



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



*Escuela Técnica Superior de Ingeniería  
Agronómica y de Montes*

**Departamento de Agronomía**

**Trabajo Fin de Máster**

**EFFECTO RESIDUAL DE LA APLICACIÓN DE SUBPRODUCTOS  
AGROINDUSTRIALES COMO FUENTE DE FÓSFORO EN GIRASOL**

**Alumno:** José Javier Guerrero Criado

**Titulación:** Máster en Ingeniería Agronómica

**Curso académico:** 2021/2022

**Directores:** Dr. D. Antonio Rafael Sánchez Rodríguez

Dra. Dña. María Benlloch González



## **AGRADECIMIENTOS**

Desde que me dieron la oportunidad de hacer este Trabajo fin de Máster, algunas personas entre los que se encuentran mis profesores Antonio y Campi, junto a mí y a otras personas más del equipo, tuvimos claro que este no iba a ser un TFM normal y corriente. De hecho, nada que salga de la mente de estas personas que me rodean suele ser común, desde felicitar un cumpleaños con la denegación de una beca en la que han compinchado a más de un profesional, hasta divulgar la ciencia disfrazados y haciendo un scape room. Esto es lo que ocurre en el C4 1ª planta, que todo parece siempre un juego.

Y de esta manera empezamos a jugar en septiembre, con nuestros girasoles, deseando verlos florecer, pero con tantos y tantos días de sacrificio para que todo saliese según lo previsto. Sin embargo, todo esfuerzo tiene su recompensa y mis profesores y tutores me fueron guiando de forma que al final conseguí que todo fuese según su curso, y después de un largo proceso obtuvimos una gran cantidad de resultados que hemos conseguido trasladar en este documento, que constituye el reflejo de 13 meses de trabajo y dedicación, no solo mía, sino de todo el equipo que forma esta gran familia de Edafología.

Gracias en primer lugar a mis directores Antonio y María, por vuestra dedicación y comprensión en todo momento. Gracias al resto de mis profesores, Campi, Vidal, Pepe, Maribel y Lola. Y gracias a mis compañeros de laboratorio: José M<sup>a</sup>, Carlos, Fernando, Sana, Miguel, Belén, Juan Antonio, Lucía, Mónica, MJ y Martín, que con su ayuda y sus risas han hecho mucho más fácil este trabajo. Y termino dando las gracias a las personas que durante toda mi vida han estado a mi lado, acompañándome en todo el camino y sintiéndose orgullosos de la persona que soy actualmente. Gracias por ello a mis abuelas, a mis padres, a mis hermanos y a mi pareja Fran, que siempre me han mostrado su apoyo y cariño más sincero.

Espero que este trabajo haya sido el preludio de la etapa que hoy se abre, dando paso a 4 años que espero y deseo vivir con la misma energía, fuerza y ganas que he demostrado tener hasta ahora y que espero compartir con las mismas y muchas personas más que sigan aportando risas, buenos momentos y mucha pasión por la ciencia y la investigación.

Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España y por los Fondos Europeos de Desarrollo Regional [Project PID2020-118503RB-C22; Fertilidad fosfatada y funciones del suelo en respuesta a la aplicación de fuentes alóctonas de fósforo] y por los Programas Severo Ochoa y María de Maeztu para Centros y Unidades de Excelencia en Investigación y Desarrollo [Ref. CEX2019-000968-M].



# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 REGULACIÓN EN MATERIA DE MEDIO AMBIENTE, CAMBIO CLIMÁTICO Y SUELO.....	2
1.1.1 Unión Europea: Un Pacto Verde Europeo.....	2
1.1.2 Unión Europea: Economía Circular.....	3
1.1.3 Horizonte Europa: Un acuerdo sobre el suelo para Europa.....	3
1.2 MANEJO DE FÓSFORO EN LOS SUELOS AGRÍCOLAS.....	4
1.2.1 El legado de P en el suelo.....	5
1.2.2 Formas de fósforo en el suelo y reacciones.....	6
1.3 RECUPERACIÓN DE FÓSFORO A PARTIR DE SUBPRODUCTOS ORGÁNICOS.....	8
1.3.1 Fertilizantes de fósforo de base orgánica.....	8
1.3.2 Síntesis de fertilizantes minerales a partir de subproductos orgánicos.....	9
1.4 INTERACCIÓN ENTRE EL FÓSFORO Y OTROS NUTRIENTES.....	10
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 ENSAYO DE CULTIVO EN MACETAS.....	15
3.1.1 Localización y recogida de las muestras de suelo.....	15
3.1.2 Caracterización de los suelos utilizados.....	16
3.1.3 Diseño experimental y preparación del suelo.....	20
3.1.4 Siembra y desarrollo del cultivo.....	22
3.1.5 Determinaciones y medidas durante el ensayo de cultivo.....	24
3.1.6 Cosecha y procesado de las muestras vegetales.....	25
3.1.7 Análisis de las muestras vegetales (P, Fe, Cu y Zn).....	27
3.1.8 Muestreo y procesado del suelo al final del ensayo.....	27
3.1.9 Análisis de las muestras de suelo.....	28
3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUELOS UTILIZADOS.....	33
4.2 ENSAYO DE CULTIVO DE GIRASOL EN MACETAS.....	33
4.2.1 Evolución del crecimiento (altura y diámetro del tallo), índice de clorofila y estadio fenológico de las plantas de girasol.....	34
4.2.2 Peso seco de las plantas de girasol.....	38

4.2.3	Contenido de fósforo en las plantas de girasol .....	41
4.2.4	Contenido de micronutrientes en las plantas de girasol.....	44
4.2.5	Variables analizadas en el suelo .....	50
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
5.1	TRABAJO FUTURO.....	63
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

## RESUMEN

El fósforo (P) es el segundo elemento más importante en la nutrición mineral de las plantas, siendo el responsable de muchos procesos metabólicos implicados en su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, la roca fosfórica, mineral del que se extrae el P como fertilizante, es un recurso no renovable sometido a tensiones económicas internacionales. Por este motivo, se buscan alternativas al uso de fertilizantes químicos de P, como la recuperación del P presente en residuos agroindustriales. La aplicación de estas estrategias en un contexto de auge demográfico y cambio climático son fundamentales para alcanzar una producción agrícola sostenible, que permita incrementar la producción de alimentos y la salud del suelo, en línea con el Pacto Verde Europeo y la Estrategia de la Granja a la Mesa. El objetivo principal de este TFM fue evaluar el efecto residual de la aplicación de 4 fertilizantes de base orgánica (harina de sangre-HAS, alperujo compostado-ALP, residuo sólido urbano compostado-RSU y vermicompost-VER) y un fertilizante inorgánico (Super 18-S18) como fuente de P en girasol, como segundo cultivo de una rotación (trigo-girasol). Además, se pretendió estudiar la dinámica de estos subproductos en 4 suelos con distintas propiedades físico-químicas (Rabanales-RAB, arenoso y no calcáreo, y Tomejil-TOM, Sancho Miranda-SAN y Encineño-ENC, arcillosos y calcáreos), analizar el efecto de la dosis de aplicación (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>) y realizar una comparación del efecto en el suelo (pH, conductividad eléctrica, fosfatasa ácida y básica) y en la planta (rendimiento y contenido de P, Fe, Cu y Zn). Los resultados obtenidos al finalizar el ensayo de cultivo de girasol bajo condiciones controladas (temperatura, humedad relativa y fotoperíodo) determinaron que, generalmente, la aplicación de estos subproductos incrementó el nivel de P disponible para los cultivos en el suelo hasta niveles similares o superiores a los obtenidos con el fertilizante inorgánico. También, los fertilizantes orgánicos modificaron la actividad enzimática en el suelo al final del ciclo de cultivo, tanto en la fosfatasa ácida, como básica (menor en RAB, de pH ácido), sobre todo con el tratamiento de HAS, que también incrementó notablemente la conductividad eléctrica de los suelos calcáreos. El aporte de P por los fertilizantes de base orgánica y el incremento del nivel de materia orgánica en el suelo, permitieron el correcto desarrollo del cultivo de girasol en todos los suelos, que solo se redujo con el uso del tratamiento HAS, de forma más acusada en el suelo SAN. Sin embargo, no se mostraron diferencias en la mayoría de las variables respecto a la dosis de P. Finalmente, se determinó que el efecto de los fertilizantes de base orgánica sobre la dinámica de los nutrientes depende de las características del fertilizante y del suelo sobre el que se aplica. Además, su aplicación aumentó el nivel de P y de materia orgánica, mejorando la salud del suelo y obteniendo rendimientos en girasol comparables a cuando se utilizó el fertilizante químico S18.

**Palabras clave:** Fertilizantes de base orgánica, economía circular, fertilización de fósforo, salud del suelo, girasol.



## ABSTRACT

Phosphorus (P) is the second most important element in plant mineral nutrition. This element is the responsible for some metabolic processes involved in the plant growth and development. However, phosphate rock, the mineral from which P is extracted as fertilizer, is a non-renewable resource subjected to international economic pressures. For that reason, alternatives to the use of chemical P fertilizers are under research, such as the recovery of P from agro-industrial residues. The application of these strategies under increasing population and climate change scenarios is essential to achieve a sustainable agricultural production, which promotes food production and soil health, according to the European Green Deal and the Farm to Fork Strategy. The main aim of this Final Master Project was to evaluate the residual effect of the application of 4 organic-based fertilizers (blood meal-HAS, composted alperujo-ALP, composted urban solid waste-RSU and vermicompost-VER) and an inorganic fertilizer (Super 18 -S18) as a P source in sunflower plants, as the second crop of a crop-rotation (wheat-sunflower). In addition, it was intended to study the dynamics of these by-products in 4 soils with different physicochemical properties (Rabanales-RAB, sandy and non-calcareous soil and Tomejil-TOM, Sancho Miranda-SAN and Encineño-ENC, clayey and calcareous soils), to analyze the effect of the application dose of the by-products (25 and 50 mg P kg<sup>-1</sup>) and make a comparison of the effect on the soil (pH, electrical conductivity, acid and alkaline phosphatase) and on the plant (yield and content of P, Fe, Cu and Zn). Sunflower plants were grown under controlled conditions (temperature, relative humidity and photoperiod) until the crop cycle was over. The results obtained at harvest showed that, in general, the application of these by-products increased the level of P available for crops in the soils to similar or higher levels than those obtained with inorganic fertilizer. Also, organic fertilizers modified the enzymatic activity in the soils analyzed at the end of the crop cycle, both in acid and alkaline phosphatase (lower in RAB, with acid pH), especially with the HAS treatment, which also significantly increased the electrical conductivity of calcareous soils. However, there was no visible effect of de P dose in most of the analyzed variables. Finally, the effect of organic-based fertilizers on nutrient dynamics will depend on the properties of the fertilizer and the soil on which it is applied. In addition, the application of these fertilizers resulted in an increase of P and organic matter levels, improving soil health and leading to sunflower yields similar to those obtained with the chemical fertilizer S18.

Keywords: Organic-based fertilizers, circular economy, phosphorus fertilization, soil health, sunflower.



## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 3.1. Localización de las muestras de suelo. Fuente: Google Maps .....	16
Figura 3.2. Cápsulas de aluminio para humedad higroscópica.....	17
Figura 3.3 Espectrofotómetro de microplacas BioTek PowerWave HT .....	19
Figura 3.4 Espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 200 PerkinElmer ®.....	20
Figura 3.5 Germinación de las semillas .....	23
Figura 3.6 Plántulas de girasol.....	23
Figura 3.7 Aparición del organo floral y floración. ....	24
Figura 3.8 Peso seco de una planta de girasol. Capítulo. Tallo y hoja .....	25
Figura 3.9 Procesado del material vegetal. Muestra picada. Muestra molinillo. Muestra molida.....	26
Figura 3.10 Digestión del material vegetal. Peso muestra. Digestión muestra.....	26
Figura 3.11 Cilindro de suelo y porción seleccionada para el muestreo en fresco .....	28
Figura 3.12 Patrones para la determinación de la fosfatasa ácida y básica .....	30
Figura 3.13 Muestras incubadas con NaOH, sobrenadante de las muestras y Microplaca .....	30
Figura 4.1 Evolución de la altura.....	35
Figura 4.2 Evolución del diámetro del tallo.....	36
Figura 4.3 Índice de clorofila.....	37
Figura 4.4 Rendimiento potencial de las plantas de girasol.....	39
Figura 4.5 Biomasa de las plantas de girasol .....	40
Figura 4.6 Concentración de P en el capítulo .....	42
Figura 4.7 Concentración de P en el tallo y las hojas .....	43
Figura 4.8 Contenido de P en la planta .....	44
Figura 4.9 Concentración de Cu en el capítulo .....	47
Figura 4.10 Concentración de Cu en el tallo y las hojas.....	48
Figura 4.11 Concentración de Zn en el capítulo .....	49
Figura 4.12 Concentración de Zn en el tallo y las hojas .....	50
Figura 4.13 Conductividad eléctrica en el suelo .....	52
Figura 4.14 P Olsen.....	53
Figura 4.15 Fosfatasa ácida.....	54
<b>ANEXOS</b>	
Figura A.8.1 Plantas de girasol a los 40 DDS.....	78
Figura A.8.2 Plantas de girasol a los 80 DDS.....	79

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 3.1. Situación y clasificación de los suelos utilizados .....	15
Tabla 3.2 Patrones Micronutrientes para absorción atómica .....	20
Tabla 3.3 Propiedades químicas de los subproductos utilizados como fuentes de P en el ensayo en macetas de la rotación trigo-girasol .....	21
Tabla 3.4 Códigos de combinación de suelo, tratamiento y dosis .....	22
Tabla 4.1. Propiedades físico - químicas de los suelos utilizados .....	33
Tabla 4.2 Fe en material vegetal (capítulo) .....	45
Tabla 4.3 Fe en material vegetal (tallos y hojas).....	46
Tabla 4.4 pH en el suelo (1:2,5).....	51
Tabla 4.5 Fosfatasa Básica.....	55

### **ANEXOS**

Tabla A.8.1 Evolución del estadio fenológico (dosis 25) .....	75
Tabla A.8.2 Evolución del estadio fenológico (dosis 50) .....	75
Tabla A.8.3 ANOVA trifactorial para rendimiento potencial, índice de cosecha, biomasa, P en capítulo, P en tallos y hojas y contenido de P en la planta .....	76
Tabla A.8.4 ANOVA trifactorial para micronutrientes en el material vegetal: Fe, Cu, y Zn en capítulo; Fe, Cu y Zn en tallos y hojas .....	76
Tabla A.8.5 ANOVA trifactorial para pH (1:2,5), conductividad eléctrica (1:5), P Olsen, fosfatasa ácida y fosfatasa básica.....	77
Tabla A.8.6 Producción vegetal de girasol: índice de cosecha.....	77

# 1. INTRODUCCIÓN

El acceso de una mayor parte de la población mundial a los recursos de alimentación y salud, como consecuencia de la intensificación de la producción de alimentos y la globalización de los mercados, ha propiciado que en las últimas décadas se produzca un auge demográfico. Según Naciones Unidas (2017), se estima que, en el año 2050 la población mundial alcance los 9800 millones de personas (<https://news.un.org/es/story/2017/06/1381161>). Para mantener esta tendencia, y de forma paralela, trabajar en el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), aprobados en 2015 por los Estados Miembros de Naciones Unidas, todos los habitantes del planeta deberían contar con igual acceso a los recursos alimenticios.

En este contexto, la agricultura adquiere un papel fundamental, articulando el sector responsable, tanto de la producción de alimentos seguros y de calidad, cuya demanda crece al mismo ritmo que la población, como de la generación de residuos a lo largo de la cadena agroalimentaria, cuya gestión y almacenamiento suponen un importante problema medioambiental. Por este motivo, para incrementar la producción de alimentos y reducir la generación de residuos, el sector agrícola debe optimizar el uso de unos recursos que son cada vez más escasos, además de introducir la utilización de subproductos agroindustriales como insumos agrícolas, aplicando así los principios de economía circular (cierre de ciclos productivos utilizando residuos revalorizados como subproductos que pueden utilizarse en otros ciclos productivos), que permitirá reducir el uso intensivo de las materias primas y adaptar la producción a la situación actual de cambio climático.

