de Vega y suelo Rojo) es muy similar. Si bien, la intensidad de los efectos fue mayor en el suelo de Vega, que en el suelo Rojo. El suelo de Vega presentó mejores valores en cuanto a las propiedades físicas, químicas y biológicas cuando los SCG fueron añadidos al suelo.
9. Los SCG limitaron el crecimiento de las plantas de lechuga. El efecto fitotóxico se produce cuando los SCG se adicionan en dosis muy bajas (1%) y las dosis más altas ensayadas (15%) no incrementan dicho efecto.
10. Respecto a la hipótesis de que las limitaciones al crecimiento vegetal que tiene los SCG se deben a la competencia de los microorganismos del suelo por el N, se ha comprobado que, de forma general, la adición de fertilizantes nitrogenados inorgánicos no elimina totalmente la fitotoxicidad de los SCG, la cual debe ser atribuida fundamentalmente a la presencia de compuestos polifenólicos.
11. Los SCG incrementaron el grado de mineralización de la planta. Así, los SCG aumentan los contenidos en planta de elementos con importancia nutricional como el V, Fe, Co, Mn y Zn. Este incremento de elementos nutrientes en la planta se relaciona con la presencia en los SCG de polifenoles, melanoidinas, carbohidratos, que tienen un carácter quelante y movilizan dichos elementos en el suelo.
12. Los SCG tienen varias posibilidades de transformación para su reutilización. Destacan: a) El compostaje y vermicompostaje. Son productos madurados en lo que se refiere a su relación C/N y en el caso del vermicompost, con altos contenidos en N. b) Pirolisis a distintas temperaturas. Generan un producto sólido, biochar, cuyas características dependen de la temperatura. También rico en C, hidrofóbico y menos tóxico que los SCG. c) Carbonización hidrotermal. A partir de ella se obtiene un producto sólido conocido como hidrochar, enriquecido en productos hidrolizables y en compuestos fitotóxicos, con respecto a los SCG. Algunos de los efectos de los SCG sobre las

propiedades de suelo han sido también estudiadas para los bio-productos derivados y se ha visto que el sentido del efecto es similar, aunque la intensidad varía de unos bio-productos a otros.

13. La capacidad para la biofortificación agronómica de los SCG puede incrementarse mediante la funcionalización de los mismos por mezcla con sales minerales. Podríamos denominar a estos productos funcionalizados como bioquelatos. La comparación de los efectos en planta y suelo de los bioquelatos de Fe y Zn con los quelatos comerciales correspondientes, demuestra que su efecto en planta es de menor intensidad. No obstante, incrementan significativamente los contenidos de Fe y Zn en la planta y generan un nivel de estos elementos de manera asimilable, a modo de reserva, en el suelo, con mayor cuantía que los quelatos comerciales.

14. Los SCG tienen importantes repercusiones en la nutrición humana al incrementar el contenido de elementos esenciales en alimentos vegetales. Los SCG incrementan en mayor medida el Fe en las lechugas, lo que se ha visto que es de una gran relevancia debido a los datos de anemia ferropénica a nivel mundial.

15. Los SCG, debido a su alto contenido en moléculas transformables, son fácilmente descompuestos por los microorganismos, liberando CO<sub>2</sub> a la atmósfera. Sin embargo, con respecto a la cantidad de C añadida con la adición de SCG, éstos dejan más de un 85% de C en el suelo.

16. Debido al efecto fitotóxico de los SCG, la vía más recomendable para su utilización es la generación de lo que hemos denominado bioquelatos: la adición de SCG en pequeñas cantidades combinado con un fertilizante inorgánico convencional y suplementado con micronutrientes.



# CONCLUSIONS

1. SCG have a high C content but are biochemically heterogeneous. They contain recalcitrant molecules, lignin type, together with highly transformable molecules such as proteins. However, its most prominent feature is the presence of melanoidins, which has fundamental consequences in its use as an organic amendment, given its phytotoxicity.
2. SCG are incorporated into the inorganic matrix of soils and fundamentally interact with clay particles, therefore, depending on their mineralogical nature, said degree of incorporation will vary between different types of soil.
3. SCG have effects on the physical properties of the soil: they increase the porosity, decrease the apparent density, modify the shape and size of the aggregates, increase the water retention capacity, decrease the available water by the plants and increase the structural stability.
4. An important effect of SCG is the modification of the properties related to the soil hydrophobicity: increase of the contact angle and the water drop penetration time.
5. The addition of SCG improves the soil chemical fertility, increasing the content of macronutrients N, P and K and micronutrients Cu, Fe and Zn. It lowers the soil pH and increases its salinity. With respect to the carbonate content, their content in the soil decreases by dilution.
6. SCG increase the CO content in the soil in proportion to the amounts added. They improve the levels of all fractions of soil organic matter (humic acids, fulvic acids, total extractable carbon), increasing the most labile fractions to a greater extent.
7. SCG modify soil microbial populations. They increase the abundance of phenolic acid degrading bacteria and plant growth promoting bacteria. SCG increased the complexity of microbial interaction networks, as well as bacterial diversity.

8. The trend of the effect of the SCG in the two types of soils tested (Vega soil and Red soil) is very similar. However, the intensity of the effects was greater in the Vega soil than in the Red soil. The Vega soil presented better values in terms of physical, chemical, and biological properties when the SCG were added to the soil.

9. SCG limited the growth of lettuce plants. The phytotoxic effect occurs when SCGs are added in very low doses (1%) and the highest doses tested (15%) do not increase said effect.

10. Regarding the hypothesis that SCG limitations to plant growth are due to the competition of soil microorganisms for N, it has been found that, in general, the addition of inorganic nitrogen fertilizers does not totally eliminate the phytotoxicity of SCG, which must be attributed mainly to the presence of polyphenolic compounds.

11. The SCG increased the degree of mineralization of the plant. Thus, SCG increase the plant content of elements with nutritional importance such as V, Fe, Co, Mn and Zn. This increase in nutrient elements in the plant is related to the presence in the SCG of polyphenols, melanoidins, carbohydrates, which have a chelating character and mobilize these elements in the soil.

12. SCG have various transformation possibilities for reuse. The following stand out: a) Composting and vermicomposting. They are matured products with regard to their C / N ratio and in the case of vermicompost, with high N content. b) Pyrolysis at different temperatures. They generate a solid product, biochar, whose characteristics depend on the temperature. Also rich in C, hydrophobic and less toxic than SCG. c) Hydrothermal carbonization. From it, a solid product known as hydrochar is obtained, enriched in hydrolyzable products and phytotoxic compounds, with respect to SCG. Some of the effects of SCG on soil properties have also been studied for derived bio-products and it has been seen that the effect of the effect is similar, although the intensity varies from one bio-product to another.

13. The agronomic biofortification capacity of SCG can be increased by functionalizing them by mixing with mineral salts. We could call these functionalized products as *biochelates*. Comparison of the effects on the plant and soil of the Fe and Zn biochelates with the corresponding commercial chelates shows that their effect on the plant is less intense. However, they significantly increase the Fe and Zn contents in the plant and generate a level of these elements in an assimilable way, as a reserve, in the soil, with a higher quantity than commercial chelates.
14. SCG have important repercussions on human nutrition by increasing the content of essential elements in plant foods. SCG increase Fe in lettuce to a greater extent, which has been seen to be highly relevant due to global iron deficiency anemia data.
15. SCG, due to their high content of transformable molecules, are easily decomposed by microorganisms, releasing CO<sub>2</sub> into the atmosphere. However, with respect to the amount of C added with the addition of SCG, these leave more than 85% of C in the soil.
16. Due to the phytotoxic effect of SCG, the most recommended route for their use is the generation of what we have called biochelates: the addition of SCG in small amounts combined with a conventional inorganic fertilizer supplemented with micronutrients.



## **6. BIBLIOGRAFÍA**



- Abera K., Manahiloh K.N., MotalledNejad M., 2017. The effectiveness of global thresholding techniques in segmenting two-phase porous media. *Constr. Build. Mater.* 142, 256-267.
- Acevedo, E., Carrasco, M., León, O., Silva, P., Castillo, G., Ahumada, I., Borie, G., González, S., 2005. Informe de criterios de calidad de suelo agrícola. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile, pp. 205.
- Adi, A.J., Noor, Z.M., 2009. Bioresource Technology Waste recycling: Utilization of coffee grounds and kitchen waste in vermicomposting. *Bioresour. Technol.* 100, 1027–1030.
- Adriano, D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments. New York (NY). Springer.
- Aguilar, F., Autrup, H., Barlow, S., Castle, L., Crebelli, R., Dekant, W., Engel, K.-H., Gontard, N., Gott, D., Grilli, S., Gürtler, R., Larsen, J.-C., Leclercq, C., Leblanc, J.-C., Malcata, F.-X., Mennes, W., Milana, M.-R., Pratt, I., Rietjens, I., Tobback, P., Toldrá F., 2008. Safety of aluminium from dietary intake Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC). *EFSA J.* 754, 1-34.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J., 2006. Measuring detoxification and maturity in compost made from “alperujo”, the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere* 64, 470–477.
- Alidadi, H., Najafpoor, A.A., Hosseinzadeh, A., Dolatabadi Takabi, M., Esmaili, H., Zanganeh, J., Piranloo, F.G., 2016. Waste recycling by vermicomposting: Maturity and quality assessment via dehydrogenase enzyme activity, lignin, water soluble carbon, nitrogen, phosphorous and other indicators. *J. Environ. Manage.* 182, 134–140.
- Alloway, B.J., 2008. Zinc in soils and crop nutrition. International Zinc Association. Brussels, Belgium.