Uno de estos recursos escasos es el fósforo (P), segundo elemento más importante en la nutrición vegetal y macronutriente para las plantas. La importancia de este elemento, al ser el responsable de numerosos procesos metabólicos implicados en el crecimiento y desarrollo de las mismas, ha provocado una creciente preocupación por la escasez de sus reservas. La roca fosfórica (RP), mineral del que se genera el 90% del P como fertilizante, es un recurso *no renovable*, cuyas reservas se encuentran bajo grandes tensiones económicas (Chen y Graedel, 2016). Esto, sumado a que su agotamiento se estima entre 2030-2050, pone en compromiso la sostenibilidad de la agricultura (Nesme and Withers, 2016).

Para evitar situaciones de agotamiento de recursos y poder paliar la escasez de aquellos que son imprescindibles para la producción agrícola, como el P, se deberán diseñar e implantar nuevas prácticas agrícolas sostenibles y respetuosas con el medio ambiente, que permitan reducir los efectos del cambio climático a la par que favorezcan un incremento en la producción de alimentos. Entre estas prácticas destacan la recuperación del P procedente de residuos agroindustriales y su aplicación como

fertilizantes de base orgánica en los cultivos, así como el aprovechamiento del legado del P en los suelos agrícolas, que se compone del P aplicado como fertilizante que no ha sido aprovechado por los cultivos (Eichler-Löbermann et al., 2008; Gopinath et al., 2008). Mediante estas prácticas se consigue reducir el problema de la gestión de residuos y se reduce la dependencia de fertilizantes de síntesis química de P, de elevado precio y escasa disponibilidad (Elser et al. 2014).

## **1.1 REGULACIÓN EN MATERIA DE MEDIO AMBIENTE, CAMBIO CLIMÁTICO Y SUELO**

Las distintas organizaciones e instituciones gubernamentales han diseñado estrategias en materia de cambio climático y medio ambiente, que afectan directamente a la producción agrícola, a partir de las medidas que proponen implantar. Por ello, para lograr una situación de equilibrio entre producción y sostenibilidad, el sector agroalimentario deberá adoptar estas medidas y adaptarse así al nuevo contexto productivo.

### **1.1.1 Unión Europea: Un Pacto Verde Europeo**

Como institución internacional, la Unión Europea (UE) ha desarrollado diversos planes estratégicos en este ámbito, siendo el más importante, el Pacto Verde Europeo (*Green Deal*). Este pacto nació con la finalidad de mitigar los efectos que el cambio climático está causando sobre el medio ambiente. Entre sus objetivos principales, destaca el de alcanzar una Europa neutra en emisiones de carbono (C) en el año 2050. Sin embargo, estudios de la Unión Europea (2019), determinaron que en el año 2015 Europa seguía siendo el tercer emisor de estos gases, detrás de China y Estados Unidos, con la agricultura como segundo sector responsable de estas emisiones (10,55%) (<https://www.europarl.europa.eu/news/es/headlines/society/20180301STO98928/emisiones-de-gases-de-efecto-invernadero-por-pais-y-sector-infografia>).

Para hacer frente a los retos planteados, el sector agroalimentario en la UE deberá adoptar las medidas recogidas en la acción por la agricultura del *Green Deal*, donde se apuesta como elemento vertebrador por la Estrategia de la Granja a la Mesa, cuyo objetivo es hacer que los sistemas alimentarios sean justos, saludables y respetuosos con el medio ambiente. En el marco de esta estrategia, se plantean otras iniciativas como reducir en un 20% el uso de fertilizantes antes de 2030, dedicar un 25% de la superficie agraria a la agricultura ecológica e impulsar la Economía Circular. Además, también destaca la adaptación de la nueva reforma de la Política Agraria Común (PAC 2023-2027) a los objetivos del *Green Deal*, esto se conseguirá concretamente mediante los objetivos específicos planteados para la nueva PAC sobre clima y medio ambiente, desde donde se persigue la

mitigación y adaptación al cambio climático promoviendo el desarrollo sostenible y la gestión eficiente de recursos naturales como el agua, el suelo, el aire y la energía, así como mediante el objetivo transversal de sostenibilidad (MAPA, 2019).

### **1.1.2 Unión Europea: Economía Circular**

El concepto de Economía Circular define un nuevo modelo de consumo y producción que permite generar valor añadido en los productos ya existentes, extendiendo su ciclo de vida y cuyo fin práctico consiste en reducir la generación de residuos al mínimo.

Para poder implantar este modelo de consumo de forma práctica, en marzo de 2020, la Comisión Europea adoptó el nuevo Plan de Acción para la Economía Circular. En dicho plan, se recogen 35 acciones que ayudarán a cumplir el Objetivo de neutralidad climática del *Green Deal*, a la par que se reduce la presión sobre los recursos naturales y la dependencia de otros países para su abastecimiento.

De forma particular, en dicho Plan de Acción existe un apartado sobre la aplicación de la Economía Circular en el subsector de la alimentación, el agua y los nutrientes. En este, se enuncia el desarrollo de un futuro Plan de manejo integrado de nutrientes, desde el que se impulsarán medidas para su recuperación de las aguas residuales y lodos de depuradoras, así como los que proceden de otras fuentes naturales como las algas, entre otras posibles fuentes de nutrientes. Todas estas medidas darán cabida al empleo de los subproductos orgánicos en la agricultura, confiriéndoles su correspondiente valor añadido y un gran potencial como insumos agrícolas.

### **1.1.3 Horizonte Europa: Un acuerdo sobre el suelo para Europa**

Desde Horizonte Europa, programa de financiación para la investigación e innovación en el desarrollo y la aplicación de las políticas de la UE, se han desarrollado varias misiones que aportan soluciones concretas a desafíos mundiales planteados antes de 2030. Estas misiones pretenden satisfacer objetivos ambiciosos y relacionados con la transformación de Europa en un continente más verde, saludable, sostenible y resiliente.

De forma concreta, la Misión “Un acuerdo sobre el suelo para Europa” ([https://environment.ec.europa.eu/strategy/soil-strategy\\_es](https://environment.ec.europa.eu/strategy/soil-strategy_es)), cuyo lema es *cuidar del suelo es cuidar la vida*, tiene como objetivo principal liderar la transición hacia suelos sanos antes de 2030. La necesidad de desarrollar esta Misión reside en que, entre el 60 y 70% de los suelos de Europa no son saludables (bajo determinados criterios de funcionalidad y capacidad de provisión de servicios

ecosistémicos), siendo imprescindible su gestión y salvaguarda para alcanzar en 2030 un 75% de suelos sanos en Europa.

Para poder calificar a un suelo como sano, este debe cumplir una serie de criterios específicos entre los que se incluyen la propia salud del suelo, así como su funcionalidad y la capacidad del mismo para proveer servicios ecosistémicos. Desde el punto de vista de la producción agrícola, la salud del suelo se define como la aptitud que tiene el suelo para permitir el crecimiento de los cultivos sin verse degradado, ni dañar el medio ambiente. De esta manera, se diferencia del concepto calidad del suelo, en que la salud del suelo tiene en cuenta los atributos ecológicos del suelo que influyen en capacidad para la producción de un cultivo determinado (Bunemann et al., 2018). Mientras, la funcionalidad del suelo, según Glenk et al. (2012), se define como el conjunto de los procesos que ocurren en el suelo y que sustentan la provisión de servicios ecosistémicos, definiéndose estos últimos, como los beneficios que las personas obtienen de los ecosistemas, en este caso, del suelo (Costanza et al., 1997).

En el marco de esta Misión, se podrán englobar investigaciones como la que se ha llevado a cabo en este estudio, ya que se encuentra estrechamente vinculada con la aplicación de los principios de la Economía Circular para preservar y mejorar la salud y la funcionalidad del suelo. Al mismo tiempo, se satisfacen los objetivos planteados en el *Green Deal*, como son la neutralidad climática, la preservación de la biodiversidad y la gestión integrada de nutrientes; puntos clave de la Estrategia de la Granja a la Mesa.

## **1.2 MANEJO DE FÓSFORO EN LOS SUELOS AGRÍCOLAS**

El uso del P en la agricultura de una forma poco sostenible ha acelerado que la disponibilidad de este elemento, esencial para la nutrición vegetal, y recurso *no renovable* (por la limitada disponibilidad de la roca fosfórica) se vea amenazada. De esta manera, su posible escasez causada por una aplicación continuada y sin control del P como fertilizante en los suelos agrícolas durante décadas, puede ser el origen de una crisis en la producción de alimentos antes de 2050 (Elser and Bennett, 2011). Como muestra de la importancia que tiene el P no solo para la agricultura sino para la geopolítica mundial, son las continuas tensiones regidas por intereses comerciales internacionales. Cabe destacar que las principales reservas de RP se concentran en minas situadas en China, en EEUU y en el Sahara Occidental (Jasinski, 2010), encontrándose estas últimas explotadas por Marruecos. Para evitar que se alcance una situación de no retorno, provocando la inaccesibilidad del sector agrícola a los fertilizantes de P inorgánicos a base de RP, se deberán implementar prácticas que garanticen un manejo sostenible de este nutriente. Entre estas prácticas, se encuentra el aprovechamiento sostenible del P contenido en

el suelo en formas disponibles para los cultivos, que forma parte del legado de P, así como del P presente en otros recursos, como el agua y los subproductos agroindustriales.

### **1.2.1 El legado de P en el suelo**

Tan solo el 20% del P que se utiliza en la agricultura se encuentra en los alimentos que son consumidos por el ser humano (Schröder et al., 2011). Esto significa, que gran parte del P restante se encuentra retenido en el suelo donde es aplicado, o en su defecto, se pierde mediante el lavado del suelo favoreciendo la eutrofización de las masas de agua. El legado de P en los suelos agrícolas incluye todo el P acumulado en el suelo, que ha sido aplicado a partir de fertilizantes y enmiendas, que no ha sido utilizado por los cultivos. Según Sattari et al. (2012) en algunos casos, el legado de P puede alcanzar los 550 kg P ha<sup>-1</sup> en 50 años, equivalente a la fertilización de P media de un suelo entre 9 y 22 años, dependiendo de su disponibilidad, en función de las propiedades físico-químicas del suelo y el clima, e incluso de las estrategias de adquisición de P de los distintos cultivos (importancia de las rotaciones de cultivos, cubiertas vegetales).

Este legado de P se compone de distintas fracciones donde el P se encuentra en diferentes formas, fruto de las reacciones químicas de fijación, inmovilización, adsorción, precipitación, etc., en las que este elemento, aplicado como fertilizante, se ha visto involucrado (Delgado and Scalenghe, 2008). Estas reacciones tendrán lugar en mayor o menor medida dependiendo de las propiedades físico-químicas del suelo, como su pH y mineralogía (Shen et al., 2011; Barrow and Debnath, 2014). Por ello, en función de las características del suelo, el legado de P podrá ser utilizado con mayor o menor dificultad por parte de los cultivos. El aprovechamiento del legado de P por las plantas estará condicionado por las formas en las que este elemento se encuentra en el suelo, así como del grado de disponibilidad de las mismas. Por ello, será imprescindible conocer dónde y cómo se encuentra ya que, en un marco de fertilización sostenible, su aprovechamiento será una de las principales fuentes de P para la agricultura.

De acuerdo con Staver y Brinsfield (2001), el control del legado de P evitará que se agraven los problemas de eutrofización de las aguas derivados de la percolación del P presente en el suelo y en otros recursos, como residuos agroindustriales, hacia capas inferiores y que, en su contribución a ríos, lagos y mares, causen un problema medioambiental de mayor severidad (McDowell et al., 2015). Para alcanzar este propósito, se deben diseñar y poner en práctica estrategias que tengan como objetivo un aprovechamiento integral y sostenible del P, que implique su reciclaje en los propios sistemas agrícolas (Ott and Rechberger, 2012; Recena et al., 2016; 2017). Entre las estrategias de manejo de los nutrientes a lo largo de la cadena agroalimentaria, destaca la de las 5 R, propuesta por Withers et al. (2015) y

que, aplicada al manejo del P, se compone de los siguientes ítems: 1. Reordenar las aplicaciones de P para maximizar su eficiencia; 2. Reducir las pérdidas de P hacia los océanos; 3. Reciclar el P de los recursos biológicos; 4. Recuperar y reutilizar el P de los residuos; 5. Redefinir los requerimientos de P en la cadena agroalimentaria.

### **1.2.2 Formas de fósforo en el suelo y reacciones.**

El suministro de P en la agricultura se ha realizado tradicionalmente mediante la aplicación de fertilizantes de P al suelo donde se desarrollan los cultivos. Sin embargo, la aplicación de fertilizantes inorgánicos de P no implica que este elemento se encuentre disponible de forma inmediata para la nutrición de las plantas ya que, un porcentaje del fertilizante aplicado suele inmovilizarse de una forma más o menos rápida (Sample et al., 1980). De esta forma, esta porción de fertilizante inmovilizado no llega a estar disponible para los cultivos hasta que no ocurra una reacción que de nuevo lo transforme en P fitodisponible (Richardson et al., 2011). Sin embargo, una fracción considerable del P aplicado como fertilizante precipita (como fosfatos de Ca y Fe, en función de las características del suelo) rápidamente cuando éste se solubiliza, al alcanzarse elevadas concentraciones de P en las inmediaciones del gránulo de fertilizante. Otra vía por la cual, una parte del P inorgánico aplicado deja de estar disponible para los cultivos, es la adsorción del mismo por los minerales presentes en el suelo, como arcillas, óxidos de hierro (Fe) y aluminio (Al) o carbonatos de calcio (Ca), además de su incorporación en la materia orgánica del suelo (Frossard et al., 2000; Shen et al., 2011). No obstante, esta adsorción dependerá de la naturaleza de los fertilizantes utilizados y de las propiedades físico-químicas del suelo, las cuales, en los suelos calcáreos influyen de una forma más acusada sobre la fijación de los fosfatos (Chand y Tomar, 1994).

La preocupación de forma generalizada por la fracción de P inorgánico en el suelo es el motivo principal de que, los fertilizantes de P solubles en agua como los superfosfatos simples y triples se hayan utilizado como estrategia de fertilización fosfatada en el desarrollo de los cultivos tanto en suelos ácidos como alcalinos (Domínguez, 1996). Sin embargo, la elevada rapidez con la que estos fertilizantes se solubilizan y pasan a formas de P no lábiles, suponiendo una escasa eficiencia en el uso del P, hace que se hayan buscado alternativas, como la aplicación de RP tanto en suelos ácidos como básicos.

En los suelos ácidos, la aplicación directa de RP, además de reducir las pérdidas de P por lavado o inmovilización debido a su menor solubilidad (He et al., 1999), ha permitido alcanzar una efectividad similar a largo plazo que la aplicación de superfosfatos (Chien & Hammond, 1989; Zoysa et al., 2001). Sin embargo, a corto plazo, su eficiencia como fuente de P es menor que los fertilizantes solubles en

agua (Domínguez, 1996). Entre las estrategias para aumentar la disponibilidad de P a partir de la RP se encuentra la aplicación de bioestimulantes edáficos que incrementan la actividad de las enzimas del suelo (Rodríguez-Morgado et al., 2015). La acción de estas enzimas, junto con microorganismos solubilizadores de fósforo (Jorquera et al., 20014; Sundara et al., 2002) y rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (de Freitas et al., 1997), incrementan el contenido de P de la solución del suelo, encontrándose en formas que las plantas pueden tomar fácilmente.

Otros fertilizantes, como los que proceden de residuos orgánicos, realizan aportaciones de P al suelo principalmente en formas orgánicas que, para transformarse en P disponible para los cultivos, deberán ser mineralizadas por los microorganismos del suelo. Sin embargo, en algunos de ellos, el P inorgánico será la forma principal en la que se encuentra este elemento. Estudios realizados por García-Albacete et al. (2012) y Sinaj et al. (2002) determinaron la presencia de P orgánico tan solo entre un 1 y un 30% del P total en residuos orgánicos de distinto origen y sometidos a diferentes tratamientos. No obstante, en la mayoría de estos residuos, como el estiércol procedente de diferentes especies animales, el contenido de P orgánico puede alcanzar hasta un 80% del P total presente en los mismos (Pagliari y Laboski, 2012; 2013).

Entre las principales ventajas que conlleva la aplicación de fertilizantes de base orgánica como fuente de P al suelo, está el aporte de materia orgánica que se aplica al mismo (elemento clave en la funcionalidad y salud del suelo) y que supone un aumento de la presencia y actividad de los microorganismos en el suelo (Ehlers et al., 2010; Krey et al., 2013). Esta actividad microbiana incrementa la dinámica del P en el suelo, debido a la inmovilización del P inorgánico y a la mineralización del P orgánico, así como la síntesis de P que realizan los microorganismos (Richardson y Simpson, 2011). En paralelo al mencionado incremento de la actividad microbiana en el suelo, hay que mencionar el aumento de la actividad de las enzimas del suelo como las fosfatasas ácidas y básicas, que son excretadas tanto por los cultivos, como por los microorganismos (Dick et al., 2000) y que actúan como catalizadores de la hidrólisis de formas orgánicas de P como los ésteres y anhídridos de ácidos fosfóricos (Eivazi y Tabatabai, 1977). Sin embargo, la susceptibilidad con la que estas formas orgánicas de P son degradadas por las enzimas del suelo hacia formas de P inorgánico difiere entre las mismas (Bowman y Cole, 1978). Esta temática es motivo de estudio y diversos autores como Anaheim et al. (2013) y He et al. (2004) han evaluado la capacidad de hidrólisis de formas orgánicas de P mediante aplicaciones de enzimas fosfatasas junto a compost y otras enmiendas orgánicas.

De esta forma, mediante la aplicación de fertilizantes de base orgánica se complementa tanto la fracción de P inorgánico, como orgánico en el suelo, representando este último un elevado porcentaje

del P total en el suelo (Nash et al., 2014), que en el caso de los suelos mediterráneos puede alcanzar hasta un 75 % (Recena et al., 2017). En esta fracción orgánica, se incluyen diferentes formas de P que a priori, se encuentran en menor disponibilidad para los cultivos. Sin embargo, tras su hidrólisis a cargo de las enzimas y de los microorganismos del suelo, el P orgánico se transforma en P inorgánico, incrementando el contenido de P disponible para su absorción por parte de los cultivos.

### **1.3 RECUPERACIÓN DE FÓSFORO A PARTIR DE SUBPRODUCTOS ORGÁNICOS**

En 2007 la Comisión Europea comenzó a establecer distinciones entre residuos y subproductos. En este último concepto, se engloban aquellos residuos de producción que pueden ser reutilizados en otros procesos productivos de forma segura y sin necesidad de transformaciones previas. Sin embargo, para mejorar las características de estos subproductos, de forma que puedan ser utilizados como fertilizantes de base orgánica, se deberán someter a tratamientos previos como el compostaje, el digerido, el secado, la estabilización biológica, etc.

Para contrarrestar el manejo ineficiente del P como fertilizante descrito en apartados anteriores, se requieren estrategias que permitan la reincorporación de este nutriente en los sistemas agroindustriales (Ott y Rechberger, 2012). Una de las alternativas más estudiadas para recuperar y el reciclar el P, reside en la reutilización de los distintos residuos orgánicos, generados a lo largo de la cadena alimentaria y en otros sectores que, siendo ricos en P, han sido desechados hasta hace escasos años.

#### **1.3.1 Fertilizantes de fósforo de base orgánica**

Entre los subproductos orgánicos destacan los que proceden de la producción ganadera y agrícola, así como los residuos sólidos urbanos y lodos generados en la depuración de las aguas residuales urbanas, cuya riqueza en P es, en parte, consecuencia del lavado de este elemento por la escorrentía en los sistemas agrícolas y su filtración hacia las masas de agua superficiales y subterráneas que abastecen el consumo humano e industrial. Además, existen subproductos extrínsecos a la producción agroalimentaria, como los digestatos anaeróbicos generados durante la obtención de energía en plantas de biogás, cuyo contenido de P es necesario tener en cuenta (Withers et al., 2014).

Entre los subproductos agroindustriales que tienen un mayor contenido de P destaca el estiércol que, según MacDonald et al. (2011), acumula alrededor del 40% del P total utilizado en la agricultura y cuyos efectos sobre la disponibilidad de P en el suelo han sido ampliamente estudiados (Pizzeghello et al., 2011). Otros subproductos de origen animal son la harina de sangre o hemoabono estabilizado,

procedente de la industria cárnica, y el vermicompost, resultado de la descomposición de la materia orgánica por las lombrices presentes en el suelo y cuya utilización se ha extendido en los últimos años. Por el contrario, existe mucha menos información sobre el aprovechamiento de los residuos procedentes de los cultivos (Damon et al., 2014), entre los que se encuentra el alperujo, generado durante molturación de las aceitunas para la obtención de aceite de oliva. Como consecuencia, son escasos los estudios científicos que han tratado el efecto de la aplicación de estos subproductos sobre la eficiencia en el uso del P y las formas de este, presentes en el suelo.

En el diseño de las diferentes estrategias de manejo sostenible del P habrá que considerar la presencia en estos subproductos orgánicos de formas orgánicas e inorgánicas de P (He et al., 2009), las cuales interaccionan con la materia orgánica y los minerales del suelo, participando en reacciones de adsorción y precipitación (Delgado et al., 2002). Además, para poner a disposición de los cultivos estas formas orgánicas de P, será necesaria la actividad de las enzimas hidrolíticas del suelo.

Una de las formas de P orgánico predominante en los residuos agrícolas, ganaderos y urbanos, que también es producido mediante el metabolismo microbiano, es el inositol hexafosfato, también denominado ácido fítico (IP6). Sin embargo, la disponibilidad para los cultivos de esta forma de P orgánico dependerá de su desorción de la fase sólida del suelo y no tanto de la hidrólisis llevada a cabo por las enzimas rizosféricas fitasas (García-López y Delgado, 2016). De esta forma, de nuevo se evidencia la importancia de identificar las propiedades específicas del suelo que influyen de forma directa en la dinámica del P en el suelo y en su fitodisponibilidad.

### **1.3.2 Síntesis de fertilizantes minerales a partir de subproductos orgánicos**

La autorización para la producción de fertilizantes a partir de diversas fuentes, como los materiales reciclados, establecida en la nueva regulación europea de fertilizantes (2019/1009), ha contribuido a que la síntesis de fertilizantes minerales a partir de subproductos orgánicos y su comercialización se haya incrementado considerablemente en los últimos años. Entre estos fertilizantes minerales se encuentran la estruvita y la vivianita, dos fosfatos poco solubles que, además de ser ricos en P, también contribuyen al aporte de macronutrientes como el magnesio (Mg) y micronutrientes como el hierro (Fe), respectivamente. La obtención de estos fertilizantes se consigue a partir del P contenido en las aguas residuales, el cual puede recuperarse fácilmente y de forma cada vez más eficiente (Schoumans et al., 2015; Hukari et al., 2016). Además, la estruvita también es sintetizada mediante la precipitación de los nutrientes contenidos en los digestatos de las plantas de biogás.

Tradicionalmente, estos fertilizantes se habían considerado poco eficientes en cuanto a su aporte de P debido a su escasa solubilidad. Sin embargo, un estudio desarrollado por de Santiago et

al. (2008), demostró que, en el caso de la vivianita, los ácidos orgánicos secretados por las plantas y por los microorganismos permiten una liberación gradual del P (y del Fe) en la rizosfera. De esta forma, se consigue reducir la precipitación del P con calcio (Ca) en forma de fosfatos insolubles en suelos calcáreos (Saavedra et al., 2007), los cuales representan el 60% de las tierras de cultivo en España.

Así, como consecuencia de su menor solubilidad, estos fertilizantes presentan una mayor eficiencia en el uso del P que aquellos con una mayor solubilidad. No obstante, se necesitan estudios que permitan conocer el efecto de estos fertilizantes sobre la dinámica del P y sobre cómo afectan las propiedades del suelo y las actividades enzimática y microbiana a su eficiencia en el uso de este nutriente.

Esta mayor eficiencia en el uso del P se demostró en ensayos de cultivo en los que aplicación de estruvita, en comparación con el triple superfosfato reportó mayores rendimientos en colza (Katanda et al., 2016) y maíz (Gell et al., 2011). Del mismo modo se obtuvieron mayores eficiencias relativas de P con las aplicaciones de estruvita respecto a los triples superfosfatos en ensayos en invernadero con 5 cultivos diferentes (Vogel et al., 2017). Estos resultados pueden asemejarse a los obtenidos mediante la aplicación de fertilizantes a base de cenizas de lodos de depuradoras, los cuales supusieron mayores absorciones de P que los triples superfosfatos para tres especies vegetales distintas (Franz, 2008).

#### **1.4 INTERACCIÓN ENTRE EL FÓSFORO Y OTROS NUTRIENTES**

En ocasiones, la aplicación de subproductos como fertilizantes de base orgánica para suplir las necesidades de nitrógeno (N) en los cultivos, hace que se alcancen elevadas relaciones P:N en los mismos, al aplicar mediante estos subproductos cantidades de P superiores a las requeridas. La consecuencia directa de poner en práctica esta estrategia es una acumulación de P en el suelo, que además de incrementar el legado de P, puede causar serios problemas medioambientales por el lavado del P excedente y la consiguiente eutrofización de las masas de agua (MacDonald et al., 2011).

Las estrategias que, por lo tanto, deben implantarse para realizar una gestión sostenible de los nutrientes, optimizando las aplicaciones de los mismos mediante subproductos orgánicos o fertilizantes procedentes de los mismos, implica desarrollar un conocimiento más profundo en cuanto a los nutrientes presentes en estos fertilizantes de base orgánica, así como de su efecto sobre la dinámica del P.

Otros nutrientes que pueden experimentar interacciones con el P, tanto en el suelo, como en las plantas, son los micronutrientes Fe y cinc (Zn), con los cuales puede desarrollar relaciones de antagonismo (Sánchez-Rodríguez et al., 2013; 2014; 2017). Sin embargo, la aplicación de fertilizantes de P poco solubles como la vivianita pueden reducir los efectos antagónicos entre el P y el Fe, ya que la vivianita es una fuente importante de este último (Rosado et al., 2002). La aplicación de otros fertilizantes como la estruvita, fuente de Mg, pueden ser interesantes en suelos calcáreos donde este elemento se muestra en niveles bajos. Por otro lado, el antagonismo desarrollado entre P y Zn reside en la disminución de la fitodisponibilidad de este último, como consecuencia de aplicaciones excesivas de P sobre suelos calcáreos que presentan un pH básico (Alloway, 2009). Esta afirmación se corrobora mediante el estudio desarrollado por Sánchez-Rodríguez et al. (2021), donde se demostró que, en suelos calcáreos con limitaciones de Zn, la aplicación combinada de este elemento junto al P incrementó significativamente la producción y la calidad del grano en el cultivo de maíz, como consecuencia de un incremento en la fitodisponibilidad del Zn. Este tipo de interacciones no se ha estudiado tan ampliamente cuando se utilizan fertilizantes de base orgánica en comparación con la aplicación de fertilizantes de síntesis química.

Finalmente, para realizar un manejo integral de los nutrientes en el suelo, estos deberán aplicarse y utilizarse de la forma más eficiente posible, para lo que será necesario conocer su presencia en el suelo y los requerimientos que presentan los cultivos. Como estrategia, la aplicación de fertilizantes de base orgánica en los suelos mediterráneos incrementará el contenido de materia orgánica en el suelo y como consecuencia aumentará la presencia y la actividad de los microorganismos. Esta mayor actividad microbiana contribuirá a mejorar la salud del suelo y su funcionalidad (mayor intercambio y disponibilidad de nutrientes, secuestro de C, mejor estructura del suelo, incremento de la biodiversidad, etc.), además, mediante su mineralización, se pondrá una mayor cantidad de nutrientes a disposición de los cultivos. En todos los casos se debe estudiar previamente la influencia de estos fertilizantes y de las propiedades físico-químicas de cada suelo, en la dinámica de dichos nutrientes tanto en el suelo, como en los cultivos, de modo que se maximice la eficiencia en el uso de estos elementos.



## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es evaluar el efecto residual de la aplicación de cuatro fertilizantes de base orgánica procedentes de la agroindustria como fuente de P en el cultivo de girasol, como segundo cultivo de una rotación (trigo – girasol). Para ello se realizarán ensayos experimentales en macetas en cámara de crecimiento planteándose los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la dinámica de distintos subproductos de la agroindustria y residuos sólidos urbanos estabilizados, en suelos con distintas propiedades físico-químicas;
- Analizar el efecto de la dosis de aplicación de los subproductos (0, 25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>)
- Realizar una comparación del efecto en el suelo (propiedades físico-químicas y biológicas) y en la planta (absorción de P y micronutrientes, crecimiento, producción de biomasa) entre los distintos fertilizantes de P de base orgánica y un fertilizante de P tradicional.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ENSAYO DE CULTIVO EN MACETAS

Para alcanzar los objetivos planteados en este estudio, se desarrolló un ensayo de cultivo en macetas bajo condiciones controladas (fotoperiodo, humedad y temperatura) utilizando 4 suelos distintos y una planta de girasol (*Helianthus annuus* L.) de la variedad ES Electric en cada maceta (unidad experimental). El ensayo del presente TFM fue el segundo de la rotación trigo – girasol, que se sucedió tras el cultivo de trigo, utilizando el mismo suelo. La aplicación al suelo de diferentes fertilizantes de base orgánica de P en comparación con un fertilizante inorgánico de P y un control negativo (sin P), a dos dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>), únicamente se realizó al inicio de la rotación.

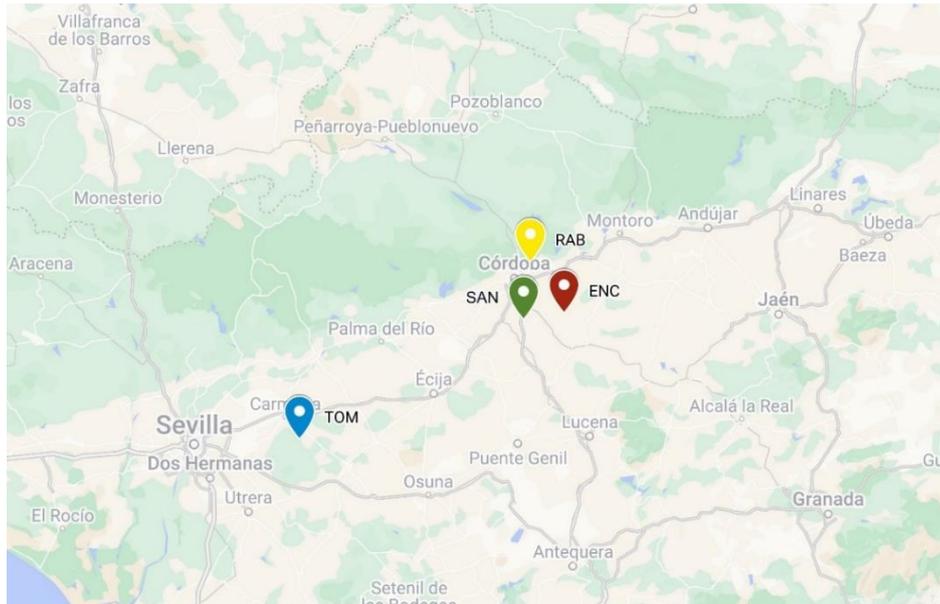
##### 3.1.1 Localización y recogida de las muestras de suelo

Para realizar este estudio se utilizaron muestras de 4 suelos con distintas características físico-químicas, que fueron recogidas de fincas en las que la Unidad de Edafología (grupo PAIDI AGR-165; Departamento de Agronomía, UCO) desarrolla ensayos de campo. Estas muestras se recogieron al inicio del primer ensayo de cultivo en macetas (trigo), que formó parte de la rotación mencionada. La localización de las fincas en las que se tomaron dichas muestras se observa en el mapa adjunto (Figura 3.1) y en la Tabla 3.1 (coordenadas), donde también se indica el material parental de cada suelo. De ellos, el más arenoso Rabanales (RAB) es un suelo de terraza del río Guadalquivir. Los tres restantes proceden de vertisoles calcáreos ubicados en las campiñas de Carmona (Sevilla), Tomejil (TOM) y Córdoba, Sancho Miranda (SAN) y Encineño (ENC).