- Alloway, B.J., 2009. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environ. Geochem. Health* 31, 537–548.
- Almendros, P., Gonzalez, D., Alvarez, J.M., 2013. Long-term bioavailability effects of synthesized zinc chelates fertilizers on the yield and quality of a flax (*Linum usitatissimum* L.) crop. *Plant Soil* 368, 251–265.
- Almendros, P., Obrador, A., Gonzalez, D., Alvarez, J.M., 2015. Biofortification of zinc in onions (*Allium cepa* L.) and soil Zn status by the application of different organic Zn complexes. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 186, 254–265.
- Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P., Casal, S., 2011. Coffee authenticity. In: Oliveira, M.B.P.P., Mafra, I., Amaral, J.S. (Eds.), *Current Topics on Food Authentication*. Transworld Research Network, Kerala, India.
- Alves, R.C., Rodrigues, F., Nunes, M.A., Vinha, A.F., Oliveira, M.P.P.P., 2017. State of the Art in Coffee Processing By-Products. In: Galanakis, C.M. (Ed.), *Handbook of Coffee Processing By-products: Sustainable Applications*. Academic Press, pp. 1– 22.
- Ameloot, N., De Neve, S., Jegajeevagan, K., Yildiz, G., Buchan, D., Funkuin, Y.N., Prins, W., Bouckaert, L., Sleutel, S., 2013. Short-term CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions and microbial properties of biochar amended sandy loam soils. *Soil Biol. Biochem.* 57, 401–410.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.025>
- Ames, J. M., Bailey, R. G., Mann, J., 1999. Analysis of furanone, pyranone, and new heterocyclic coloured compounds from sugar-glycine model Maillard systems. *J. Agric. Food Chem.* 47, 438–443.
- An, B.H., Jeong, H., Kim, J.-H., Park, S., Jeong, J.H., Kim, M.J., Chang, M., 2019. Estrogen receptor-mediated transcriptional activities of spent coffee grounds and spent coffee grounds compost, and their phenolic acid constituents. *J. Agric. Food Chem.* 67, 8649–8659.

- Anderson, J.P.E., 1982. Soil respiration, in: A.L. Page, R.H. Miller, D.R. Keeney (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2*, second ed., Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, pp. 831-871.
- Aranda V., Calero J., Plaza I., Ontiveros-Ortega A., 2016. Long-term effects of olive mill pomace co-compost on wettability and soil quality in olive groves. *Geoderma* 267, 185-195.
- Aranyos J.T., Tomócsik A., Makádi M., Mészáros J., Blaskó L., 2016. Changes in physical properties of sandy soil after long-term compost treatment. *Int. Agrophys.* 30, 269-274.
- Arshad, M.A., Coen, G.M., 1992. Characterization of soil quality: Physical and chemical criteria. *Am. J. Altern. Agric.* 7, 25–31.
- Atabani, A.E., Al-Muhtaseb, A.H., Kumar, G., Saratale, G.D., Aslam, M., Khan, H.A., Said, Z., Mahmoud, E., 2019. Valorization of spent coffee grounds into biofuels and value-added products: Pathway towards integrated bio-refinery. *Fuel* 254, 115640.
- Bachmann, J., Guggenberger, G., Baumgartl, T., Ellerbrock, R.H., Urbanek, E., Goebel, M.O., Kaiser, K., Horn, R., Fischer, W.R., 2008. Physical carbon-sequestration mechanisms under special consideration of soil wettability. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 171, 14–26.
- Baldock, J.A., Skjemstad, J.O., 2000. Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. *Organic Geochemistry*, 31, 697–710. *Org. Geochem.* 31, 697–710.
- Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I., 2014. Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food Bioproc. Technol.* 7 (12), 3493–3503.
- Bargmann, I., Martens, R., Rillig, M.C., Kruse, A., Kücke, M., 2014a. Hydrochar amendment promotes microbial immobilization of mineral nitrogen. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 177, 59–67.

- Bargmann, I., Rillig, M.C., Kruse, A., Greef, J.M., Kücke, M., 2014b. Effects of hydrochar application on the dynamics of soluble nitrogen in soils and on plant availability. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 177, 48–58.
- Barreto, S.M., Lopez, M.V., Levin, L., 2007. Effect of culture parameters on the production of the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake) in tropical weathers. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1361.
- Baslam, M., Morales, F., Garmendia, I., Goicoeche, N., 2013. Nutritional quality of outer and inner leaves of green and red pigmented lettuces (*Lactuca sativa* L.) consumed as salads. *Sci. Hortic-Amsterdam* 151, 103–111.
- Bastida, F., Torres, I.F., Hernández, T., García, C., 2017. The impacts of organic amendments: do they confer stability against drought on the soil microbial community? *Soil. Biol. Biochem.* 113, 173–183.
- Battista, F., Barampouti, E.M., Mai, S., Bolzonella, D., Malamis, D., Moustakas, K., Loizidou, M., 2020. Added-value molecules recovery and biofuels production from spent coffee grounds. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 131, 110007.
- Belay, A., Bekele, Y., Abraha, A., Comen, D., Kim, H.K., Hwang, Y.H., 2014. Discrimination of defective (Full Black, Full Sour and Immature) and nondefective coffee beans by their physical properties. *J. Food Process Eng.* 37, 524–532.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., 2009. Coffee, tea, cocoa. In H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle (Eds.), *Food Chemistry* (4th ed., pp. 938–951). Leipzig: Springer.
- Bera, T., Inglett, K.S., Inglett, P.W., Vardanyan, L., Wilkie, A.C., O'Connor, G.A., Reddy, K.R., 2021. Comparing first- and second-generation bioethanol by-products from sugarcane: Impact on soil carbon and nitrogen dynamics. *Geoderma* 384, 114818.

- Bindschedlet, S., Cailleau, G., Verrecchia, E., 2016. Role of fungi in the biomineralization of calcite. *Minerals*, 6, 41.
- Bisdom, E.B.A., Dekker, L.W., Schoute, J.F.T., 1993. Water repellency of sieve fractions from sandy soils and relationships with organic material and soil structure. *Geoderma* 56, 105-118.
- Boardman, J., 2006. Soil erosion science: reflections on the limitations of current approaches. *Catena* 68, 73–86.
- Bok, J.P., et al., 2012. Fast pyrolysis of coffee grounds: characteristics of product yields and biocrude oil quality. *Energy* 47, 17–24.
- Boldrin, A., Andersen, J., Moller, J., Christensen, T., 2009. Composting and compost utilization: accounting of greenhouse gases and global warming contributions. *Waste Manage Res.* 27, 800-812.
- Borrelli, R.C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., Fogliano, V., 2004. Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. *J. Agr. Food Chem.* 52 (5), 1338–1343.
- Bouat, A., Crouzet, C., 1965. Notes techniques sur un appareil semiautomatique de clorage l'azote et des certains composés volatiles. *Annals of Agriculture* 16, 107–118.
- Bradbury, N.J., Whitmore, A.P., Hart, P.B.S., Jenkinson, D.S., 1993. Modelling the fate of nitrogen in crop and soil in the years following application of <sup>15</sup>N-labeled fertilizer to winter wheat. *J. Agric. Sci.* 121, 363–379.
- Brady, N.C., Weil, R.R., 2002. *The Nature and Properties of Soils*. New Jersey (NJ). Prentice Hall.
- Bravo, J., Juárez, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L.W., De Peña, M.P., Cid, C., 2012. Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. *J. Agr. Food Chem.* 60 (51), 12565–12573.
- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A., 2007. Zinc in plants: Tansley review. *New Phytol.* 173, 677–702.

- Bronick, C.J., Lal, R., 2005. Soil structure and management: A review. *Geoderma* 124, 3–22.
- Brown, K.H., Rivera, J.A., Bhutta, Z., Gibson, R.S., King, J.C., Lönnnerdal, B., Ruel, M.T., Sandtröm, B., Wasantwisut, E., Hotz, C., 2004. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) Technical Document no. 1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull.* 25, S94–S203.
- Bullock, C. H., Collier, M. J., Convery, F., 2012. Peatlands, their economic value and priorities for their future management - The example of Ireland. *Land Use Policy* 29(4), 921–928.
- Bünemann, E. K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E., De Deyn, G., de Goede, R., Fleskens, L., Geissen, V., Kuyper, T. W., Mäder, P., Pulleman, M. M., Sukkel, W., van Groenigen, J. W., Brussaard, L., 2018. Soil quality – A critical review. *Soil Biol. Biochem.* 120, 105–125.
- Burrows, L.A., Edwards, C.A., 2004. The use of integrated soil microcosms to assess the impact of carbendazim on soil ecosystems. (Special issue: Terrestrial Model Ecosystems). *Ecotoxicology* 13, 143–161.
- Cakmak, I., Kutman, U.B., 2018. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. *Eur. J. Soil Sci.* 69, 172–180.
- Calero J., Delgado R., Delgado G., Martín-García J.M., 2009. SEM image analysis in the study of a soil chronosequence on fluvial terraces of the middle Guadalquivir (southern Spain). *Eur. J. Soil Sci.* 60, 465-480.
- Calero, J., Martín-García, J.M., Delgado, G., Aranda, V., Delgado, R., 2013. A nano-scale study in a soil chrono sequence from southern Spain. *Eur. J. Soil Sci.* 64, 192–209.
- Caliskan, S., Ozok, N., Makineci, E., 2020. Utilization of Spent Coffee Grounds as Media for Stone Pine (*Pinus pinea*) Seedlings. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 20, 2014–2024.

- Cameron, E.K., Martins, I.S., Lavelle, P., Mathieu, J., Tedersoo, L., Gottschall, F., Guerra, C.A., Hines, J., Patoine, G., Siebert, J., Winter, M., Cesarz, S., Delgado-Baquerizo, M., Ferlian, O., Fierer, N., Kreft, H., Lovejoy, T.E., Montanarella, L., Orgiazzi, A., Pereira, H.M., Phillips, H.R.P., Settele, J., Wall, D.H., Eisenhauer, N., 2018. Global gaps in soil biodiversity data. *Nat. Ecol. Evol.* 2, 1042–1043.
- Campos-Vega, R., Loarca-Pina, G., Vergara-Castaneda, H.A., Oomah, B.D., 2015. Spent coffee grounds: a review on current research and future prospects. *Trends Food Sci. Technol.* 45 (1), 24–36.
- Cao, L., Zhang, C., Chen, H., Tsang, D.C.W., Luo, G., Zhang, S., Chen, J., 2017. Hydrothermal liquefaction of agricultural and forestry wastes: state-of-the-art review and future prospects. *Bioresour. Technol.* 245, 1184–1193.
- Carbajal, A., Sánchez-Muniz, F., 2003. Nutrición y dietética. In *Nutricion y Dietetica* (pp. 1–130). Leon, España: Secretariado de publicaciones y medios audiovisuales. Universidad de León.
- Carter M.R., 2007. Long-term influence of compost on available water capacity of a fine sandy loam in a potato rotation. *Can. J. Soil Sci.* 87, 535–539.
- Carvalho, K.M., Gallardo-Williams, M.T., Benson, R.F., Martin, D.F., 2003. Effects of selenium supplementation on four agricultural crops. *J. Agric. Food Chem.* 51, 704–709.
- Casas, M.I., Vaughan, M.J., Bonello, P., McSpadden Gardener, B., Grotewold, E., Alonso, A.P., 2017. Identification of biochemical features of defective *Coffea arabica* L. beans. *Food Res. Int.* 95, 59–67.
- Casida, L.E., Klein, D., Santoro, T., 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science* 98, 371–376.
- Ceglie, F.G., Bustamante, M.A., Amara, M.B., Tittarelli, F., 2015. The challenge of peat substitution in organic seedling production: optimization of growing media formulation through mixture design and response surface analysis. *PLoS One* 10 (6), 1–14.

- Cerdá, A., Doerr, S.H., 2005. Influence of vegetation recovery on soil hydrology and erodibility following fire: an 11-year investigation. *Int. J. Wildland Fire* 14, 423–437.
- Chao, A., 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* 11, 265–270.
- Chatterjee, R., Sajjadi, B., Chen, W.Y., Mattern, D.L., Hammer, N., Raman, V., Dorris, A., 2020. Effect of Pyrolysis Temperature on PhysicoChemical Properties and Acoustic-Based Amination of Biochar for Efficient CO<sub>2</sub> Adsorption. *Front. Energy Res.* 8, 1–18.
- Chau, H.W., Biswas, A., Vujanovic, V., Si, B.C., 2014. Relationship between the severity, persistence of soil water repellency and the critical soil water content in water repelente soils. *Geoderma* 221–222, 113–120.
- Chen, Z. X., Zhang, H. M., Tu, X. S., Sun, X., Wang, J., Cheng, Y., Zhang, J.B., Cai, Z.C., Chang, S.X., 2021. Characteristics of organic material inputs affect soil microbial NO<sub>3</sub><sup>–</sup> immobilization rates calculated using different methods. *Eur. J. Soil Sci.* 72(1), 480–486.
- Cheng, Y., Wang, J., Wang, J., Chang, S. X., Wang, S., 2017. The quality and quantity of exogenous organic carbon input control microbial NO<sub>3</sub><sup>–</sup> immobilization: a meta-analysis. *Soil Biol. Biochem.* 115, 357–363.
- Chojnacka, K., Moustakas, K., Witek-Krowiak, A., 2020. Bio-based fertilizers: A practical approach towards circular economy. *Bioresour. Technol.* 295, 122223.
- Chrysargyris, A., Antoniou, O., Xylia, P., Petropoulos, S., Tzortzakis, N., 2020. The use of spent coffee grounds in growing media for the production of Brassica seedlings in nurseries. *Environ. Sci. Pollut. Res.*
- Ciesielczuk, T., Rosik-Dulewska, C., Poluszyńska, J., Sławińska, I., 2017. Acute toxicity of experimental fertilizers made of blood meal, spent coffee ground and biomass ash. *J. Water L. Dev.* 34, 95–102.

- COM/2014/398/EC. Comunicación de la comisión al parlamento europeo, al consejo, al comité económico y social europeo y al comité de las regiones. Hacia una economía circular: un programa de cero residuos para Europa.
- Comino, F., Aranda, V., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M.J., 2017. Thermal destruction of organic waste hydrophobicity for agricultural soils application. *J. Environ. Manage.* 202, 94–105.
- Comino, F., Cervera-Mata, A., Aranda, V., Martín-García, J.M., Delgado, G., 2020. Short-term impact of spent coffee grounds over soil organic matter composition and stability in two contrasted Mediterranean agricultural soils. *J. Soils Sediments* 20, 1182–1198.
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- Coria-Cayupán, Y.S., De Pinto, M.I.S., Nazareno, M.A., 2009. Variations in bioactive substance contents and crop yields of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in soils with different fertilization treatments. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10122–10129.
- Coulibaly, S.S., Edoukou, F.E., Kouassi, K.I., Barsan, N., Nedeff, V., Bi Zoro, I.A., 2018. Vermicompost utilization: A way to food security in rural area. *Heliyon* 4. e01104.
- Couto, R.M., Fernandes, J., Gomes da Silva, M.D.R., Simoes, P.C., 2009. Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds. *J Supercrit Fluids* 51, 159–66.
- Cruz, R., Baptista, P., Cunha, S., Pereira, J.A., Casal, S., 2012. Carotenoids of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown on soil enriched with spent coffee grounds. *Molecules* 17, 1535–47.
- Cruz, R., Gomes, T., Ferreira, A., Mendes, E., Baptista, P., Cunha, S., Pereira, J.A., Ramalhosa, E., Casal, S., 2014a. Antioxidant activity and bioactive compounds of lettuce improved by espresso coffee residues. *Food Chem.* 145, 95–101.

- Cruz, R., Mendes, E., Torrinha, Á., Morais, S., Pereira, J.A., Baptista, P., Casal, S., 2015. Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach. *Food Res. Int.* 73, 190–196.
- Cruz, R., Morais, S., Mendes, E., Pereira, J.a, Baptista, P., Casal, S., 2014b. Improvement of vegetables elemental quality by espresso coffee residues. *Food Chem.* 148, 294–299.
- Cruz, S., Cordovil, C.S.C., 2015. Espresso coffee residues as a nitrogen amendment for small-scale vegetable. *J. Sci. Food Agric.* 95, 3059–3066.
- Das, S.K., Ghosh, G.K., Avasthe, R.K., Sinha, K., 2021. Compositional heterogeneity of different biochar: Effect of pyrolysis temperature and feedstocks. *J. Environ. Manage.* 278, 111501.
- Dávila-Guzmán, N.E., de Jesús Cerino-Córdova, F., Soto-Regalado, E., Rangel-Mendez, J.R., Díaz-Flores, P.E., Garza-Gonzalez, M.T., Loredó-Medrano, J.A., 2013. Copper Biosorption by Spent Coffee Ground: Equilibrium, Kinetics, and Mechanism. *CLEAN - Soil, Air, Water* 41, 557–564.
- de Barros Sylvestre, T., Braos, L.B., Batistella Filho, F., Cruz, M.C.P. da, Ferreira, M.E., 2019. Mineral nitrogen fertilization effects on lettuce crop yield and nitrogen leaching. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 255, 153–160.
- de Blas, E., Rodríguez-Alleres, M., Almendros, G., 2010. Speciation of lipid and humic fractions in soils under pine and eucalyptus forest in northwest Spain and its effect on water repellency. *Geoderma* 155, 242–248.
- de Valença, A.W., Bake, A., Brouwer, I.D., Giller, K.E., 2017. Agronomic biofortification of crops to fight hidden hunger in sub-Saharan Africa. *Glob. Food Sec.* 12, 8–14.
- Defrieri, R.L., Sarti, G., Tortarolo, M.F., Escobar-Ortega, J., García de Salamone, I., D’Auria, F., Effron, D., 2011. Biochemical and microbiological properties of Argentinean Patagonia soil with implanted forest species. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 11 (3), 111-124.

- Dekker, L.W., Oostindie, K., Ritsema, C.J., 2005. Exponential increase of publications related to soil water repellency. *Soil Res.* 43(3), 403-441.
- Delca, E., Stere, I., 2013. Influence of chemical fertilizers and biofertilizers on the dynamics of some microbial groups (heterotrophic bacteria, free nitrogen-fixing bacteria) in chernozem soil of Dobrogea (Cumpana, Valulii Traian). *Rom. Agric. Res.* 30, 219-222.
- Delgado R., Sánchez-Marañón M., Martín-García J.M., Aranda V., Serrano-Bernardo F., Rosúa J.L., 2007. Impact of ski pistes on soil properties: A case study from a mountainous area in the Mediterranean region. *Soil Use Manag.* 23, 269-277.
- Delgado, G., Delgado, R., Párraga, J., Rivadeneyra, M.A., Aranda, V., 2008. Precipitation of Carbonates and Phosphates by Bacteria in Extract Solutions from a Semi-arid Saline Soil. Influence of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> Concentrations and Mg<sup>2+</sup> /Ca<sup>2+</sup> Molar Ratio in Biomineralization. *Geomicrobiol. J.* 25, 1–13.
- Delgado, R., Barahona, E., Huertas, F., Linares, J., 1982. Los Mollisoles de la Cuenca Alta del Río Dólar (Sierra Nevada). *Anales de Edafología y Agrobiología.* 41, 59–82.
- Delgado-Andrade, C., Navarro, M., López, H., López, M. C., 2003. Determination of total arsenic in levels by hydride generation atomic absorption spectrometry in foods from south-east Spain: estimation of daily dietary intake. *Food Addit. Contam.* 20, 923-932.
- Dexter A.R., 2004. Soil physical quality Part I. Theory, effects of soil texture, density, and organic matter, and effects on root growth. *Geoderma* 120, 201-214.
- Diacono M., Montemurro F., 2010. Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 401-422.
- Dieguez-Alonso, A., Funke, A., Anca-Couce, A., Rombolà, A.G., Ojeda, G., Bachmann, J., Behrendt, F., 2018. Towards biochar and hydrochar

engineering-influence of process conditions on surface physical and chemical properties, thermal stability, nutrient availability, toxicity and wettability. *Energies* 11.

Diehl, D., Schaumann, G.E., 2007. The nature of wetting on urban soil samples: wetting kinetics and evaporation assessed from sessile drop shape. *Hydrol. Process.* 21, 2255–2265.

Ding, J., Jiang, X., Ma, M., Zhou, B., Guan, D., Zhao, B., Zhou, J., Cao, F., Li, L., Li, J., 2016. Effect of 35 years inorganic fertilizer and manure amendment on structure of bacterial and archaeal communities in black soil of northeast China. *Appl. Soil Ecol.* 105, 187–195.

Doerr, S.H., Thomas, A.D., 2000. The role of soil moisture in controlling water repellency: new evidence from forest soils in Portugal. *J. Hydrol.* 231-232, 134-147.

Dominguez, J., Gomez-Brandon, M., 2012. Vermicomposting: composting with earthworms to recycle organic wastes. In: Kumar, S., Bharti, A. (Eds.), *Management of Organic Waste*. InTech Open Science, Rijeka, Croatia, pp. 29–48.

Dowd, S.E., 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 8, 125.

Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460-2461.

Edgar, R.C., 2013. UPARSE, Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10, 996-998.