Las muestras de suelo se recogieron de los 20-30 cm superficiales (capa arable) y se tamizaron a 1 cm para la eliminación de rocas y restos vegetales. A su vez, se tomó una submuestra de 500 g que fue tamizada a 2 mm para la caracterización de estos suelos mediante análisis de laboratorio.

**Tabla 3.1. Situación y clasificación de los suelos utilizados**

Código	Suelo	Término municipal	Coordenadas		Material Parental
			Latitud N	Longitud W	
1	RAB	Finca de Rabanales (Córdoba)	37° 56' 02"	4° 43' 17"	Sedimento (Cuaternario)
2	TOM	Carmona (Sevilla)	37° 24' 03"	5° 35' 15"	Arcillas grises (Cuaternario)
3	SAN	Fernán – Núñez (Córdoba)	37° 45' 41"	4° 44' 41"	Margas (Mioceno)
4	ENC	Santa Cruz (Córdoba)	37° 46' 51"	4° 35' 34"	Margas (Mioceno)



**Figura 3.1.** Localización de las muestras de suelo. Fuente: Google Maps

### 3.1.2 Caracterización de los suelos utilizados

Los 4 suelos utilizados se analizaron en laboratorio con el objetivo de conocer sus propiedades físico-químicas (suelo secado al aire durante una semana y tamizado a 2 mm). Las determinaciones en laboratorio se realizaron por triplicado y son las que se comentan a continuación.

#### 3.1.2.1 Humedad Higroscópica

La humedad higroscópica es aquella que, tras secar el suelo a temperatura ambiente, permanece absorbida en las partículas de los diferentes componentes del suelo. Para su determinación, se pesó una cápsula de aluminio vacía (P1, Figura 3.2), a la que se añadieron alrededor de 10 g de suelo seco al aire, anotando el peso de la cápsula con el suelo (P2). Posteriormente, se introdujo la cápsula en una estufa a 105 °C hasta alcanzar peso constante (24 horas). Finalmente, estas se sacaron de la estufa y se anotó su peso seco (P3), tras haberse dejado enfriar. Para calcular el porcentaje de humedad higroscópica se utilizó la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\text{Ecuación 1: Humedad Higroscópica (HH) (\%)} = \frac{P2 - P3}{P3 - P1} \times 100$$

A partir de este valor se calculó el Factor de Humedad Higroscópica (F) mediante la siguiente ecuación:

**Ecuación 2:** Factor de Humedad Higroscópica (F) = 
$$\frac{100}{100 + HH(\%)}$$



**Figura 3.2.** Cápsulas de aluminio para humedad higroscópica

### 3.1.2.2 Determinación de la textura

Se realizó la determinación según el método de la pipeta de Robinson (Gee y Bauder, 1979), basado en la ley de Stokes, es decir, en la diferente velocidad de sedimentación de partículas de distinto diámetro. Los resultados se expresaron en porcentaje, de acuerdo con el tamaño de partícula: partículas entre 0,05 mm y 2 mm, arena; partículas entre 0,05mm y 0,002 mm, limo; partículas de tamaño inferior a 0,002 mm, arcilla.

### 3.1.2.3 Determinación de la materia orgánica

El método utilizado para su determinación fue el de Walkley-Black (1934). Para ello se pesó 1 g de suelo en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se añadieron 10 ml de dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ) 1 N y 20 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado. Se agitó la mezcla y se dejó reposar durante 30 minutos, durante los cuales el  $K_2Cr_2O_7$  oxidó al carbono orgánico del suelo en presencia de  $H_2SO_4$  en exceso. Acto seguido, se añadieron 200 ml de agua desionizada y 5 gotas de ortofenantrolina (indicador colorimétrico), para valorar con  $FeSO_4$  ( $\approx 0,5$  N) el  $K_2Cr_2O_7$  en exceso, que no había reaccionado con el carbono orgánico del suelo. La cantidad de  $K_2Cr_2O_7$  consumida, se relaciona con la cantidad de carbono orgánico oxidado. Finalmente, la cantidad de materia orgánica se calculó multiplicando la cantidad de carbono orgánico oxidado por 1,72, teniendo en cuenta que el 58 % de la materia orgánica del suelo está compuesta por carbono orgánico.

#### 3.1.2.4 Determinación de los carbonatos

El método utilizado para determinar los carbonatos presentes en cada muestra de suelo fue el de Wesemael (van Wesemael et al., 1995). Para ello, se hicieron reaccionar 3 g de suelo con 8 ml de HCl concentrado en un matraz Erlenmeyer de 150 ml de capacidad, agitando durante 30 segundos, cada 5 minutos hasta que no se obtiene ninguna burbuja (producto de la reacción del HCl con los carbonatos del suelo, Ecuación 3). Así su determinación se obtuvo mediante la diferencia de pesada antes y después de la reacción:



#### 3.1.2.5 Determinación del pH

El pH del suelo se midió en una suspensión suelo:agua 1:2,5. Para ello, se pesaron 8 g de suelo en un recipiente de 50 ml (tubo Falcon® para centrífuga) y se añadieron 20 ml de agua desionizada. A continuación, se agitó la suspensión durante 25 minutos. Para proceder a la medida del pH, se calibró el pH-metro (Crisol GLP 21) con los tampones necesarios (4, 7 y 9), se introdujo el electrodo del pH-metro en el líquido sobrenadante sin que el bulbo de vidrio entrase en contacto con las partículas de suelo y tras la estabilización de la medida, se anotó el pH de cada muestra.

#### 3.1.2.6 Determinación de la Conductividad Eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) se midió en el extracto 1:5. Para ello, a la suspensión preparada para determinar el pH (1:2,5), se añadieron otros 20 ml de agua desionizada. A continuación, se agitó la suspensión durante 30 minutos y tras ello, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Finalmente se procedió a la calibración del conductímetro (Crison micro CM 2200), y a la medida de la CE ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), anotando la lectura registrada al introducirse éste en el líquido sobrenadante.

#### 3.1.2.7 Determinación del fósforo soluble en bicarbonato sódico

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Olsen et al. (1954). Para la extracción, se pesaron 1,5 g de suelo en un recipiente de 50 ml de capacidad (tubo Falcon® para centrífuga) y se añadieron 30 ml de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 0,5 M tamponado a pH 8,5. A continuación, se agitó durante 30 min a 180 rpm y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min, recogiendo el sobrenadante en tubos de 10 ml.

Para la determinación, se tomó 1 ml de esta disolución, colocándose en un tubo desechable de 10 ml, al que se añadieron 0,125 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 5 N, 4,125 ml de agua desionizada y 1 ml de reactivo mixto, compuesto por una mezcla de una disolución de molibdato amónico 0,04 M, tartrato de antimonio y potasio 0,01 M y ácido sulfúrico 5 N (Reactivo A), y por una disolución de ácido ascórbico 0,03 M. Para realizar la cuantificación del P, se construyó una curva de calibrado mediante 8 patrones (0; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1 y 2,4  $\mu$ l) a partir de una disolución de fósforo (P) de  $100\text{ mg l}^{-1}$ , a los cuales se añadió 1 ml de  $NaHCO_3$ , y el mismo volumen de agua desionizada y reactivo mixto que a las muestras. Acto seguido se agitaron las muestras y los patrones mediante un agitador vortex y se esperó 30 minutos (tiempo óptimo para el desarrollo del color azul). Finalmente se transfirió una alícuota de 0,2 ml de las muestras y los patrones en una microplaca de 96 pocillos, introduciéndola en el espectrofotómetro de microplacas BioTek PowerWave HT (Figura 3.3) y midiendo su absorbancia a 882 nm, a partir de la cual se determinó el P extraído.



**Figura 3.3** Espectrofotómetro de microplacas BioTek PowerWave HT

### **3.1.2.8 Determinación de la disponibilidad de micronutrientes en el suelo**

La determinación de la disponibilidad de micronutrientes en el suelo permitió conocer el contenido de hierro (Fe), cobre (Cu), y zinc (Zn), existente en el suelo que se encuentra disponible para los cultivos. Para su extracción se utilizó el método descrito por Lyndsay y Norwell (1978), que empleaba como solución extractante ácido dietilendiaminopentacético (DTPA) 0,05 M, Cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ) 0,01M y trietanolamina (TEA) 0,1 M a pH 7,3. Para ello, se pesaron 10 g de suelo en tubo Falcon® para centrífuga de 50 ml y se añadieron 20 ml de la solución extractante descrita. A continuación, se agitó durante 2 horas a 180 rpm y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, transfiriendo el sobrenadante a tubos de ensayo de 10 ml.

Para la cuantificación de los micronutrientes se utilizó el espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 200 (Figura 3.4), instalando la lampara específica para cada elemento y la configuración adecuada. A continuación, el capilar del instrumento se sumergió en el blanco (agua desionizada) y se leyeron los patrones de cada elemento (Tabla 3.4), para construir su correspondiente curva de calibrado. Finalmente se analizaron las muestras, obteniendo directamente la concentración de cada elemento en la extracción, a partir de la cual se determinará la concentración en las muestras de suelo. En el caso de que alguna muestra tuviese una concentración superior a la del patrón de mayor concentración, se procedió a su dilución y a la repetición de su lectura.



**Figura 3.4** Espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 200 PerkinElmer ®

<b>Tabla 3.2 Patrones Micronutrientes para absorción atómica</b>			
Elemento	P1	P2	P3
	mg l <sup>-1</sup>	mg l <sup>-1</sup>	mg l <sup>-1</sup>
Fe	1	3	5
Cu	0,5	0,5	2
Zn	0,25	0,5	1

### 3.1.3 Diseño experimental y preparación del suelo

Para llevar a cabo los dos ensayos de cultivo en macetas, que componen la rotación trigo-girasol de la que forma parte éste estudio, en primer lugar, y antes de comenzar el primer ensayo, sobre las muestras de suelo tamizadas a 1 cm, se aplicaron 5 tratamientos de fertilización de P en dos dosis,

equivalentes a 25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup> suelo. De estos tratamientos, 4 están compuestos por distintos subproductos procedentes de la agroindustria y el quinto se corresponde con un fertilizante inorgánico de P. Además, se estableció un control negativo (sin aplicación de P). Los 5 tratamientos aplicados en dos dosis más el control negativo resultan en 11 estrategias de fertilización, que al aplicarse sobre 4 suelos distintos y estableciendo 5 repeticiones (unidades experimentales) por cada combinación de suelo, tratamiento y dosis, dan lugar a 220 unidades experimentales. Estas unidades experimentales son macetas de 300 ml de capacidad, con 250 g del correspondiente suelo fertilizado y una planta de cada cultivo, trigo (ensayo previo) o girasol (estudio incluido en el presente TFM), respectivamente, para cada ensayo de la rotación.

### 3.1.3.1 Diseño y aplicación de fertilizantes

De los tratamientos aplicados, como control positivo se utilizó un fertilizante de P de síntesis química, superfosfato simple (18% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y como control negativo (C), la no aplicación de P. Los tratamientos restantes se componen de subproductos procedentes de distintos sectores de la agroindustria cuyas principales propiedades se presentan en la Tabla 3.3: Harina de Sangre (HAS), Alperujo (ALP), Residuo Sólido Urbano (RSU) y Vermicompost (VER).

**Tabla 3.3 Propiedades químicas de los subproductos utilizados como fuentes de P en el ensayo en macetas de la rotación trigo-girasol**

Producto	pH	CE <sub>1:5</sub> mS cm <sup>-1</sup>	MO %	C %	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Fe %	Zn %	Cu %
HAS	6,8	4,1	98,3	57,0	15,7	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	2,7	0,8
ALP	7,5	5,0	77,0	41,3	1,9	0,2	2,1	6,9	0,6	0,4	3,1	6,0
RSU	7,1	4,0	56,9	34,7	1,7	0,3	0,6	6,5	0,7	0,5	26,5	9,7
VER	7,6	2,2	50,3	26,1	2,2	0,7	0,9	9,5	0,6	0,6	14,7	2,6

CE<sub>1:5</sub>: Conductividad eléctrica en el extracto 1:5. MO (%): Porcentaje de materia orgánica. C, N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu (%): Elementos totales en porcentaje.

Estos 5 tratamientos se aplicaron en las dos dosis mencionadas. Para ello, conociendo el contenido de P que tiene cada producto o subproducto, se calculó la cantidad correspondiente a aplicar por cada lote de 1250 g de suelo (250 g de suelo repetición<sup>-1</sup> por 5 repeticiones estrategia<sup>-1</sup>), dependiendo del tratamiento y de la dosis. Así tras la aplicación de estas estrategias de fertilización, se obtuvieron los siguientes lotes de suelo, que se resumen en la Tabla 3.4, junto con el código que servirá de identificador para cada lote de aquí en adelante.

Suelo	Tratamiento	Dosis mg P kg suelo <sup>-1</sup>
	C	0
RAB	P	
TOM	HAS	25
SAN	ALP	50
ENC	RSU	
	VER	

Una vez se aplicaron las 11 estrategias de fertilización en los 4 suelos (44 lotes de suelo), incluyendo los controles negativos correspondientes, se dividió cada lote en 5 repeticiones o macetas con 250 g de suelo, sobre las que se desarrolló el primer ensayo de cultivo de la rotación (trigo), enmarcado en un estudio previo a este TFM.

### **3.1.3.2 Preparación del suelo**

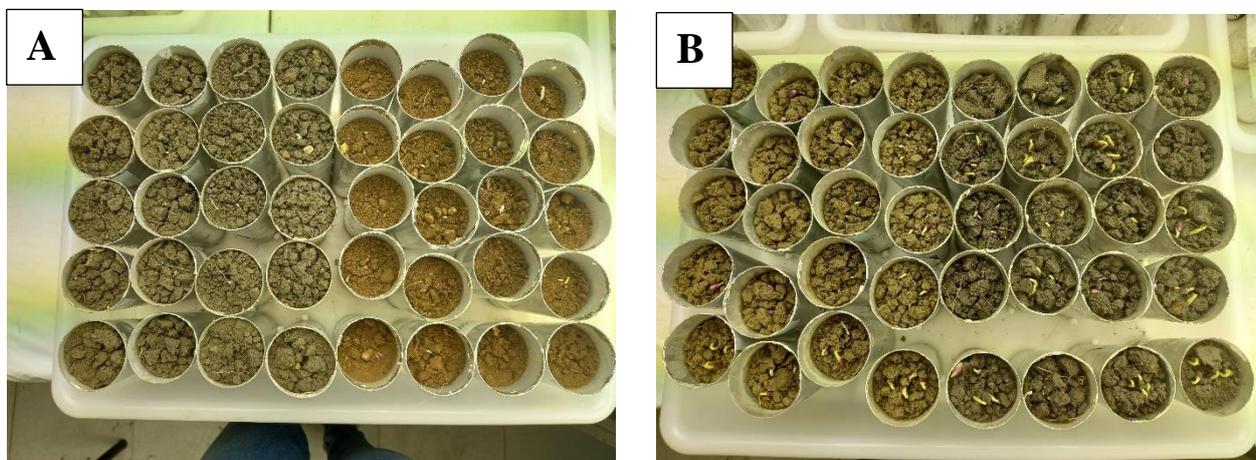
Una vez finalizado el primer ensayo de cultivo de trigo en macetas, se procedió a su cosecha y al posterior procesado del suelo sobre el que se cultivó. Para ello, el suelo de las 5 repeticiones que conformaban cada lote de suelo se recogió, eliminándose las raíces de mayor diámetro del cultivo de trigo y se mezcló, volviendo a constituir los lotes de suelo correspondientes a cada estrategia de fertilización. Tras su secado al aire, se tamizó a 1 cm, de forma que se encontrase preparado para el siguiente cultivo de la rotación (girasol). De cada lote, además, se tomó una submuestra de 50 g para los posteriores análisis de laboratorio, la cual se tamizó a 2 mm.

Por último, se mezclaron los 1200 g de suelo de cada lote, los cuales se redistribuyeron en las 5 repeticiones que lo componen, de forma que cada maceta se llenó con 240 g de suelo procedente del primer cultivo de la rotación.