Eibisch, N., Helfrich, M., Don, A., Mikutta, R., Kruse, A., Ellerbrock, R., Flessa, H., 2013. Properties and Degradability of Hydrothermal Carbonization Products. *J. Environ. Qual.* 42, 1565–1573. <https://doi.org/10.2134/jeq2013.02.0045>

- Ellerbrock, R.H., Gerke, H.H., Bachmann, J., Goebel, M.O., 2005. Composition of organic matter fractions for explaining wettability of three forest soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 57-66.
- EPA. Environmental Protection Agency. 2010. Inventory of US greenhouse gas emissions and sinks: 1998-2008. 15 April 2010. EPA 430-R-10-006. Washington (DC).
- Eshetu, B., 2013. Compost of Different Stability Affects the Molecular Composition and Mineralization of Soil Organic Matter. *Open J. Soil Sci.* 3, 58-69.
- Esmaelnejad L., Shorafa M., Gorji M., Hosseini S.M., 2016. Enhancement of physical and hydrological properties of a sandy loam soil via application of different biochar particle sizes during incubation period. *Span. J. Agric. Res.* 14
- Fadai N.T., Melrose J., Please C.P., Schulman A., Van Gorder R.A., 2017. A heat and mass transfer study of coffee bean roasting. *Int. J. Heat Mass Tran.* 104, 787-799.
- Famielec S., Kępka W., 2020. Possibilities of Applying the Gasification Process in Coffee Grounds Treatment. In: Wróbel M., Jewiarz M., Szlęk A. (eds) *Renewable Energy Sources: Engineering, Technology, Innovation.* Springer Proceedings in Energy. Springer, Cham.
- Ferrao, J.E.M., 2009. *O Cafe, A Bebida Negra Dos Sonhos Claros.* Chaves Ferreira-Publicacoes S. A, Lisboa, Portugal.
- Ferreira de Araújo A.S., Moura L., José de Melo W., dos Santos V.M., Fernando de Araujo F., 2016. Soil properties and cowpea yield after six years of consecutive amendment of composted tannery sludge. *Acta Sci-Agron.* 38, 407-413.
- Forge T., Kenney E., Hashimoto N., Neilsen D., Zebarth B., 2016. Compost and poultry manure as preplant soil amendments for red raspberry:

- Comparative effects on root lesion nematodes, soil quality and risk of nitrate leaching. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 223, 48-58.
- Franca, A.S., Oliveira, L.S., 2009. Coffee processing solid wastes: current uses and future perspectives. In: Ashworth, G.S., Azevedo, P. (Eds.), *Agricultural Wastes*. Nova Science Publishers, Inc, New York.
- Franca, A.S., Olivera, L.S., Mendonca, J.C.L., Silva, X.A.. 2005. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. *Food Chem.* 90, 89–94
- Gai, X., Wang, H., Liu, J., Zhai, L., Liu, S., Ren, T., Liu, H., 2014. Effects of feedstock and pyrolysis temperature on biochar adsorption of ammonium and nitrate. *PLoS One* 9, 1–19.
- Galvez, A., Sinicco, T., Cayuela, M.L., Mingorance, M.D., Fornasier, F., Mondini, C., 2012. Short term effects of bioenergy by-products on soil C and N dynamics, nutrient availability and biochemical properties. *Agric. Ecosyst. Environ.* 160, 3–14.
- Gao, Y., Lin, Q., Liu, H., Wu, H., Alamus, 2018. Water repellency as conditioned by physical and chemical parameters in grassland soil. *Catena* 160, 310–320.
- García-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., 2008. Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2137–2145.
- Gattinger, A., Muller, A., Haeni, M., Skinner, C., Fliessbach, A., Buchmann, N., Mäder, P., Stolze, M., Smith, P., Scialabba, N.E.H., Niggli, U., 2012. Enhanced top soil carbon stocks under organic farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 18226–18231.
- Ghani, A., Dexter, M., Perrott, K. W., 2003. Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilization, grazing and cultivation. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1231-1243.

- Giacometti, C., Demyanb, M.S., Cavania, L., Marzadonia, C., Ciavatta, C., Kandelerc, E., 2013. Chemical and microbiological soil quality indicators and their potential to differentiate fertilization regimes in temperate agroecosystems. *Appl. Soil Ecol.* 64, 32–48.
- Giordano, M., El-Nakhel, C., Pannico, A., Kyriacou, M.C., Stazi, S.R., De Pascale, S., Roupael, Y., 2019. Iron biofortification of red and green pigmented lettuce in closed soilless cultivation impacts crop performance and modulates mineral and bioactive composition. *Agronomy* 9.
- Goebel, M., Bachmann, J., Woche, S.K., Fischer, W.R., 2005. Soil wettability, aggregate stability, and the decomposition of soil organic matter. *Geoderma* 128, 80-93.
- Goebel, M.O., Bachmann, J., Reichstein, M., Janssens, I.A., Guggenberger, G., 2011. Soil water repellency and its implications for organic matter decomposition - is there a link to extreme climatic events? *Global Change Biology*, 17, 2640-2656.
- Gomes, T., Pereira, J.A., Ramalhosa, E., Casal, S., Baptista, P., 2013. Effect of fresh and composted spent coffee grounds on lettuce growth, photosynthetic pigments and mineral composition. In: 7th Congress of the Iberian Agronomic and Horticultural Science, Madrid.
- Gómez-Muñoz, B., Valero-Valenzuela, J.D., Hinojosa, M.B., García-Ruiz, R., 2016. Management of tree pruning residues to improve soil organic carbon in olive groves. *European Journal of Soil Biology* 74, 104-113.
- Gomiero, T., 2018. Food quality assessment in organic vs. conventional agricultural produce: Findings and issues. *Appl. Soil Ecol.* 123, 714–728.
- González-Moreno, M.A., García Gracianteparaluceta, B., Marcelino Sádaba, S., Zaratiegui Urdin, J., Robles Domínguez E., Pérez Ezcurdia, M.A., Seco Meneses, A., 2020. Feasibility of Vermicomposting of Spent Coffee Grounds and Silverskin from Coffee Industries: A Laboratory Study. *Agronomy* 10, 1–15.

- González-Peñaloza, F.A., Zavala, L.M., Jordán, A., Bellinfante, N., Bárcenas-Moreno, G., Mataix-Solera, J., Granged, A.J.P., Granja-Martins, F.M., Neto-Paixão, H.M., 2013. Water repellency as conditioned by particle size and drying in hydrophobized sand. *Geoderma* 209–210, 31–40
- Goto, F., Yoshihara, T., Saiki, H., 2000. Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin. *Theor. Appl. Genet.* 100, 658–664.
- Gregory, P.J., Wahbi, A., Adu-Gyamfi, J., Heiling, M., Gruber, R., Joy, E.J.M., Broadley, M.R., 2017. Approaches to reduce zinc and iron deficits in food systems. *Glob. Food Sec.* 15, 1–10.
- Grattan, S.R., Grieve, C.M., 1999. Salinity—Mineral nutrient relations in horticultural crops. *Sci. Hortic.* 78, 127–157.
- Gummadi, S.N., Bhavya, B., Ashok, N., 2012. Physiology, biochemistry and possible applications of microbial caffeine degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 545–554.
- Gunes, A., Inal, A., Taskin, M.B., Sahin, O., Kaya, E.C., Atakol, A., 2014. Effect of phosphorus-enriched biochar and poultry manure on growth and mineral composition of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv.) grown in alkaline soil. *Soil Use Manage.* 30, 182–188.
- Hachicha, R., Rekik, O., Hachicha, S., Ferchichi, M., Woodward, S., Moncef, N., Cegarra, J., Mechichi, T., 2012. Chemosphere Co-composting of spent coffee ground with olive mill wastewater sludge and poultry manure and effect of *Trametes versicolor* inoculation on the compost maturity. *Chemosphere* 88, 677–682.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST, paleontological statistics softwarepackage for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 9.

- Hardgrove S.J., Livesley S.J., 2016. Applying spent coffee grounds directly to urban agriculture soils greatly reduces plant growth. *Urban For. Urban Gree.*, 18, 1-8.
- Heimler, D., Vignolini, P., Arfaioi, P., Isolani, L., Romani, A., 2012. Conventional, organic and biodynamic farming: Differences in polyphenol content and antioxidant activity of Batavia lettuce. *J. Sci. Food Agric.* 92, 551–556.
- Herencia, J.F., García-Galavís, P.A., Dorado, J.A.R., Maqueda, C., 2011. Comparison of nutritional quality of the crops grown in an organic and conventional fertilized soil. *Sci. Hortic.* 129, 882–888.
- Hernández T., Garcia E., García C., 2015. A strategy for marginal semiarid degraded soil restoration: A sole addition of compost at a high rate. A five-year field experiment. *Soil Biol. Biochem.*, 89, 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.023>
- Hikichi, S.E., Andrade, R.P., Días, E.S., Duarte, W.F., 2017. Biotechnological applications of coffee processing by-products. In: Galanakis, C.M. (Ed.), *Handbook of Coffee Processing By-products: Sustainable Applications*. Academic Press, pp. 221– 241.
- Hill, M.O., 1973. Diversity and evenness, a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54, 427-432.
- Hoffman, J., 2018. *The World Atlas of coffee: from beans to brewing-coffees explored, explained and enjoyed*. Firefly Books, pp 272.
- Hui, C., Guoa, X., Sun, P., Lin, H., Zhang, Q., Liang, Y., Zhao, Y., 2017. Depth-specific distribution and diversity of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methaneoxidizing bacteria in upland-cropping soil under different fertilizer treatments. *Appl. Soil Ecol.* 113, 117–126.
- Hussain, N., Abbasi, S.A., 2018. Efficacy of the vermicomposts of different organic wastes as “clean” fertilizers: State-of-the-art. *Sustain.* 10.

- ICO, 2020. Historia del café. Available in [https://www.ico.org/ES/coffee\\_storyc.asp](https://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp). Accessed on September 21, 2021.
- Instituto de Medicina, 2005. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. Washington, DC: The National Academies Press.
- IUSS Working Group WRB, 2015. 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 No. 106. FAO, Rome.
- Janissen, B., Huynh, T., 2018. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resour. Conserv. Recycl.* 128, 110–117.
- Janssen, B.H., 1984. A simple method for calculating decomposition and accumulation of 'young' soil organic matter. *Plant Soil* 76, 297–304
- Jilani, G., Akram, A., Ali, R.M., Hafeez, F.Y., Shamsi, I.H., Chaudhry, A.N., Chaudhry, A.G., 2007. Enhancing crop growth, nutrients availability, economics and beneficial rhizospheremicroflora through organic and biofertilizers. *Ann. Microbiol.* 57, 177–183.
- Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., Rufián-Henares, J.A., 2015. Revalorization of coffee by-products, prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT Food Sci. Technol.* 61 (1), 12–18.
- Jordán, A., Zavala, L.M., Mataix-Solera, J., Doerr, S.H., 2013. Soil water repellency: Origin, assessment and geomorphological consequences. *Catena* 108, 1–5.
- Kambo, H.S., Dutta, A., 2015. A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 45, 359–378.