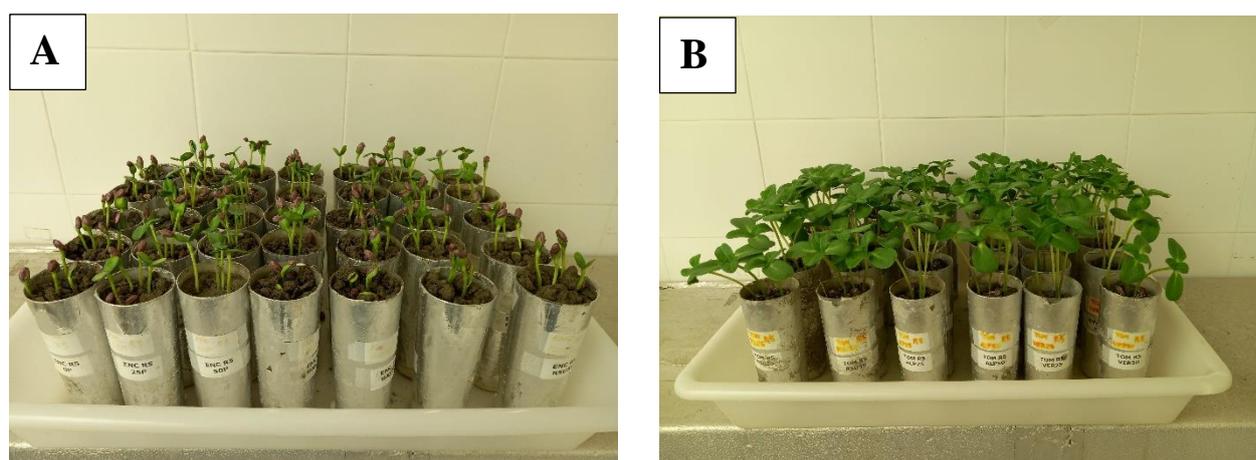
### **3.1.4 Siembra y desarrollo del cultivo**

Las plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.), de la variedad ES Electric, se desarrollaron en macetas de 300 ml de capacidad, recubiertas de papel de aluminio para evitar el paso de la luz y con un orificio de drenaje de 8 mm de diámetro en la parte inferior. Como se mencionó anteriormente, se llenaron con 240 g de suelo procedente del ensayo de trigo, humedeciendo los primeros centímetros antes de la siembra con 40 ml de agua desionizada. A continuación, se colocaron 3 semillas por maceta, a 0,5 cm de profundidad y sin germinación previa (Figura 3.5), emergiendo las plántulas entre los 3 y

5 días después de siembra (DDS) (Figura 3.6). A los 10 DDS se cortaron 2 plántulas de cada maceta de forma aleatoria, conservando así, una plántula por maceta.



**Figura 3.5** Germinación de las semillas. (A) suelos ENC (i) y RAB (d) y (B) suelos SAN (i) y TOM (d)



**Figura 3.6** Plántulas de girasol. 7 días después de siembra (A) y 10 días después de siembra (B).

Este ensayo de cultivo en macetas se desarrolló en cámara de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas: fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 24/22 °C día/noche y humedad relativa del 70%. Las macetas se regaron diariamente con agua desionizada para mantener una humedad en el suelo cercana a la capacidad de campo (90% de capacidad de campo), pesando una vez a la semana todas las macetas para ajustar las diferencias de humedad en el suelo debidas a la evapotranspiración.

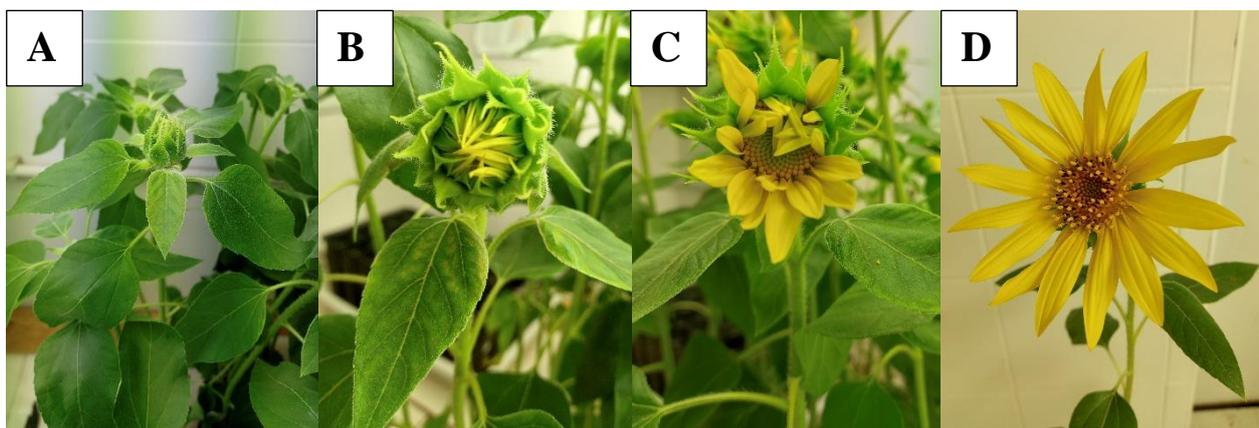
Para evitar diferencias en el aporte de nutrientes a las unidades experimentales, derivadas de la aplicación de los tratamientos de P (subproductos de distinta naturaleza), la fertilización de todas las macetas se complementó mediante una solución Hoagland modificada ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (5 mM),

KNO<sub>3</sub> (6 mM), MgSO<sub>4</sub> (2 mM), Fe (EDDHA) (40 μM), KCl (100 μM) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (50 μM), MnSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O (4 μM), ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (4 μM) CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O (1 μM), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (6 μM)), mientras que el P se suministró exclusivamente mediante los tratamientos aplicados al inicio del primer ensayo de la rotación (trigo). A lo largo del ciclo de cultivo y mediante aplicaciones semanales, se suministró un volumen total de 220 ml de la solución Hoagland modificada a cada unidad experimental, complementando las necesidades hídricas del cultivo.

### 3.1.5 Determinaciones y medidas durante el ensayo de cultivo

Durante el ensayo de cultivo del girasol se tomaron medidas de distintas variables con una frecuencia próxima a las tres semanas. Concretamente, se midió la altura, el índice de clorofila, el diámetro del tallo y el estadio fenológico de cada planta de girasol a los 21, 42, 62 y 76 DDS.

Para medir la altura se utilizó una cinta métrica, tomando la medida desde el suelo hasta el ápice de la planta o del capítulo. Sin embargo, tras comenzar la floración, la altura se tomó hasta la curvatura del tallo, que une el receptáculo del capítulo con el resto de la planta. El valor del índice de clorofila se obtuvo mediante el dispositivo MINOLTA 502-SPAD (unidades SPAD), para ello se realizó una medida en cada una de las 5 últimas hojas totalmente expandidas, tomando la media de estas medidas. El diámetro del tallo se midió a una altura de 4 cm desde el suelo, con ayuda de un micrómetro digital. El estadio fenológico se estableció en base a la Codificación BBCH de los estadios fenológicos de desarrollo del girasol (*Helianthus annuus* L.) (Weber und Bleiholder, 1990; Lancashire *et al.*, 1991).



**Figura 3.7** Aparición del organo floral y floración (A, B, C, D).

En la Figura 3.7 se observan las plantas de girasol en los estadios fenológicos 55 (A) (inflorescencia separada de las hojas más jóvenes del follaje), 59 (B) (flores de la corona visibles entre

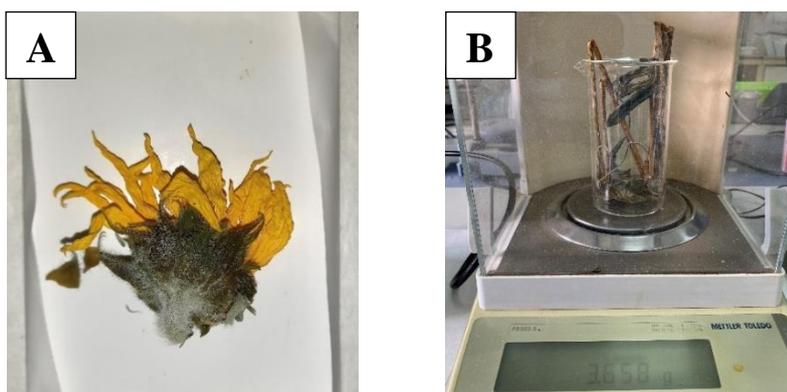
las brácteas; inflorescencia aún cerrada), 61 (C) (comienzo de la floración: las flores de la corona se alargan; las flores tubulosas del disco visibles en el tercio exterior de la inflorescencia) y 65 (D) (plena floración: las flores tubulosas del disco del tercio medio de la inflorescencia (capítulo), en floración (estambres y estigmas, visibles)).

### 3.1.6 Cosecha y procesamiento de las muestras vegetales

El girasol se cosechó a los 80 DDS, habiéndose alcanzado la plena floración 5 días antes, 75 DDS (90% de las plantas en el estadio fenológico 65). Las plantas se cortaron 1 cm por encima del suelo y el extremo basal del tallo se lavó con agua desionizada para eliminar los posibles restos de suelo. Todas las plantas recibieron un segundo corte, a 2 cm del órgano floral (capítulo), separándose del resto de la planta para ser analizado de forma independiente. Por ello, a partir de este punto se trabajó con dos muestras de material vegetal procedentes de cada unidad experimental (A. Capítulo y B. Tallo y hojas).

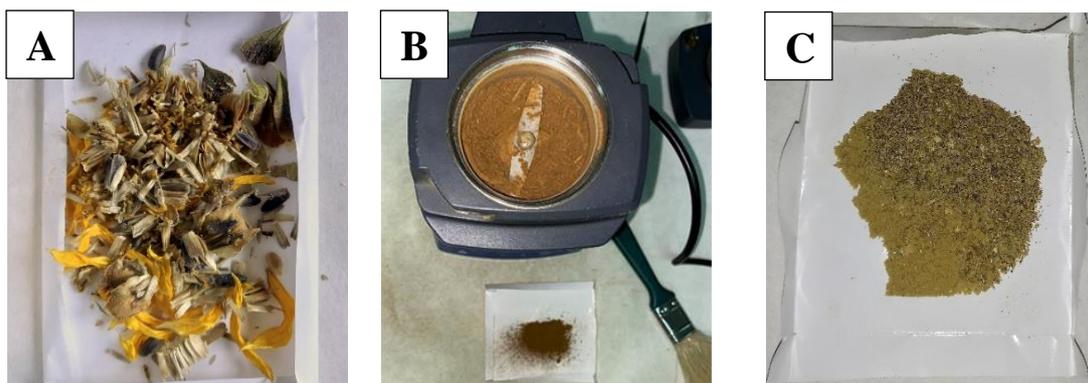
#### 3.1.6.1 Determinación del peso seco y procesamiento de las muestras vegetales

Para determinar el peso seco de cada planta, las muestras de material vegetal se secaron en una estufa a 65 °C durante al menos 72 horas. A continuación, se pesó el capítulo (rendimiento potencial) (Figura 3.8.A) y el resto de la planta (tallo y hojas) (Figura 3.8.B), determinando mediante la suma de ambas partes la biomasa total.



**Figura 3.8** Peso seco de una planta de girasol. Capítulo (A). Tallo y hoja (B).

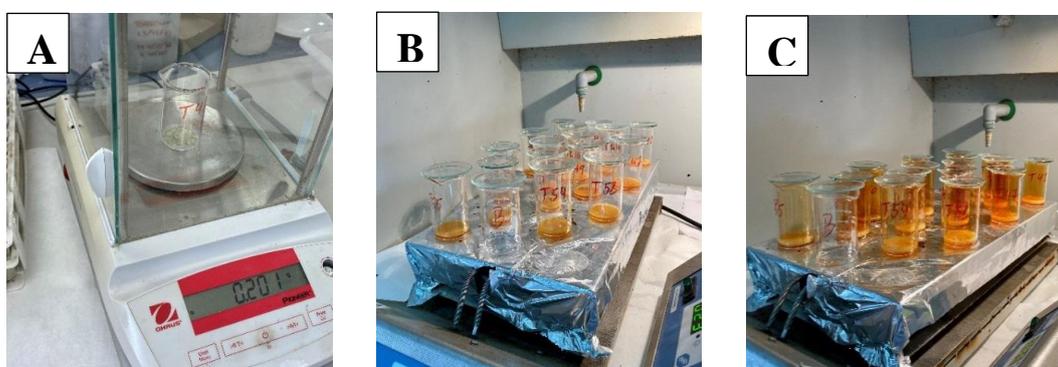
Posteriormente, todas las muestras vegetales se picaron y se molieron mediante un molinillo de aspas (Figura 3.9). El polvo obtenido se recogió en tubos de ensayo de 10 ml, para su posterior digestión y análisis (contenido en P, Fe, Cu y Zn).



**Figura 3.9** Procesado del material vegetal. Muestra picada (A). Muestra molinillo (B). Muestra molida (C).

### 3.1.6.2 Digestión de las muestras vegetales

Para realizar la digestión de las muestras vegetales se pesaron 0,2 g del material vegetal molido para cada planta y cada parte de la planta (capítulo por un lado, y tallo y hojas por otro) en vasos de precipitado de vidrio de 50 ml (Figura 3.10.A). Después, se añadieron 3 ml de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 60% y se taparon con un vidrio de reloj, dejando digerir durante 16 horas (Figura 3.10.B). Además, se estableció un blanco sin muestra, conteniendo solo el medio ácido. Tras este tiempo, se colocaron los vasos de precipitado sobre una placa calefactora (en el interior de una campana extractora) a 80 °C durante 1 h. A continuación, se añadió 1 ml de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) concentrado a cada vaso y se subió la temperatura de la placa a 180 °C (Figura 3.10.C), manteniendo la muestra sobre ella hasta que adquiere un color transparente. En este momento, se retiraron las muestras y se dejan enfriar, reconstituyéndolas con agua desionizada en matraces aforados de 10 ml. Las digestiones, una vez reconstituidas, se recogieron en tubos de ensayo de 10 ml, conservándose a 4 °C hasta su posterior análisis (determinación de P, Fe, Cu, y Zn).



**Figura 3.10** Digestión del material vegetal (A). Peso muestra (B). Digestión muestra (C).

### **3.1.7 Análisis de las muestras vegetales (P, Fe, Cu y Zn)**

#### **3.1.7.1 Determinación de P en material vegetal**

En tubos de ensayo de 10 ml se añadió una alícuota de las muestras vegetales digeridas y reconstituidas que osciló entre 25 y 150  $\mu\text{l}$ , agua desionizada hasta alcanzar junto al volumen de muestra los 5,25 ml y 1 ml de reactivo mixto (véase su composición en el apartado 3.1.2.4). Para determinar la alícuota utilizada en cada serie de muestras, se realizó una prueba previa, que permitió ajustar el volumen utilizado a la concentración de P de las muestras de material vegetal, de forma que se pudiera determinar su concentración mediante la curva de calibrado construida a partir de 8 patrones (0; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1 y 2,4  $\mu\text{l}$ ) a base de una solución de P de 100 mg  $\text{l}^{-1}$ . Además, a estos patrones, se añadió el mismo volumen del blanco de la digestión que la alícuota tomada para las muestras, junto con un volumen de agua desionizada que completó los 5,25 ml y 1 ml de reactivo mixto.

Tras añadir los reactivos, las muestras y los patrones se agitaron y se esperó 30 minutos hasta que se desarrolló un color azul en las muestras. Finalmente, en una microplaca de 96 pocillos, se depositó una alícuota de 0,2 ml de cada muestra y de los patrones para construir la curva de calibrado y se procedió a la lectura de su absorbancia a 882 nm con el espectrofotómetro de microplacas BioTek PowerWave HT (Figura 3.4). La concentración de P en las muestras vegetales se determinó a partir de su absorbancia.

#### **3.1.7.2 Determinación de Fe, Cu y Zn en material vegetal**

Para determinar la concentración de los 3 micronutrientes mencionados en las muestras de material vegetal digeridas y reconstituidas se utilizó el espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 200 (Figura 3.4), siguiendo el mismo procedimiento que se describe en el apartado 3.1.2.5 (cuantificación). Se analizaron las muestras, obteniendo directamente la concentración de cada elemento en la digestión reconstituida, a partir de la cual se determinará la concentración en las muestras vegetales. Las muestras que tuvieron una concentración superior a la del patrón de mayor concentración, se diluyeron, repitiendo a continuación su lectura.

### **3.1.8 Muestreo y procesado del suelo al final del ensayo**

Inmediatamente después de cosechar las plantas de girasol, el suelo contenido en cada maceta fue procesado con el objetivo de tomar dos muestras, utilizadas posteriormente para realizar los análisis de suelo correspondientes. Para realizar el muestreo en fresco, se extrajo el suelo de cada maceta y se realizaron dos cortes que permitieron seleccionar la porción muestreada (Figura 3.11). Con el primer

corte se eliminó el anillo de raíces formado en la base de la maceta, y, con el segundo, realizado a la altura del tercio basal de la maceta, se seleccionó la porción que fue recogida como muestra fresca. A continuación, esta porción se disgregó, eliminando las raíces más gruesas y se introdujo en un tubo Falcon® para centrífuga de 50 ml, congelándose a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta análisis posterior. El resto del suelo contenido en la maceta se dejó secar a temperatura ambiente, una vez eliminadas las raíces, para su posterior tamizado a 2 mm y conservación en tubos de ensayo, constituyendo la muestra de suelo seco.



**Figura 3.11** Cilindro de suelo y porción seleccionada para el muestreo en fresco. (A) ENC ALP 50 y (B) ENC HAS 25

### 3.1.9 Análisis de las muestras de suelo

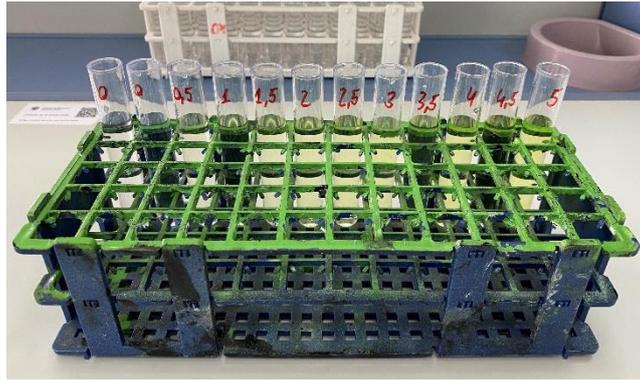
Las muestras recogidas se utilizaron para realizar diferentes análisis del suelo tras la rotación de cultivos, concretamente el pH, la CE ( $\text{dS m}^{-1}$ ) y el P soluble en bicarbonato sódico (P Olsen) ( $\text{mg P kg}^{-1}$  suelo). Para realizar estas determinaciones se siguieron los métodos descritos en los apartados 3.1.2.5, 3.1.2.6 y 3.1.2.7, respectivamente. En lo que respecta a la muestra de suelo fresco, se utilizó para determinar la actividad enzimática (fosfatasas) existente en el suelo.

### 3.1.9.1 Determinación de la fosfatasa ácida y fosfatasa básica

El método seguido para la determinación de la actividad fosfatasa es una adaptación del que fue descrito por Eivazi & Tabatabai (1977), el cual está basado en la determinación colorimétrica del p – nitrofenol liberado cuando se incubaba a 37 °C, durante 1 hora, una muestra de suelo con una solución sódica tamponada de p – nitrofenil fosfato (PNP).

Para su determinación, se utilizaron las muestras de suelo fresco obtenidas de cada unidad experimental y conservadas a -18°C. Se realizaron tres pesadas de 0,15 g de suelo fresco por muestra en un tubo de ensayo de 10 ml, utilizando dos de ellas como repeticiones y la tercera como control (línea base). A continuación, se añadieron a cada tubo 4 ml de una solución tampón, *Modified Universal Buffer* (MUB), ajustada a pH 6,5 en la determinación de la fosfatasa ácida y a pH 11 en el caso de la fosfatasa básica. Para la preparación del MUB, se elaboró 1 litro de una solución de ácido maleico, ácido cítrico, ácido bórico y Tris sobre una matriz de hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M (MUB Stock) y de esta se tomaron 200 ml, ajustando a su pH correspondiente y llevando a 1 litro con agua desionizada. A continuación, a los 2 tubos utilizados como repeticiones de cada muestra se añadió 1 ml de PNP 0,05M, cuya matriz es el MUB preparado a su correspondiente pH. Los tres tubos de cada muestra se taparon y se agitaron en un agitador vortex, incubándose a continuación, en un baño de agua a 37 °C durante 1 hora.

Posteriormente, tras su incubación, las muestras se sacaron del baño y se añadieron 4 ml de NaOH 0,5 M y 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,5 M (Figura 3.13.A). De nuevo se taparon los tubos, se agitaron en el agitador vortex y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. Justo antes de la centrifugación, se añadió 1 ml de PNP a los tubos utilizados como control (que no habían recibido el PNP anteriormente), para igualar su volumen al del resto de tubos, determinando así el color amarillo resultante del PNP y no de la liberación del p – nitrofenol a consecuencia de la incubación. Tras la centrifugación, el líquido sobrenadante de cada tubo se pasó a un nuevo tubo de ensayo de 10 ml (Figura 3.13.B). De forma paralela se prepararon 10 patrones, que contenían un volumen conocido (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 y 5 ml) de una disolución de p-nitrofenol al 4%, preparada a partir de un estándar comercial de concentración 10 mM, con los cuales se construyó la curva de calibrado. A estos patrones se añadió agua desionizada hasta alcanzar un volumen de 5 ml, además del mismo volumen de NaOH y CaCl<sub>2</sub> que a las muestras (Figura 3.12).



**Figura 3.12** Patrones para la determinación de la fosfatasa ácida y básica

Para la cuantificación, se depositó una alícuota de 0,2 ml de los patrones y de las muestras y sus respectivos controles en una microplaca de 96 pocillos (Figura 3.13.C), midiendo su absorbancia a 410 nm en el espectrofotómetro de microplacas Biotek PowerWave HT (Figura 3.3). A partir de la absorbancia de las muestras y de sus controles, así como la de los patrones, se calculó la cantidad de p – nitrofenol liberada por cada muestra. Unidad de medida de la actividad enzimática para la fosfatasa ácida y básica.



**Figura 3.13** Muestras incubadas con NaOH (las 5 filas de la izquierda ya contienen el CaCl<sub>2</sub>) (A), sobrenadante de las muestras transferido a tubos nuevos (B) y Microplaca con alícuota de muestras y patrones (C).

### 3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Antes de realizar el análisis estadístico, se comprobó la ausencia de *outliers* en los datos de cada suelo, tratamiento y dosis de P, mediante diagramas de caja y bigotes. Además, se verificó el cumplimiento de los criterios de homogeneidad de varianza. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) factorial de tres factores (suelo, tratamiento y dosis de P) para las variables que se midieron al final del ensayo (producción vegetal, contenido en P, Fe, y Zn del material vegetal, P Olsen, pH,

CE, fosfatasa ácida y básica en suelo). Al ser significativas la mayoría de las interacciones entre los tres factores para el conjunto de las variables analizadas, se realizó, a continuación, un ANOVA factorial de dos factores (tratamiento y dosis de P) para determinar el efecto de ambos factores en cada suelo por separado. Cuando la interacción entre los dos factores (tratamiento y dosis de P) resultó significativa ( $p \text{ valor} < 0,05$ ), se realizó el test post hoc LSD ( $p \text{ valor} < 0,05$ ) para la separación de las medias y se representó gráficamente esta interacción. En el caso de que no existiese interacción, el test post hoc LSD ( $p \text{ valor} < 0,05$ ) permitió separar las medias para cada factor, determinando el efecto del tratamiento y de la dosis de P, por separado, en cada suelo. En el caso de no cumplir los criterios de homocedasticidad (incluso con transformación de los datos) requeridos para realizar el ANOVA, se optó por realizar el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, para cada factor analizado, separando las medias mediante el test *post hoc* de Dunn ( $p \text{ valor} < 0,05$ ), en el caso de existir diferencias significativas ( $p \text{ valor} < 0,05$ ). Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el software R.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SUELOS UTILIZADOS

En la Tabla 4.1 se muestran las principales propiedades físico-químicas de los suelos utilizados en el ensayo de cultivo de girasol en macetas que se desarrolló en este estudio. El primero de ellos, RAB, se diferenció de los tres suelos restantes (TOM, SAN Y ENC) por tener propiedades físico-químicas distintas a estos. Concretamente, el suelo RAB destaca por su textura franco-arenosa (77% de arena), frente a las texturas arcillosa de ENC y TOM y franco-arcillosa de SAN. Además, es el único de los 4 suelos utilizados que tiene un contenido despreciable en  $\text{CO}_3^{2-}$ , por lo que presenta un pH ácido de 5,1. Sin embargo, los otros suelos, al tener un contenido en  $\text{CO}_3^{2-}$  superior a  $300 \text{ g kg}^{-1}$  de suelo, presentan un pH tamponado a 7,9, propio de los suelos calcáreos. Como consecuencia de este pH, este tipo de suelos suele presentar limitaciones en la disponibilidad de nutrientes como P, Fe, Cu, Zn, etc. (Alloway, 2009) tal y como se observa en este caso, donde el suelo RAB (no calcáreo), presentó contenidos de Fe y Cu entre 10 y 20 superiores a los suelos TOM, SAN y ENC (calcáreos). Del mismo modo, el orden de los suelos según su contenido de P Olsen fue: elevado en RAB, medio-alto en ENC y en TOM, y muy bajo en SAN, lo que probablemente se debe a la escasa disponibilidad de este nutriente en los suelos calcáreos (Sample et al., 1980).

**Tabla 4.1. Propiedades físico - químicas de los suelos utilizados (media,  $n = 3$ ).**

Suelo	Ar. %	Li. %	Ac. %	MO $\text{g kg}^{-1}$	$\text{CO}_3^{2-}$ $\text{g kg}^{-1}$	pH	$\text{CE}_{1:5}$ $\text{dS m}^{-1}$	P Olsen $\text{mg kg}^{-1}$	Fe $\text{mg kg}^{-1}$	Cu $\text{mg kg}^{-1}$	Zn $\text{mg kg}^{-1}$
RAB	77	8	14	12,2	6,9	5,1	0,04	30,0	587,2	137,9	15,4
TOM	15	28	57	21,8	372,5	7,9	0,12	11,5	33,5	9,5	4,3
SAN	32	32	36	36,0	417,7	7,9	0,09	4,1	46,0	7,1	3,2
ENC	19	28	44	16,2	330,5	7,9	0,12	12,7	26,8	13,5	4,2

Textura: Ar. (Arena), Li. (Limo), Ac. (Arcilla). MO: Contenido en materia orgánica  $\text{CE}_{1:5}$ : Conductividad eléctrica en el extracto 1:5.  $\text{CaCO}_3^{2-}$ : Contenido en Carbonatos. P Olsen: P disponible en el suelo. Fe (hierro), Cu (cobre), Mn (manganeso) y Zn (zinc) al DTPA.

### 4.2 ENSAYO DE CULTIVO DE GIRASOL EN MACETAS

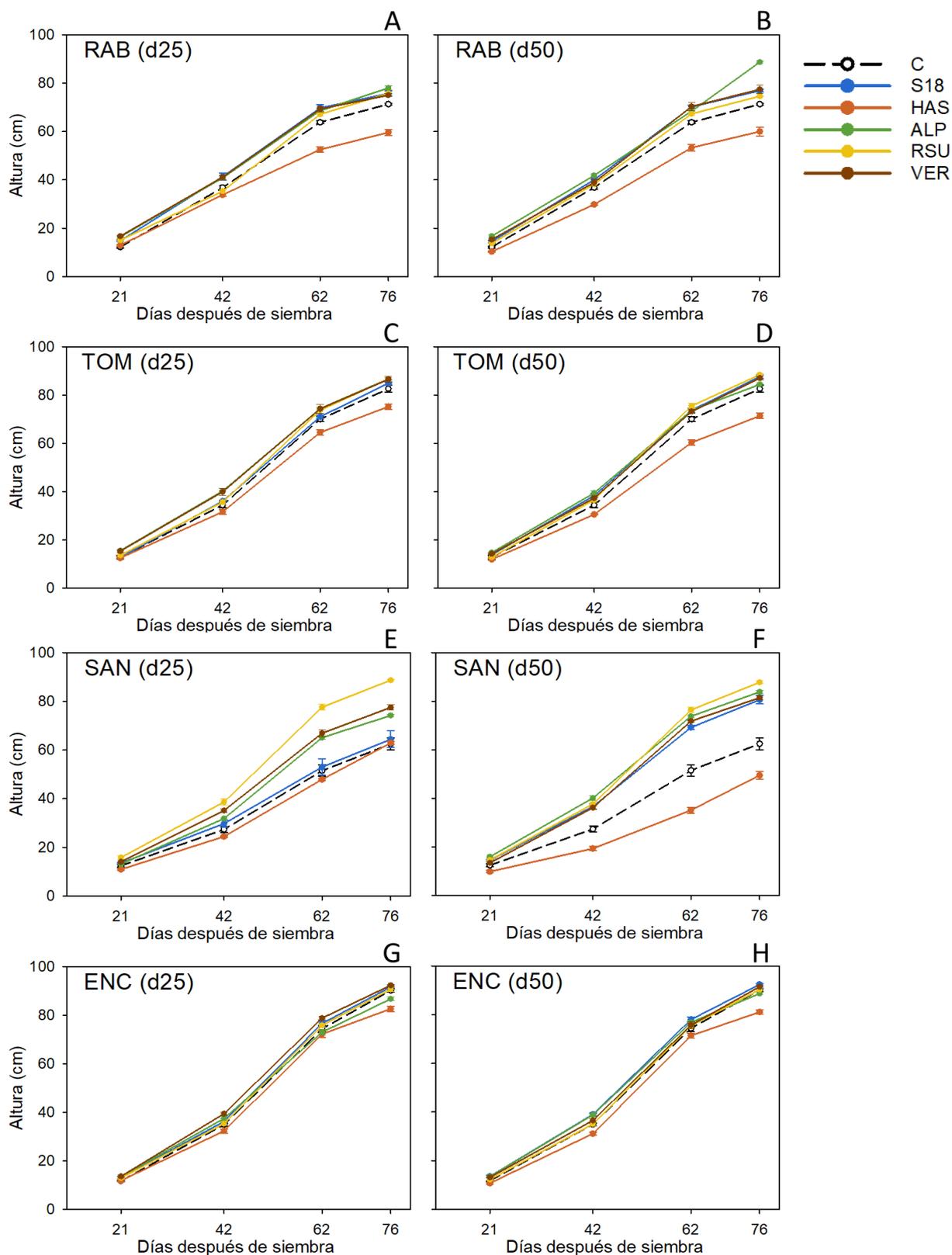
En el apartado 4.2.1, se describen los resultados correspondientes a la evolución del cultivo de girasol y en los apartados siguientes (4.2.2, 4.2.3 y 4.2.4), se describen los resultados obtenidos al final del ciclo de cultivo del girasol, que se cosechó a los 80 DDS.