- Kamil, M., Ramadan, K.M., Awad, O.I., Ibrahim, T.K., Inayat, A., Ma, X., 2019. Environmental impacts of biodiesel production from waste spent coffee grounds and its implementation in a compression ignition engine. *Sci. Total Environ.* 675, 13–30.
- Kammoun, M., Ghorbel, I., Charfeddine, S., Kamoun, L., Gargouri-Bouzid, R., Nouri-Ellouz, O., 2017. The positive effect of phosphogypsum-supplemented composts on potato plant growth in the field and tuber yield. *J. Environ. Manage.* 200, 475-483.
- Kasongo, R.K., Verdoodt, a., Kanyankagote, P., Baert, G., Ranst, E. Van, 2011. Coffee waste as an alternative fertilizer with soil improving properties for sandy soils in humid tropical environments. *Soil Use Manag.* 27, 94–102.
- Kasongo, R.K., Verdoodt, a., Kanyankogote, P., Baert, G., Van Ranst, E., 2013. Response of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) to coffee waste application on a humid tropical sandy soil. *Soil Use Manag.* 29, 22–29.
- Kelkar, S., Saffron, C.M., Chai, L., Bovee, J., Stuecken, T.R., Garedew, M., Li, Z., Krieger, R.M., 2015. Pyrolysis of spent coffee grounds using a screw-conveyor reactor. *Fuel Proc. Technol.* 137, 170–178.
- Kelly, S.D., Bateman, A.S., 2010. Comparison of mineral concentrations in commercially grown organic and conventional crops - Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and lettuces (*Lactuca sativa*). *Food Chem.* 119, 738–745.
- Kemper W.D., Rosenau R.C., 1986. Aggregate stability and size distribution. In: *Methods of Soil Analysis, Agronomy* (Ed. A. Klute), Series, 9. ASA/SSSA, Inc., Madison, WI, USA.
- Khaliq A., Abassi M.K., 2015. Improvements in the physical and chemical characteristics of degraded soils supplemented with organic-inorganic amendments in the Himalayan region of Kashmir, Pakistan. *Catena*, 126, 209-219.

- Killi, D., Anlauf, R., Kavdir, Y., Haworth, M., 2014. Assessing the impact of agro-industrial olive-wastes in soil water retention: implications for remediation of degraded soils and water availability for plant growth. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 94, 48–56
- Kim, D., Lee, K., Bae, D., Park, K.Y., 2017. Characterizations of biochar from hydrothermal carbonization of exhausted coffee residue. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 19, 1036–1043.
- Kim, H., Bin, Kim, S.H., Jeon, E.K., Kim, D.H., Tsang, D.C.W., Alessi, D.S., Kwon, E.E., Baek, K., 2018. Effect of dissolved organic carbon from sludge, rice straw and spent coffee ground biochar on the mobility of arsenic in soil. *Sci. Total Environ.* 636, 1241–1248.
- Kim, M.J., Moon, Y., Tou, J.C., Mou, B., Waterland, N.L., 2016. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Food Compos. Anal.* 49, 19–34.
- Kim, M.S., Min, H.G., Koo, N., Park, J., Lee, S.H., Bak, G.I., Kim, J.G., 2014. The effectiveness of spent coffee grounds and its biochar on the amelioration of heavy metals-contaminated water and soil using chemical and biological assessments. *J. Environ. Manage.* 146, 124–30.
- King, P.M., 1981. Comparison of methods for measuring severity of water repellence of sandy soils and assessment of some factors that affect its measurement. *Soil Res.* 19 (3), 275–285.
- Kitou, M., Yoshida, S., 1997. Effect of coffee residue on the growth of several crop species. *J. Weed Sci. Tech.* 42 (1), 25–30.
- Klingel, T., Kremer, J.I., Gottstein, V., Rajcic de Rezende, T., Schwarz, S., Lachenmeier, D.W., 2020. A Review of Coffee By-Products Including Leaf, Flower, Cherry, Husk, Silver Skin, and Spent Grounds as Novel Foods within the European Union. *Foods* 9, 1–20.

- Kopec, M., Baran, A., Mierzwa-Hersztek, M., Gondek, K., Chmiel, M.J., 2018. Effect of the addition of biochar and coffee grounds on the biological properties and ecotoxicity of composts. *Waste Biomass Valori.* 9,
- Kovalcik, A., Obruca, S., Marova, I., 2018. Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food Bioprod. Process.* 110, 104–119.
- Kozik, E., Tyksiński, W., Bosiacki, M., 2011. A comparison of the efficiency of organic and mineral iron compounds in the greenhouse cultivation of lettuce. *J. Elemntology* 16, 59–68.
- Kranz, C.N., McLaughlin, R.A., Johnson, A., Miller, G., Heitman, J.L., 2020. The effects of compost incorporation on soil physical properties in urban soils – A concise review. *J. Environ. Manage.* 261, 110209.
- Kumar, S., Palve, A., Joshi, C., Srivastava, R.K., Rukhsar, 2019. Crop biofortification for iron (Fe), zinc (Zn) and vitamin A with transgenic approaches. *Heliyon* 5, e01914.
- Kuzyakov, Y., Xu, X., 2013. Tansley review Competition between roots and microorganisms for nitrogen : mechanisms and ecological relevance. *New Phytol.* 198, 656–669.
- Lago, R.C.A., Antoniassi, R., Freitas, S.C., 2001. Centesimal composition and amino acids of raw, roasted and spent ground of soluble coffee. *Embrapa Café, Brasília, Brasil.*
- Lal R., 2015. Restoring soil quality to mitigate soil degradation. *Sustainability*, 7, 5875-5895.
- Lal, R., 2011. Sequestering carbon in soils of agro-ecosystems. *Food Policy* 36.
- Le Campion, A., Oury, F.X., Heumez, E., Rolland, B., 2020. Conventional versus organic farming systems: dissecting comparisons to improve cereal organic breeding strategies. *Org. Agric.* 10, 63–74.
- Leelamanie, D.A.L., 2016. Occurrence and distribution of water repellency in size fractionated coastal dune sand in Sri Lanka under Casuarina shelterbelt. *Catena* 142, 206–212.

- Leelamanie, D.A.L., Karube, J., Samarawickrama, U.I., 2013. Stability analysis of aggregates in relation to the hydrophobicity of organic manure for Sri Lankan Red Yellow Podzolic soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 59, 683–691.
- Leifa, F., Pandey, A., Mohan, R., Soccol, C.R., 2000a. Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Acta Biotechnol.* 20, 41–52.
- Leifa, F., Pandey, A., Soccol, C.R., 2000b. Solid state cultivation-an efficient method to use toxic agro-industrial residues. *J. Basic Microbiol.* 40, 187–197.
- Leue, M., Gerke, H.H., Godow, S.C., 2015. Droplet infiltration and organic matter composition of intact crack and biopore surfaces from clay-illuvial horizons. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 178, 250–260.
- Lew, S., Glińska-Lewczuk, K., Lew, M., 2019. The effects of environmental parameters on the microbial activity in peat-bog lakes. *PLoS One* 14, 1–18.
- Li, S., Liu, X., Zhou, X., Li, Y., Yang, W., Chen, R., 2019. Improving Zinc and Iron Accumulation in Maize Grains Using the Zinc and Iron Transporter *ZmZIP5*. *Plant Cell Physiol.* 60, 2077–2085.
- Libra, J.A., Ro, K.S., Kammann, C., Funke, A., Berge, N.D., Neubauer, Y., Titirici, M.M., Fühner, C., Bens, O., Kern, J., Emmerich, K.H., 2011. Hydrothermal carbonization of biomass residuals: A comparative review of the chemistry, processes and applications of wet and dry pyrolysis. *Biofuels* 2, 71–106.
- Lima, J.R. de S., de Moraes Silva, W., de Medeiros, E.V., Duda, G.P., Corrêa, M.M., Martins Filho, A.P., Clermont-Dauphin, C., Antonino, A.C.D., Hammecker, C., 2018. Effect of biochar on physicochemical properties of a sandy soil and maize growth in a greenhouse experiment. *Geoderma* 319, 14–23.

- Limousy, L., Jeguirim, M., Dutornié, P., Kraiem, N., Lajili, M., Salid, R., 2013. Gaseous products and particulate matter emissions of biomass residential boiler fired with spent coffee grounds pellets. *Fuel* 107, 323–329.
- Limousy, L., Jeguirim, M., Labaki, M., 2017. Energy applications of coffee processing by-products. In: Galanakis, C.M. (Ed.), *Handbook of Coffee Processing By-products: Sustainable Applications*. Academic Press, pp. 323-367.
- Limousy, L., Jeguirim, M., Labbe, S., Balay, F., Fossard, E., 2015. Performance and emissions characteristics of compressed spent coffee ground/wood chip logs in a residential stove. *Energy Sustain. Dev.* 28, 52–59.
- Lindsay, W. L., Norvell, W. A., 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42(3), 421-428.
- Lingens, F., Blecher, R., Blecher, H., Blobel, F., Eberspächer, J., Fröhner, C., Görisch, H., Görisch, H., Layh, G., 1985. *Phenylobacterium immobile* gen. nov., sp. nov., a gramnegative bacterium that degrades the herbicide chloridazon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 35, 26–39.
- Liu, C.W., Sung, Y., Chen, B.C., Lai, H.Y., 2014. Effects of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 4427–4440.
- Liu, K., Price, G.W., 2011. Evaluation of three composting systems for the management of spent coffee grounds. *Bioresour. Technol.* 102, 7966–74.
- Liyanage, T.D.P., Leelamanie, D.A.L., 2016. Influence of organic manure amendments on water repellency, water entry value, and water retention of soil samples from a tropical Ultisol. *J. Hydrol. Hydromechanics* 64, 160-166
- López Bellido, L., Betrán Aso, J., Ramos Monreal, Á., López Córcoles, H., López Fuster, P., Bermejo Corrales, J.L., et al., 2010. *Guía Práctica de la Fertilización Racional de los Cultivos en España. Parte II*. Minist. Medio Ambient. y Medio Rural y Mar. 144.

- Lozano-García, B., Parras-Alcántara, L., del Toro Carrillo de Albornoz, M., 2011. Effects of oil mill wastes on surface soil properties, runoff and soil losses in traditional olive groves in southern Spain. *Catena* 85, 187-193.
- Lützow, M. V., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H., 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils: Mechanisms and their relevance under different soil conditions - A review. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 426–445.
- Mahmoud, M., Janssen, M., Peth, S., Horn, R., Lennartz, B., 2012. Long-term impact of irrigation with olive mill wastewater on aggregate properties in the top soil. *Soil Tillage Res.* 124, 24–31
- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B., 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 35, 453–461.
- Martín-García, J.M., Delgado, G., Párraga, J.F., Gámiz, E., Delgado, R., 1999. Chemical, mineralogical and (micro)morphological study of coarse fragments in Mediterranean Red Soils. *Geoderma* 90, 23–47.
- Mataix-Solera, J., Cerdà, A., Arcenegui, V., Jordán, A., Zavala, L.M., 2011. Fire effects on soil aggregation: a review. *Earth-Sci. Rev.* 109, 44-60.
- Mataix-Solera, J., Doerr, S.H., 2004. Hydrophobicity and aggregate stability in calcareous topsoils from fire-affected pine forests in southeastern Spain. *Geoderma* 118, 77–88.
- Matějková, Š., Šimon, T., 2012. Application of FTIR spectroscopy for evaluation of hydrophobic/hydrophilic organic components in arable soil. *Plant Soil Environ.* 58, 192-195.
- Mazzafera, P. 1999. Chemical composition of defective coffee beans. *Food Chem.* 64, 547–554.
- McNutt, J., He, Q.S., 2019. Spent coffee grounds: A review on current utilization. *J. Ind. Eng. Chem.* 71, 78–88.

- Mendonca, J.C.F., Franca, A.S., Oliveiral, L.S., Nunes, M. 2008. Chemical characterization of non-defective and defective green Arabica and Robusta coffees by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). *Food Chem.* 111, 490–497.
- Mercasa, 2020. La alimentación en España. Available in [https://www.mercasa.es/media/publicaciones/281/AEE\\_2020\\_web.pdf](https://www.mercasa.es/media/publicaciones/281/AEE_2020_web.pdf). Accessed on December 2<sup>nd</sup>, 2020.
- Mi, W., Wu, L., Brookes, P., Liu, Y., Zhang, X., 2016. Changes in soil organic carbon fractions under integrated Management systems in a low-productivity paddy soil given different organic amendments and chemical fertilizers. *Soil Till. Res.* 163, 64–70.
- Mimmo, T., Del Buono, D., Terzano, R., Tomasi, N., Vigani, G., Crecchio, C., Pinton, R., Zocchi, G., Cesco, S., 2014. Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: their role in iron availability. *Eur. J. Soil Sci.* 65, 629–642.
- Minasny, B., Malone, B.P., McBratney, A.B., Angers, D.A., Arrouays, D., Chambers, A., Chaplot, V., Chen, Z.S., Cheng, K., Das, B.S., Field, D.J., Gimona, A., Hedley, C.B., Hong, S.Y., Mandal, B., Marchant, B.P., Martin, M., McConkey, B.G., Mulder, V.L., O'Rourke, S., Richer-de-Forges, A.C., Odeh, I., Padarian, J., Paustian, K., Pan, G., Poggio, L., Savin, I., Stolbovoy, V., Stockmann, U., Sulaeman, Y., Tsui, C.C., Vågen, T.G., van Wesemael, B., Winowiecki, L., 2017. Soil carbon 4 per mille. *Geoderma* 292, 59–86.
- Mingorance, M. D., Barahona, E., Fernández-Gálvez, J., 2007. Guidelines for improving organic carbon recovery by the wet oxidation method. *Chemosphere* 68, 409-413.
- Mohamed, K.N., Yee, L.L., 2019. Removal of Fe Ion from polluted water by reusing spent coffee grounds. *Pertanika J. Sci. Technol.* 27, 1077–1090.

- Mohammadi, P., Khoshgofarmanesh, A.H., 2014. The effectiveness of synthetic zinc(Zn)-amino chelates in supplying Zn and alleviating salt-induced damages on hydroponically grown lettuce. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 172, 117–123.
- Mohanty, S., Nayak, A.K., Kumar, A., Tripathi, R., Shahid, M., Bhattacharyya, P., Raja, R., Panda, B.B., 2013. Carbon and nitrogen mineralization kinetics in soil of rice-rice system under long term application of chemical fertilizers and farmyard manure. *Eur. J. Soil Biol.* 58, 113–121.
- Mohawesh, O., Mahmoud, M., Janssen, M., Lennartz, B., 2014. Effect of irrigation with olive mill wastewater on soil hydraulic and solute transport properties. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 11, 927-934.
- Mondini, C., Sinicco, T., Cayuela, M.L., Sanchez-Monedero, M.A., 2010. A simple automated system for measuring soil respiration by gas chromatography. *Talanta* 81, 849–855.
- Monente, C., Ludwig, I.A., Irigoyen, A., De Pena, M.-P., Cid, C., 2015. Assessment of total (free and bound) phenolic compounds in spent coffee extracts. *J. Agr. Food Chem.* 63 (17), 4327–4334.
- Montoya, S., Orrego, C.E., Levin, L., 2012. Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1533–1541.
- Moreira, A.S.P.P., Nunes, F.M., Domingues, M.R., Coimbra, M.A., 2012. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food Funct.* 3, 903.
- Moreno M.T., Carmona E., de Santiago A., Ordovás J., Delgado A., 2016. Olive husk compost improves the quality of intensively cultivated agricultural soils. *Land Degrad. Dev.*, 27, 449-459.
- Morikawa C.K., Saigusa, M., 2011. Recycling coffee grounds and tea leaf wastes to improve the yield and mineral content of grains of paddy rice. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2108–2111.

- Morikawa, C.K., Saigusa, M., 2008. Recycling coffee and tea wastes to increase plant available Fe in alkaline soils. *Plant Soil* 304, 249–255.
- Muñoz-Rojas, M., Jordán, A., Zavala, L.M., de la Rosa, D., Abd-Elmabod, S.K., Anaya-Romero, M., 2015. Impact of land use and land cover changes on organic carbon stocks in Mediterranean soils (1956–2007). *Land Degrad. Dev.* 26, 168–179.
- Murthy, P.S., Madhava Naidu, M., 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resour. Conserv. Recycl.* 66, 45–58.
- Murthy, P.S., Madhava Naidu, M., Srinivas, P., 2009. Production of  $\alpha$ -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 1246–1249.
- Mussatto, S.I., Carneiro, L.M., Silva, J.P.A., Roberto, I.C., Teixeira, J.A., 2011. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydr. Polym.* 83, 368–374.
- Nali C., Balducci, E., Frati, L. P., Loppi, S., Lorenzini, G., 2009. Lettuce plants as bioaccumulators of trace elements in a community of Central Italy. *Environ. Monit. Assess.* 149, 143-149.
- Navarro, G., Navarro, S., 2013. *Química Agrícola: química del suelo y de los nutrientes esenciales para las plantas*. Mundi-Prensa, Madrid.
- Ndlovu, B., Forbes, E., Farrokhpay, S., Becker, M., Bradshaw, D., Deglon, D., 2014. A preliminary rheological classification of phyllosilicate group minerals. *Miner. Eng.* 55, 383–389.
- Ngo, T.-A., Kim, J., Kim, S.-S., 2015. Fast pyrolysis of spent coffee waste and oak wood chips in a micro-tubular reactor. *Energy Sources A* 37, 1186–1194.
- Nguyen, T.T.N., Xu, C.Y., Tahmasbian, I., Che, R., Xu, Z., Zhou, X., Wallace, H.M., Bai, S.H., 2017. Effects of biochar on soil available inorganic nitrogen: A review and meta-analysis. *Geoderma* 288, 79–96.

- Nicolardot, B., Recous, S., Mary, B., 2001. Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: A simple dynamic model based on the C : N ratio of the residues. *Plant Soil*. 228, 83–103.
- Nigussie, A., Kissi, E., Misganaw, M., Ambaw, G., 2012. Effect of biochar application on soil properties and nutrient uptake of lettuces (*Lactuca sativa*) grown in chromium polluted soils. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 12, 369-376.
- Nogales, R., Romero, E., Fernández, M.J., 2014. El proceso y los sistemas de vermicompostaje, in: Moreno, J., Moral, R., García Morales J.L., Pascual, J.A., Bernal, M.P (Eds.), *Vermicompostaje: Procesos, productos y aplicaciones*. Mundi-Prensa, Madrid, pp 13-43.
- Ntougias, S., Fasseas, C., Zervakis, G.I., 2007. *Olivibacter sitiensis* gen. nov., sp. nov., isolated from alkaline olive-oil mill wastes in the region of Sitia. Crete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 398–404.
- Obi, M.E., Ebo, P.O., 1995. The effects of organic and inorganic amendments on soil physical properties and maize production in a severely degraded sandy soil in southern Nigeria. *Bioresource Technol.* 51, 117–123.
- Obruca, S., Benesova, P., Kucera, D., Petrik, S., Marova, I., 2015. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *N. Biotechnol.* 32, 569–574
- Ociepa, E. Ociepa-Kubicka, A. Okoniewska E., Lach, J., 2013. The Immobilization of Zinc and Cadmium in the Soil as a Result of the Use of Waste Substrates. *Rocznikochronasrodowiska* 15, 1772-1786.
- Omondi M.O., Xia X., Nahayo A., Liu X., Korai P.K., Pan, G., 2016. Quantification of biochar effects on soil hydrological properties using meta-analysis of literature data. *Geoderma* 274, 28-34.
- Ontiveros-Ortega, A., Vidal, F., Gimenez, E., Ibáñez, J.M., 2014. Effect of heavy metals on the surface free energy and zeta potential of volcanic

- glass: Implications on the adhesion and growth of microorganisms. *J. Mater. Sci.* 49, 3550–3559.
- Osipov, V.I., Sokolov, V.N., 1978. Relation between the microfabric of clay soils and their origin and degree of compaction. *Bull. Int. Assoc. Eng. Geol. - Bull. l'Association Int. Géologie l'Ingénieur* 18, 73–81.
- Palansooriya, K.N., Ok, Y.S., Awad, Y.M., Lee, S.S., Sung, J.K., Koutsospyros, A., Moon, D.H., 2019. Impacts of biochar application on upland agriculture: A review. *J. Environ. Manage.* 234, 52–64.
- Pan, W. L., 2012. Nutrient interactions in soil fertility and plant nutrition. In *Handbook of soil sciences: Resource management and environmental impacts* (Huang, P.M., Li, Y., eds.). Boca Raton, Fla: CRC.
- Pandey, a, Soccol, C., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S., 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochem. Eng. J.* 6, 153–162.
- Panusa, A., Zuurro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., Petrucci, R., 2013. Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *J. Agr. Food Chem.* 61 (17), 4162–4168.
- Pastoriza, S., Rufián-Henares, J. a, 2014. Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. *Food Chem.* 164, 438–45.
- Pauget, B., Gimbert, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., De Vaufleury, A., 2012. Soil parameters are key factors to predict metal bioavailability to snails based on chemical extractant data. *Sci. Total Environ.* 431, 413–425.
- Pérez-Burillo, S., Pastoriza, S., Fernández-Arteaga, A., Luzón, G., Jiménez-Hernández, N., D'Auria, G., Francino, M.P., Rufián-Henares, J.A., 2019. Spent Coffee Grounds Extract, Rich in Mannooligosaccharides, Promotes a Healthier Gut Microbial Community in a Dose-Dependent Manner. *J. Agric. Food Chem.* 67, 2500–2509.