#### **4.2.1 Evolución del crecimiento (altura y diámetro del tallo), índice de clorofila y estadio fenológico de las plantas de girasol**

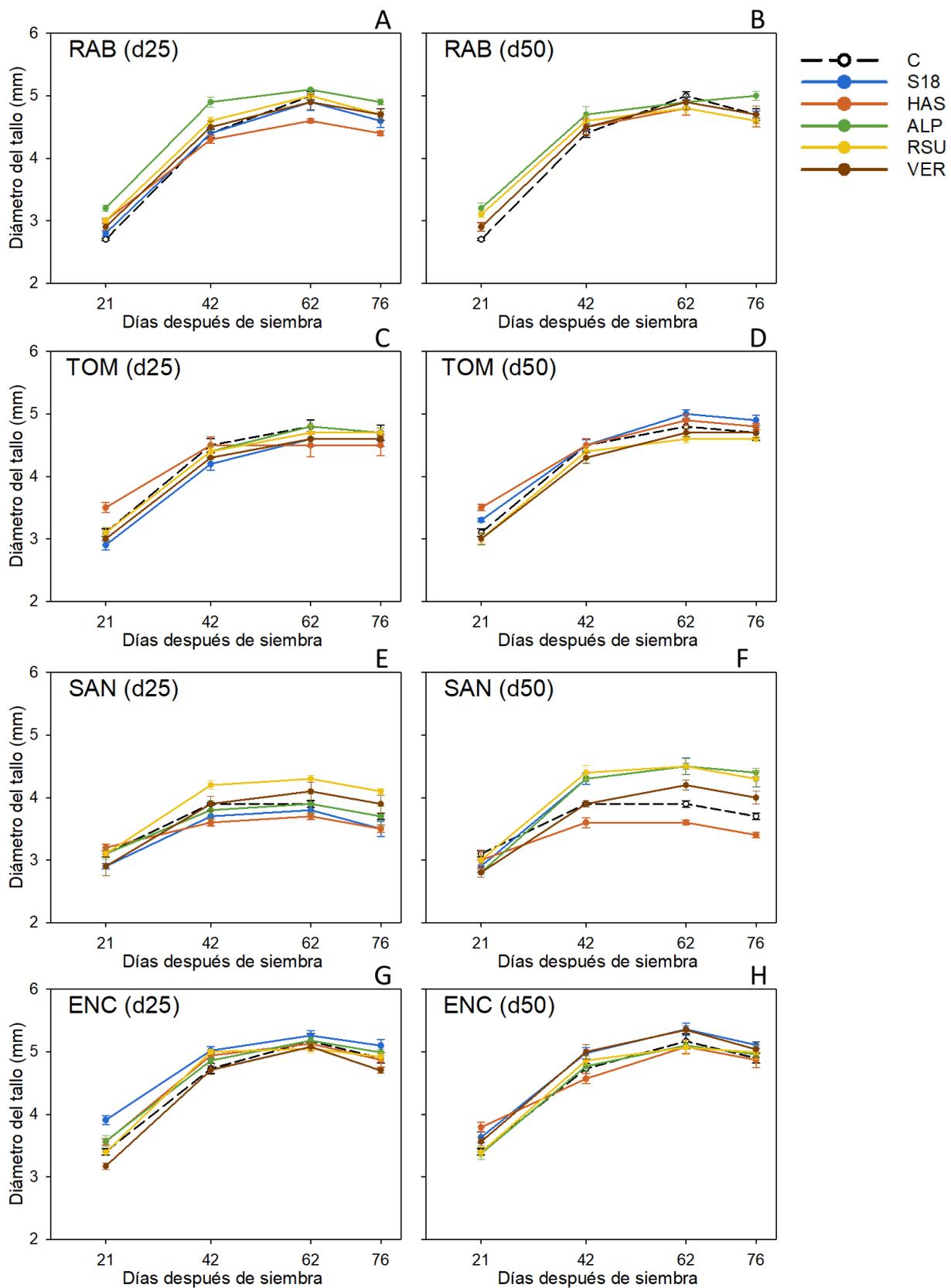
Comparando entre los distintos suelos, las plantas que crecieron sobre TOM (Fig. 4.1 C, D) y ENC (G, H) mostraron menos diferencias de altura entre tratamientos que las plantas que crecieron sobre los suelos RAB (Fig. 4.1 A, B) y SAN (E, F), para las dos dosis de P. El aumento de la altura (cm) de las plantas de girasol con respecto al tiempo se observó en los 4 suelos, para todos los tratamientos y para las 2 dosis de P (Figura 4.1). En general, el tratamiento HAS produjo una menor altura a partir de la segunda determinación, manteniéndose hasta el final del cultivo (76 DDS). Tras las plantas fertilizadas con HAS, la no aplicación de P (C) produjo las plantas más pequeñas, excepto en el suelo ENC, donde la altura de las plantas C fue similar a la del resto de tratamientos (especialmente RSU y ALP; Fig. 4.1 G, H). Respecto a la dosis de P, no hubo grandes diferencias en esta variable de la planta, excepto un menor crecimiento del girasol en TOM y SAN cuando se aplicó la mayor dosis de HAS (HAS-50).

La evolución del diámetro del tallo de las plantas (mm) mostró una tendencia generalizada de incremento con respecto al tiempo, alcanzando su valor máximo a los 62 DDS, con una saturación seguida de una pequeña reducción en la mayoría de las combinaciones de suelo, tratamiento y dosis (Figura 4.2). Una tendencia similar que, para la altura, se observó entre suelos, se produjo también para esta variable y se refleja en una mayor variabilidad del diámetro del tallo entre tratamientos en los suelos RAB (Fig. 4.2 A, B) y SAN (E, F) que en TOM (C, D) y ENC (G, H). Al igual que ocurrió con la altura, las plantas que crecieron sobre el suelo SAN con el tratamiento HAS y dosis 50 mg P kg<sup>-1</sup> (Figura 4.2 F), experimentaron junto al tratamiento control (C), un menor ensanchamiento del tallo.

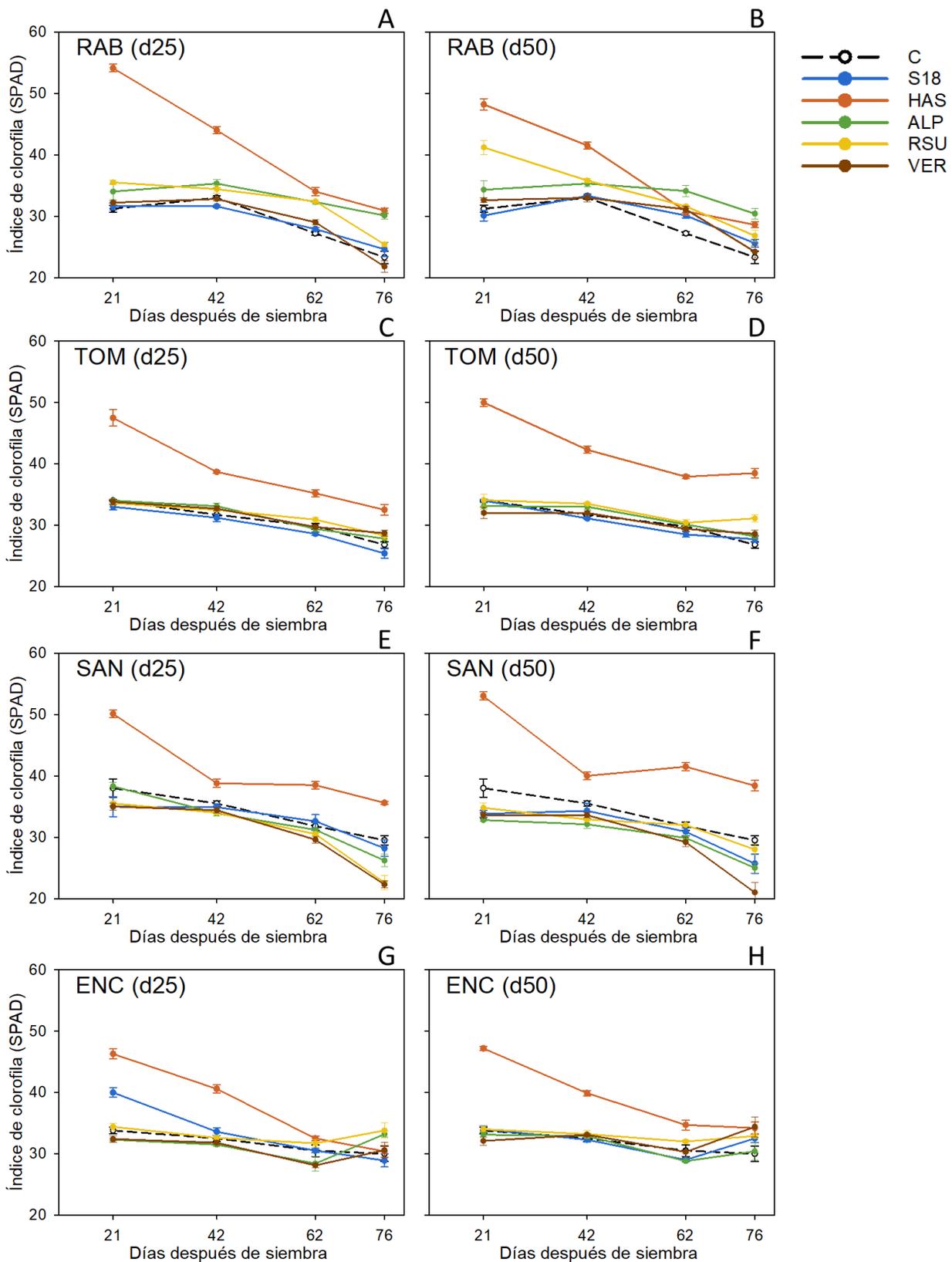
El índice de clorofila de las plantas de girasol (unidades SPAD) disminuyó a lo largo del ciclo de cultivo (Fig. 4.3). El valor de este índice fue superior en el tratamiento HAS que en el resto para los 4 suelos y las dos dosis de P. Aun así, en los suelos RAB (Fig. 4.3 A, B) y ENC (G, H) el valor de SPAD para el tratamiento HAS se igualó al del resto de los tratamientos para las 2 dosis de P a partir de los 62 DDS. Esta reducción también se experimentó en los suelos TOM (Fig. 4.3 C, D) y SAN (E, F), pero su valor seguía siendo considerablemente mayor al del resto de tratamientos. Además, los mayores valores de SPAD en RAB y en ENC fueron causados por la fertilización con ALP y RSU, sin considerar HAS (Fig. 4.3 A, B, G, H). Por el contrario, en suelos como TOM (Fig. 4.3 C, D) se pueden observar menores valores de SPAD con los tratamientos C y S18, y en el suelo SAN (Fig. 4.3 E, F) con el tratamiento VER, mostrándose una reducción del SPAD al final del cultivo.



**Figura 4.1 Evolución de la altura** (cm; media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) en plantas de girasol para los distintos suelos (RAB (A, B), TOM (C, D), SAN (E, F) y ENC (G, H)) según tiempo (días después de siembra), tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>, d25 y d50, respectivamente).



**Figura 4.2 Evolución del diámetro del tallo** (mm; media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) en plantas de girasol para los distintos suelos (RAB (A, B), TOM (C, D), SAN (E, F) y ENC (G, H)) según tiempo (días después de siembra), tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>, d25 y d50, respectivamente).



**Figura 4.3** Índice de clorofila (SPAD; media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) en plantas de girasol para los distintos suelos (RAB (A, B), TOM (C, D), SAN (E, F) y ENC (G, H)) según tiempo (días después de siembra), tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>, d25 y d50, respectivamente).

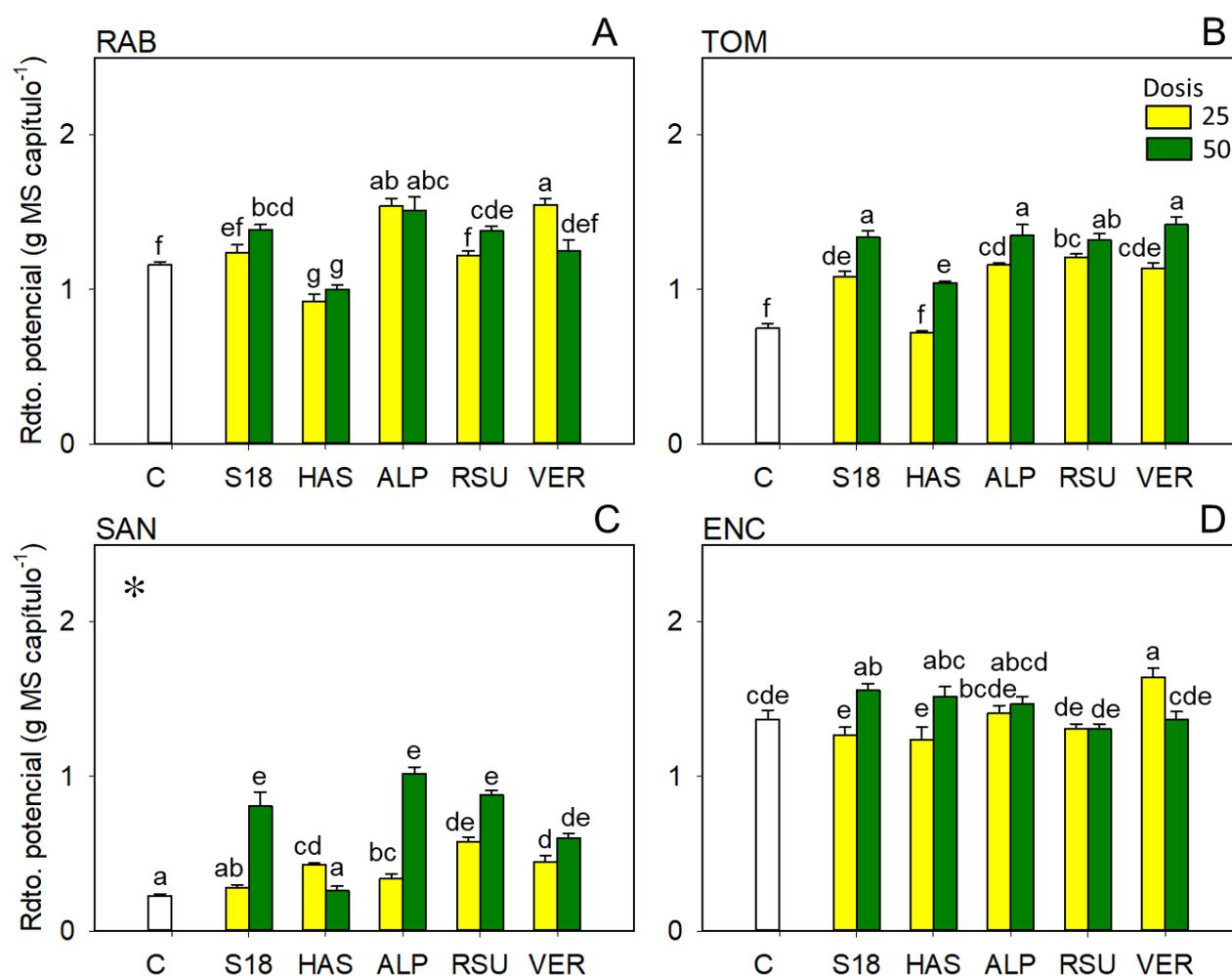
El estadio fenológico de las plantas de girasol, que se recoge en las Tablas A8.1 y A8.2 de los Anexos, muestra como existió una homogeneidad en el desarrollo fenológico de la mayoría de las plantas, sin encontrarse diferencias considerables entre suelos, tratamientos y dosis hasta los 42 DDS. Sin embargo, a partir de los 62 DDS, las plantas que crecieron sobre el suelo SAN mostraron estadios fenológicos algo retrasados para los tratamientos C y HAS en la dosis 50 y para C, S18 y HAS en la dosis 25, en comparación con el resto. Una tendencia similar se reflejó a los 76 DDS, cuando las plantas que crecieron sobre el suelo SAN para el tratamiento HAS y dosis 50, no alcanzaron la apertura del capítulo, en comparación con las demás plantas que de forma general alcanzaron la plena floración (Tablas A.8.1 y A.8.2).