- Petek, M., Krvavica, L., Karažija, T., Žlabur, J.Š.I.C., 2020. Macroelements status in lettuce affected by different forms of phosphorus fertilization. *Horticulture* 64, 227–234.
- Petracco, M., 2001. Technology IV—beverage preparation: brewing trends for the new millennium. In: Clarke, R.J., Vitzthum, O.G. (Eds.), *Coffee: Recent Developments*. World Agriculture Series, Cornwall, UK.
- Petridis, A., Gasparatos, D., Haidouti, C., Paschalidis, C., Zamanidis, P., 2013. Effects of nitrogen and boron fertilization on lettuce mineral nutrition in a calcareous soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 44(1-4), 733-740.
- Petrik, S., Obruc' a, S., Benešova, P., Marova, I., 2014. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. *Biochem. Eng. J.* 90, 307–315.
- Pinto, E., Almeida, A.A., Aguiar, A.A.R.M., Ferreira, I.M.P.L.V.O., 2014. Changes in macrominerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: Influence of soil composition. *Food Chem.* 152, 603–611.
- Plaza, I., Ontiveros-Ortega, A., Calero, J., Aranda, V., 2015. Implication of zeta potential and surface free energy in the description of agricultural soil quality: Effect of different cations and humic acids on degraded soils. *Soil & Tillage Research* 146, 148-158.
- Pokhrel, B., Laursen, K. H., Petersen, K. K., 2015. Yield, quality, and nutrient concentrations of strawberry (*fragaria* × *ananassa* duch. cv. *sonata*) grown with different organic fertilizer strategies. *J. Agric. Food Chem.* 63 (23), 5578–5586.
- Prasad, R., Shivay, Y.S., 2020. Agronomic biofortification of plant foods with minerals, vitamins and metabolites with chemical fertilizers and liming. *J. Plant Nutr.* 43, 1534–1554.

- Pujol, D., Liu, C., Gominho, J., Olivella, M.À., Fiol, N., Villaescusa, I., Pereira H., 2013. The chemical composition of exhausted coffee waste. *Ind. Crops Prod.* 50, 423–429.
- Rakhsh, F., Golchin, A., Beheshti Al Agha, A., Alamdari, P., 2017. Effects of exchangeable cations, mineralogy and clay content on the mineralization of plant residue carbon. *Geoderma* 307, 150–158.
- Rashmi I., Roy, T., Kartika, K.S., Pal, R., Coumar, V., Kala, S., Shinoki, K.C., 2020. Organic and Inorganic Fertilizer Contaminants in Agriculture: Impact on Soil and Water Resources. In: Naeem M., Ansari A., Gill S. (eds) *Contaminants in Agriculture*. Springer, Cham.
- Reganold, J.P., Wachter, J.M., 2016. Organic agriculture in the twenty-first century. *Nat. plants* 2, 15221.
- Regazzoni, L., Saligari, F., Marinello, C., Rossoni, G., Aldini, G., Carini, M., Orioli, M., 2016. Coffee silver skin as a source of polyphenols: High resolution mass spectrometric profiling of components and antioxidant activity. *J. Funct. Foods* 20, 472–485.
- Reynolds W.D., Drury C.F., Yang X.M., Tan C.S., 2008. Optimal soil physical quality inferred through structural regression and parameter interactions. *Geoderma* 146, 466- 474.
- Ribeiro, J.P., Vicente, E.D., Gomes, A.P., Nunes, M.I., Alves, C., Tarelho, L.A.C., 2017. Effect of industrial and domestic ash from biomass combustion, and spent coffee grounds, on soil fertility and plant growth: experiments at field conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 15270–15277.
- Rietra, R.P.J.J., Heinen, M., Dimkpa, C.O., Bindraban, P.S., 2017. Effects of Nutrient Antagonism and Synergism on Yield and Fertilizer Use Efficiency. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 48, 1895–1920.
- Robertson, G.P., Paul, E.A., 2000. Decomposition and soil organic matter dynamics. In: Sala, E.O., Jackson, R.B., Mooney, H.A., Howard, R.W.

- (Eds.), *Methods in Ecosystem Science*. Springer-Verlag, New York, pp. 104–113.
- Rodríguez Martín J.A., Álvaro-Fuentes J., Gonzalo J., Gil C., Ramos-Miras J.J., Grau Corbí J.M., Boluda R., 2016. Assessment of the soil organic carbon stock in Spain. *Geoderma* 264, 117-125.
- Rodríguez-Entrena, M., Espinosa-Goded, M., Barreiro-Hurlé, J., 2014. The role of ancillary benefits on the value of agricultural soils carbon sequestration programmes: Evidence from a latent class approach to Andalusian olive groves. *Ecol. Econ.* 99, 63–73.
- Ronga, D., Pane, C., Zaccardelli, M., Pecchioni, N., 2016. Use of Spent Coffee Ground Compost in Peat-Based Growing Media for the Production of Basil and Tomato Potting Plants. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 47, 356–368.
- Rossini-Oliva, S., Mingorance, M.D., Peña, A., 2017. Effect of two different composts on soil quality and on the growth of various plant species in a polymetallic acid mine soil. *Chemosphere.* 168, 183–190.
- Rufián-Henares, J. A, de la Cueva, S.P., 2009. Antimicrobial activity of coffee melanoidins-a study of their metal-chelating properties. *J. Agric. Food Chem.* 57, 432–8.
- Sall S.N., Masse D., Hélène Diallo N., Sow T.M.B., Hien E., Guisse A., 2016. Effects of residue quality and soil mineral N on microbial activities and soil aggregation in a tropical sandy soil in Senegal. *Eur. J. Soil Biol.* 75, 62-69.
- Salvador i Castells, G, 2000. Tabla de medidas caseras de alimentos. In J. Salas-Salvadó, A. Bonada, R. Trallero and M.E. Saló (Eds.), *Nutrición y Dietética Clínica*. Elsevier-Masson, Barcelona, pp. 557-570, Annex 4.
- Sampaio, A., Dragone, G., Vilanova, M., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I., 2013. Production, chemical characterization, and sensory profile of a

novel spirit elaborated from spent coffee ground. *LWT - Food Sci. Technol.* 54, 557–563.

- Sánchez-Hernández, J., Domínguez, J., 2017. Vermicompost derived from spent coffee grounds: assessing the potential for enzymatic bioremediation. In: Galanakis, C.M. (Ed.), *Handbook of Coffee Processing By-products: Sustainable Applications*. Academic Press, pp. 369–398.
- Sánchez-Marañón M., Martín-García J.M., Delgado R., 2011. Effects of the fabric on the relationship between aggregate stability and color in a Regosol-Umbrisol soil scape. *Geoderma* 162, 86-95.
- Sánchez-Marañón, M., Soriano, M., Delgado, G., Delgado, R., 2002. Soil Quality in Mediterranean Mountain Environments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 948.
- Santos, C., Fonseca, J., Aires, A., Coutinho, J., Trindade, H., 2017. Effect of different rates of spent coffee grounds ( SCG ) on composting process , gaseous emissions and quality of end-product 59, 37–47.
- Schaumann, G.E., Braun, B., Kirchner, D., Rotard, W., Szewzyk, U., Grohmann, E., 2007. Influence of biofilms on the water repellency of urban soil samples. *Hydrol. Process.* 21, 2276–2284.
- Schleinitz, K.M., Schmeling, S., Jehmlich, N., von Bergen, M., Harms, H., Kleinstaub, S., Vogt, C., Fuchs, G., 2009. Phenol degradation in the strictly anaerobic iron-reducing bacterium *Geobacter metallireducens*
- Schlöter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S.J., van Elsas, J.D., 2018. Microbial indicators for soil quality. *Biol Fertil Soils* 54, 1–10.
- Schrama, M., De Haan, J. J., Kroonen, M., Verstegen, H., Van der Putten, W. H., 2018. Crop yield gap and stability in organic and conventional farming systems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 256, 123-130.

- Sena Da Fonseca, B., Vilão, A., Galhano, C., Simão, J.A.R., 2014. Reusing coffee waste in manufacture of ceramics for construction. *Adv. Appl. Ceram.* 113, 159–166.
- Shang, Y.F., Xu, J.L., Lee, W.J., Um, B.H., 2017. Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction. *South African J. Bot.* 109, 75–80.
- Shemekite, F., Gomez-Brandon, M., Franke-Whittle, I.H., Praehauser, B., Insam, H., Assefa, F., 2014. Coffee husk composting: a investigation of the process using molecular and nonmolecular tools. *Waste Manage.* 34 (3), 642–652.
- Shen, Y., Tebben, L., Chen, G., Li, Y., 2019. Effect of amino acids on Maillard reaction product formation and total antioxidant capacity in white pan bread. *Int. J. Food Sci. Technol.* 54, 1372–1380.
- Simões, J., Madureira, P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., Vilanova, M., Coimbra, M. A. 2009. Immunostimulatory properties of coffee mannans. *Molecular Nutrition & Food Research.* 53, 1036–1043.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other antioxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178.
- Six, J., Conant, R.T., Paul, E. a, Paustian, K., 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturatin of soils. *Plant Soil* 241, 155–176.
- Smoleń, S., Kowalska, I., Sady, W., 2014. Assessment of biofortification with iodine and selenium of lettuce cultivated in the NFT hydroponic system. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 166, 9–16.
- Sofa, A., Lundegårdh, B., Mårtensson, A., Manfra, M., Pepe, G., Sommella, E., De Nisco, M., Tenore, G.C., Campiglia, P., Scopa, A., 2016. Different agronomic and fertilization systems affect polyphenolic profile,

- antioxidant capacity and mineral composition of lettuce. *Sci. Hort.* (Amsterdam). 204, 106–115.
- Soil Science Division Staff., 2017. *Soil survey manual*. C. Ditzler, K. Scheffe, and H.C. Monger (eds.). USDA Handbook 18. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Soil Survey Staff, 2014. *Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual*, Soil Survey Investigations. Report No. 51, Version 2.0. R. Burt and Soil Survey Staff (ed.). U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.
- Sommer, S.G., Kjellerup, V., Kristjansen, O., 1992. Determination of total ammonium nitrogen in pig and cattle slurry: sample preparation and analysis. *Acta Agr. Scand. B-S P.* 42, 146–151.
- Song, C., Shan, S., Yang, C., Zhang, C., Zhou, X., Ma, Q., Yrjälä, K., Zheng, H., Cao, Y., 2020. The comparison of dissolved organic matter in hydrochars and biochars from pig manure. *Sci. Total Environ.* 720, 1–8.
- Sonnleitner R., Lorbeer E., Schinner F., 2003. Effects of straw, vegetable oil and whey on physical and microbiological properties of a Chernozem. *Appl. Soil Ecol.* 22, 195-204.
- Spanish MAPA, 1994. *Metodos Oficiales de Analisis. Tomo III*; Ministerio de agricultura, pesca y alimentacion; Secretaria General Tecnica Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion: Madrid; p. 662.
- Sposito, G., 2016. *The Chemistry of Soils* (3<sup>rd</sup> edition). London: Oxford University Press.
- Stevenson F.J., 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*, 2nd Editio. ed, Organic Geochemistry. John Wiley and Sons, Inc, New York
- Stevenson, F.J., 1982. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. Wiley, New York.
- Storksdieck, D. and Harrell, R., 2007. The impact of trace elements from plants on human nutrition: a case study for biofortification. In: *Ninth*

International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE), Beijing, China.

- Suzuki, K., Matsunaga, R., Hayashi, K., Matsumoto, N., Tobita, S., Bationo, A., Okada, K., 2017. Effects of long-term application of mineral and organic fertilizers on dynamics of nitrogen pools in the sandy soil of the Sahel region. *Niger. Agr. Ecosyst. Environ.* 242, 76–88.
- Swift, R. S., 1996. Organic matter characterization (chap. 35). In: Sparks, D. L., et al. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods*. ASA/SSSA, Inc., Madison, WI, USA, pp. 1018–1021. *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, n° 5.
- Takenaka, M., Sato, N., Asakawa, H., Wen, X., Murata, M., Homma, S., 2005. Characterization of a metal-chelating substance in coffee. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 26–30.
- Tangmankongworakoon, N., 2019. An approach to produce biochar from coffee residue for fuel and soil amendment purpose. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 8, 37–44. <https://doi.org/10.1007/s40093-019-0267-5>
- Teutscherova, N., Vazquez, E., Santana, D., Navas, M., Masaguer, A., Benito, M., 2017. Influence of pruning waste compost maturity and biochar on carbon dynamics in acid soil, Incubation study. *Eur. J. Soil Biol.* 78, 66–74.
- Thomsen I.K., Olesen, J.E., Møller, H.B., Sørensen, P., Christensen, B.T., 2013. Carbon dynamics and retention in soil after anaerobic digestion of dairy cattle feed and faeces. *Soil Biol. Biochem.* 58, 82–87.
- Tian, W., Wang, L., Li, Y., Zhuang, K., Li, G., Zhang, J., Xiao, X., Xi, Y., 2015. Responses of microbial activity, abundance, and community in wheat soil after three years of heavy fertilization with manure-based compost and inorganic nitrogen. *Agr. Ecosyst. Environ.* 213, 219–227.

- Tillman, R.W., Scotter, D.R., Wallis, M.G., Clothier, B.E., 1989. Water repellency and its measurements by using intrinsic sorptivity. *Aust. J. Soil Res.* 27, 637–644.
- Tinoco, P., Piedra Buena, A., Zancada, M.C., Sanz, J., Almendros, G., 2010. Biogeochemical Proxies of Anthropic Impact in Mediterranean Forest Soils. *Soil Use and Management* 26, 320-331.
- Tokimoto T., Kawasaki N., Nakamura T., Akutagawa J., and Tanada S., 2005. Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass. *J. Colloid Interface Sci.* 281, 56-61.
- Torres-Valenzuela, L.S., Serna-Jiménez, J.A., Martínez, K., 2020. Coffee By-Products: Nowadays and Perspectives. *Coffee - Prod. Res.* 1–18.
- Turek, M.E., Freitas, K.S., Armindo, R.A., 2019. Spent coffee grounds as organic amendment modify hydraulic properties in a sandy loam Brazilian soil. *Agric. Water Manag.* 222, 313–321.
- Tyksiński, W., Komosa, A., 2008. After effect of iron chelates on the yielding and iron content in greenhouse lettuce. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 7, 3–10.
- Ünlükara, A., Cemek, B., Karaman, S., Ersahin, S., 2008. Response of lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa*) to salinity of irrigation water. *New Zeal. J. Crop Hor.* 36, 265–273.
- Urbano P., 2001. *Tratado de Fitotecnia General*. Madrid. Mundi-Prensa.
- Vakalis, S., Moustakas, K., Benedetti, V., Cordioli, E., Patuzzi, F., Loizidou, M., Baratieri, M., 2019. The “COFFEE BIN” concept: centralized collection and torrefaction of spent coffee grounds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 35473–35481.
- Van Oss, C.J., 1994. *Interfacial Forces in Aqueous Media*. Dekker, New York.
- Van Oss, C.J., Chaudhury, M.K., Good, R.J., 1988. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem. Rev.* 88, 927–941.

- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703–707.
- Vardon, D.R., Moser, B.R., Zheng, W., Witkin, K., Evangelista, R.L., Strathmann, T.J., Rajagopalan, K., Sharma, B.K., 2013. Complete utilization of spent coffee grounds to produce biodiesel, bio-oil, and biochar. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1 (10), 1286–1294.
- Vela-Cano, M., Gómez-Brandón, M., Pesciaroli, C., Insam, H., González-López, J., 2018. Study of total bacteria and ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea in response to irrigation with sewage sludge compost tea in agricultural soil. *Compost Sci. Util.* 26(2), 1–11.
- Velenturf, A.P.M., Archer, S.A., Gomes, H.I., Christgen, B., Lag-Brotons, A.J., Purnell, P., 2019. Circular economy and the matter of integrated resources. *Sci. Total Environ.* 689, 963–969.
- Vergnoux, A., Guiliano, M., Di Rocco, R., Domeizel, M., Théraulaz, F., Doumenq, P., 2011. Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. *Environ. Res.* 111, 205–214
- von Grebmer, K., Saltzman, A., Birol, E., Wiesmann, D., Prasai, N., Yin, S., Yohannes, Y., Menon, P., Thompson, J., Sonntag, A., 2014. Synopsis of 2014 Global hunger index: The challenge of hidden hunger: Issue briefs.
- Wakasawa, H., Takahashi, K., Mochizuki, K., 1998. Application and composting conditions of coffee grounds. 1. Application of coffee grounds in soil. *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 69(1), 1-6.
- Wang, H. Y., Qian, H., Yao, W. R.. 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chem.* 128(3), 573-584.
- Wang, M., Sahu, A.K., Rusten, B., Park, C., 2013a. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. *Bioresource Technol.* 142, 585–590.

- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261-5267.
- Wang, T., Zhai, Y., Zhu, Y., Li, C., Zeng, G., 2018. A review of the hydrothermal carbonization of biomass waste for hydrochar formation: Process conditions, fundamentals, and physicochemical properties. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 90, 223–247.
- Wang, Z., Wang, J., Guo, S., Xue, X., Yu, S., 2013b. Iron-chelating properties of melanoidins and inducing effect of pulsed electric field. *J. Food Process Eng.* 36, 786–792.
- Wen, X., Takenaka, M., Murata, M., Homma, S., 2004. Antioxidative activity of a zinc-chelating substance in coffee. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2313–2318.
- WHO, 2008. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. Who Press, Geneva.
- Wilson, C., Zebarth, B.J., Burton, D.L., Goyer, C., Moreau, G., Dixon, T., 2019. Effect of Diverse Compost Products on Potato Yield and Nutrient Availability. *Am. J. Potato Res.* 96, 272–284.
- Woche, S.K., Goebel, M.O., Kirkham, M.B., Horton, R., van der Ploeg, R.R., Bachmann, J., 2005. Contact angle of soils as affected by depth, texture, and land management. *Eur. J. Soil Sci.* 56, 239–251.
- Wojtkowski, P., 2010. Temporal economics, In: Wojtkowski, P. (Ed.), *Agroecological economics: sustainability and biodiversity*. London, pp. 97-114.
- Wu, K., Yuan, S., Wang, L., Shi, J., Zhao, J., Shen, B., Shen, Q., 2014. Effects of bioorganic fertilizer plus soil amendment on the control of tobacco bacterial wilt and composition of soil bacterial communities. *Biol. Fert. Soils* 50, 961–971.

- Wu, W., Wu, J., Liu, X., Chen, X., Wu, Y., Yu, S., 2017. Inorganic phosphorus fertilizer ameliorates maize growth by reducing metal uptake, improving soil enzyme activity and microbial community structure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 143, 322–329.
- Xiao, L.P., Shi, Z.J., Xu, F., Sun, R.C., 2012. Hydrothermal carbonization of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 118, 619–623.
- Yaalon, D.H., 1997. Soils in the Mediterranean region: what make them different? *Catena.* 28, 157–169.
- Yamane, K., Kono, M., Fukunaga, T., Iwai, K., Sekine, R., 2014. Field Evaluation of Coffee Grounds Application for Crop Growth Enhancement, Weed Control, and Soil Improvement. *Plant Prod. Sci.* 17, 93–102.
- Yazdanpanah N., Mahmoodabadi M., Cerdà A., 2016. The impact of organic amendments on soil hydrology, structure and microbial respiration in semiarid lands. *Geoderma*, 266, 58-65.
- Yu, S., Park, Jinje, Kim, M., Ryu, C., Park, Jungkeuk, 2019. Characterization of biochar and byproducts from slow pyrolysis of hinoki cypress. *Bioresour. Technol. Reports* 6, 217–222.
- Zhang, H., Voroney, R.P., Price, G.W., 2014. Effects of Biochar Amendments on Soil Microbial Biomass and Activity. *J. Environ. Qual.* 43, 2104–2114.
- Zhang, N., He, X. D., Gao, Y. B., Li, Y. H., Wang, H. T., Ma, D., Zhang, R. and Yang, S. 2010. Pedogenic Carbonate and Soil Dehydrogenase Activity in Response to Soil Organic Matter in *Artemisia ordosica* Community. *Pedosphere* 20, 229–235
- Zhao, A., Yang, S., Wang, B., Tian, X., 2019. Effects of ZnSO<sub>4</sub> and Zn-EDTA applied by broadcasting or by banding on soil Zn fractions and Zn uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) under greenhouse conditions. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 182, 307–317.

Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoldi, M., 1981. Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle* 22, 54-57.