#### **4.2.2 Peso seco de las plantas de girasol**

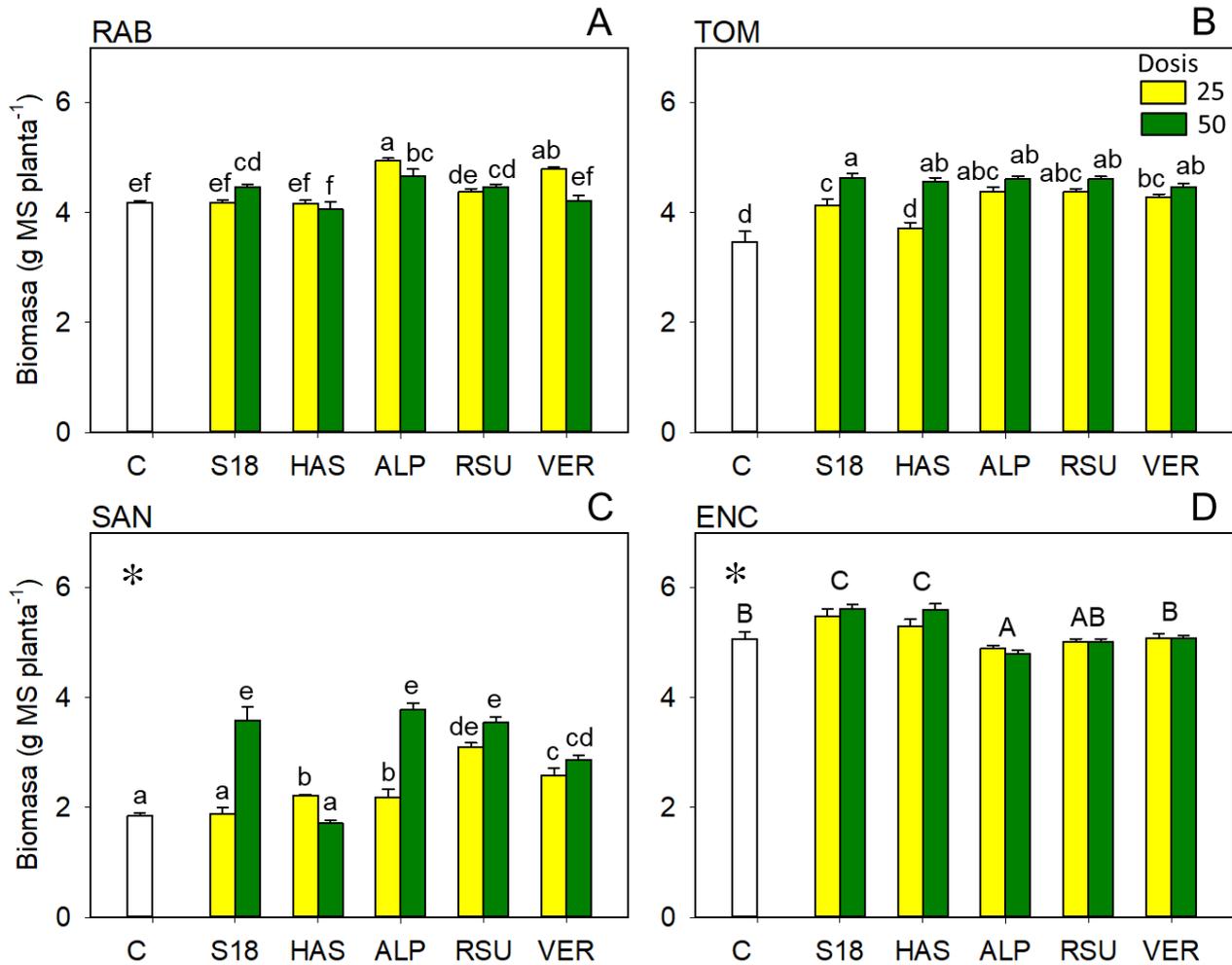
Los resultados respecto al peso seco de las plantas de girasol incluyen el rendimiento (rdto.) potencial del cultivo de girasol ( $\text{g MS capítulo}^{-1}$ ), la biomasa ( $\text{g MS planta}^{-1}$ ) y el índice de cosecha. Al haber múltiples interacciones entre los factores suelo, tratamiento y dosis de P, (ANOVA trifactorial, Tabla A.8.3 de los Anexos), se recurrió al ANOVA de dos vías (tratamiento y dosis de P) para cada suelo independientemente, mostrándose los resultados más destacados en las Figuras 4.4 y 4.5 (rdto. potencial y biomasa). Cabe destacar los menores rendimientos potenciales (peso del capítulo) y biomasa (peso de la parte aérea) obtenidos en el suelo SAN en comparación con los otros suelos (Figuras 4.4.C y 4.5.C). En cuanto al rdto. potencial, en todos los suelos existió una interacción significativa entre el tratamiento y la dosis de P ( $p < 0.05$ ). En la Figura 4.4 se observa como las distintas combinaciones de tratamiento y dosis solo mostraron una tendencia común en los suelos TOM (B) y SAN (C), obteniéndose rdtos. potenciales significativamente superiores cuando se aplicó S18-50, ALP-50, VER-50 y RSU 25 y 50. Sin embargo, en los otros dos suelos tan solo destacaron S18-50 y VER-25 en ENC (D), y en el suelo RAB (A), los mismos que en el suelo ENC y también ALP 25 y 50.

En el caso de la biomasa, se produjo una interacción significativa tratamiento  $\times$  dosis en los suelos RAB, TOM y SAN ( $p < 0.05$ ), mientras que en el suelo ENC solo existieron diferencias significativas para el factor tratamiento. En la Figura 4.5 se observa como las combinaciones que produjeron la mayor biomasa de girasol fueron: ALP 25 y 50 y VER-25 en RAB (A); S18-50, HAS-50, ALP-50 y RSU y VER 25 y 50 en TOM (B); S18-50, ALP-50 y RSU 25 y 50 en SAN (C); y los tratamientos S18 y HAS en ENC (D).

En cuanto al índice de cosecha de las plantas de girasol (Tabla A.8.6 de los Anexos), existieron interacciones significativas de los dos factores (tratamiento y dosis de P) en los suelos SAN y ENC ( $p < 0,05$ ), con índices de cosecha significativamente superiores en S18-50, ALP-50 y RSU-50 (SAN) y ALP 25 y 50 y VER-25 (ENC). En el suelo RAB solo existieron diferencias significativas según el tratamiento, siendo superiores los valores de S18, ALP y VER, mientras que en el suelo TOM, fueron significativamente superiores, tanto los tratamientos S18, ALP, RSU y VER, como su aplicación en la dosis 50 respecto a 25.



**Figura 4.4 Rendimiento potencial de las plantas de girasol** (peso en g MS capitulo<sup>-1</sup>) (media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). \*Letras en orden inverso debido a la transformación inversa de los datos.



**Figura 4.5 Biomasa de las plantas de girasol** (peso en g MS planta<sup>-1</sup>) (media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamientos, y/o dosis de P (leyenda) conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). \*Letras en orden inverso debido a la transformación inversa de los datos.

### 4.2.3 Contenido de fósforo en las plantas de girasol

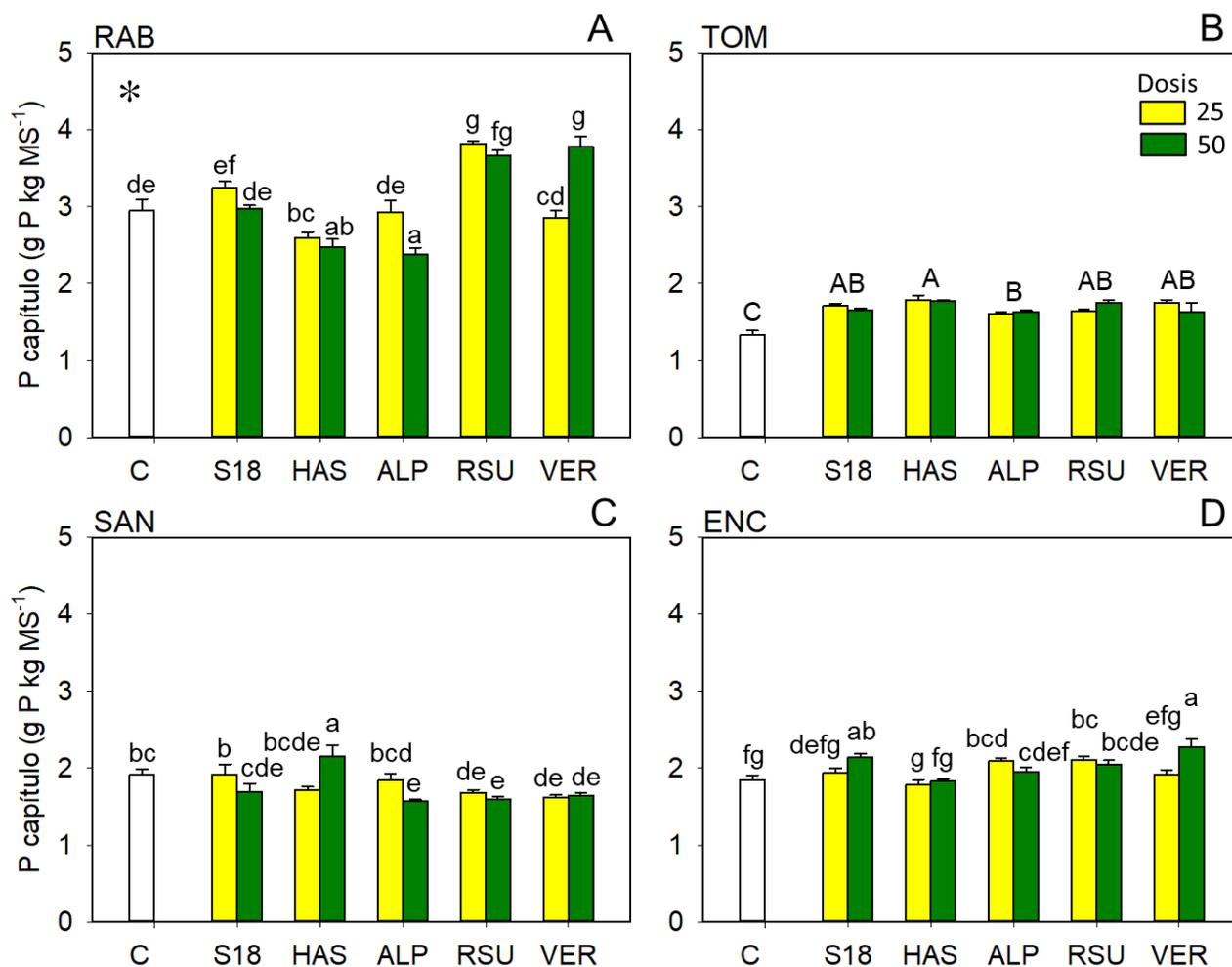
Al existir interacciones significativas entre los tres factores analizados (Tabla A.8.3 de los Anexos), en este apartado se muestran los resultados relativos al ANOVA factorial de 2 factores (tratamiento y dosis) para cada suelo independientemente.

Las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8 muestran, respectivamente, la concentración de P en el capítulo, en el tallo y las hojas, y el contenido de P (total) en la parte aérea de las plantas de girasol para cada suelo, según tratamiento y dosis de P. Las plantas que crecieron sobre el suelo RAB (A), obtuvieron mayores valores de estas variables que las que crecieron sobre el resto de los suelos. Respecto a la concentración de P en el capítulo (Figura 4.6), se produjeron interacciones significativas tratamiento  $\times$  dosis en los suelos RAB, SAN y ENC ( $p < 0,05$ ),. Sin embargo, en el suelo TOM (B), existieron diferencias significativas según el tratamiento, concretamente, entre el C y el resto (con mayor concentración de P en el capítulo), entre los cuales no existieron diferencias significativas, excepto entre ALP y HAS (con los mayores valores). En el resto de los suelos, las combinaciones de tratamiento y dosis con una mayor concentración de P en el capítulo fueron: RSU25 y 50 y VER-50 en RAB (A); HAS-50 en SAN (C); y S18-50 y VER-50 en ENC (D). Además, algunas combinaciones como HAS 25 y 50, y ALP-50 en RAB, ALP-50, RSU 25 y 50, y VER 25 y 50 en SAN, resultaron en una menor concentración de P en el capítulo del girasol (Fig. 4.6 A, C).

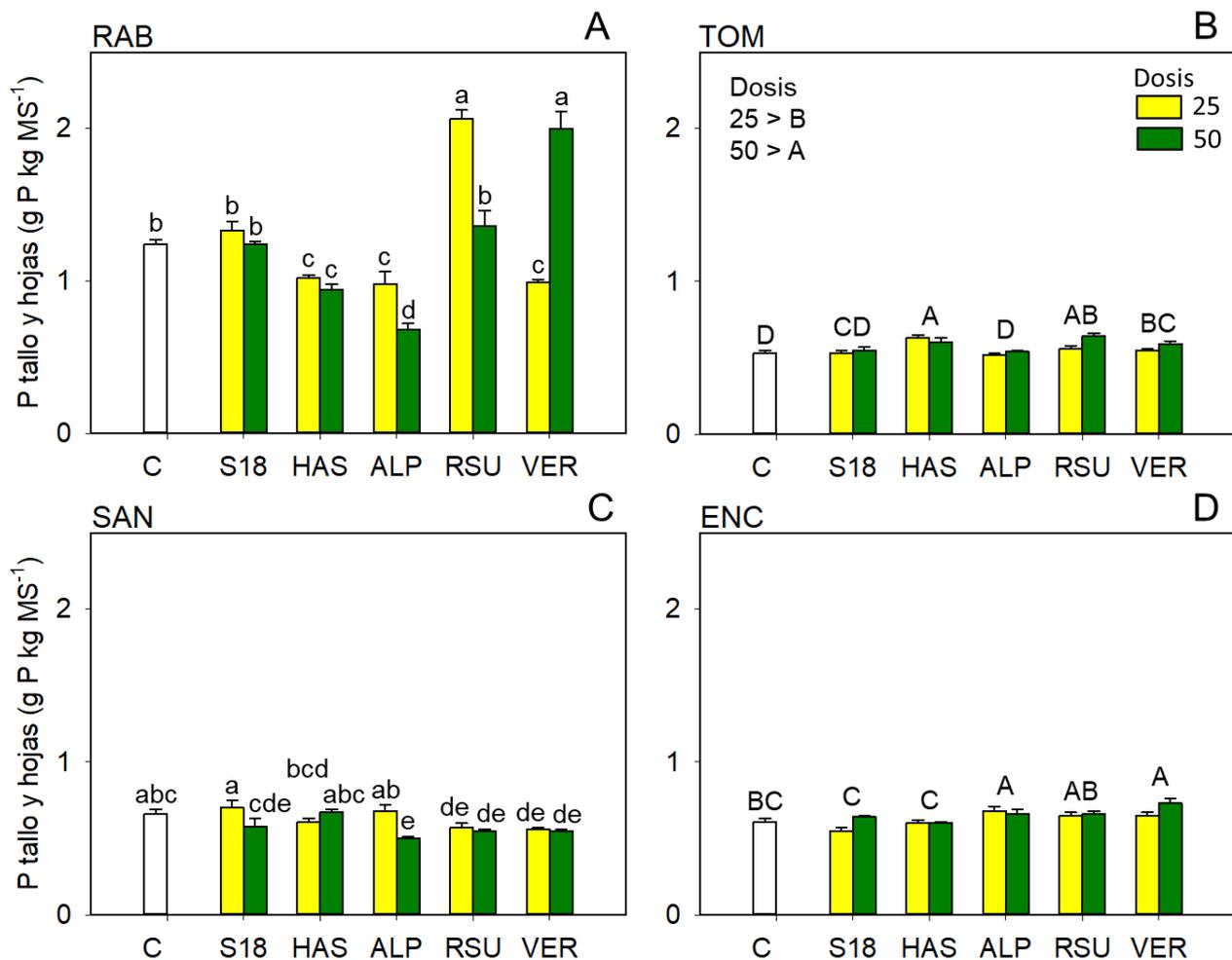
Para la concentración de P en el tallo y las hojas, se produjeron interacciones significativas entre tratamiento y dosis ( $p < 0,05$ ) únicamente en los suelos RAB y SAN (Figura 4.7). En estos suelos, las combinaciones de tratamiento y dosis produjeron diferentes tendencias respecto al C, mostrando las combinaciones RSU-25 y VER-50 mayores concentraciones de P en RAB (A), mientras que en el suelo SAN (C), RSU 25 y 50, VER 25 y 50 y ALP-50, fueron significativamente inferiores. En el suelo TOM (B), los tratamientos HAS, RSU y VER, produjeron tallo y hojas con mayor concentración en P (significativamente superiores) que el C, así como la dosis 50 respecto a la dosis 25 ( $\text{mg P kg}^{-1}$ ). Sin embargo, en el suelo ENC (D), solo fueron significativamente superiores las concentraciones de P de los tratamientos ALP y VER (respecto al C).

En la Figura 4.8 se observa que, para el contenido total de P en la parte aérea del girasol existieron interacciones significativas entre tratamiento y dosis de P ( $p < 0.05$ ) en los 4 suelos (por eso se muestra dicha figura). En cuanto al suelo RAB (A), los tratamientos y dosis RSU 25 y 50 y VER-50 produjeron mayores contenidos de P en planta que el C, S18, HAS y ALP (siendo los contenidos de P en las plantas de los dos últimos tratamientos menores incluso que en el C, ambas dosis para HAS y la mayor en el caso de ALP). Sin embargo, en los suelos TOM (B) y SAN (C), todos los tratamientos

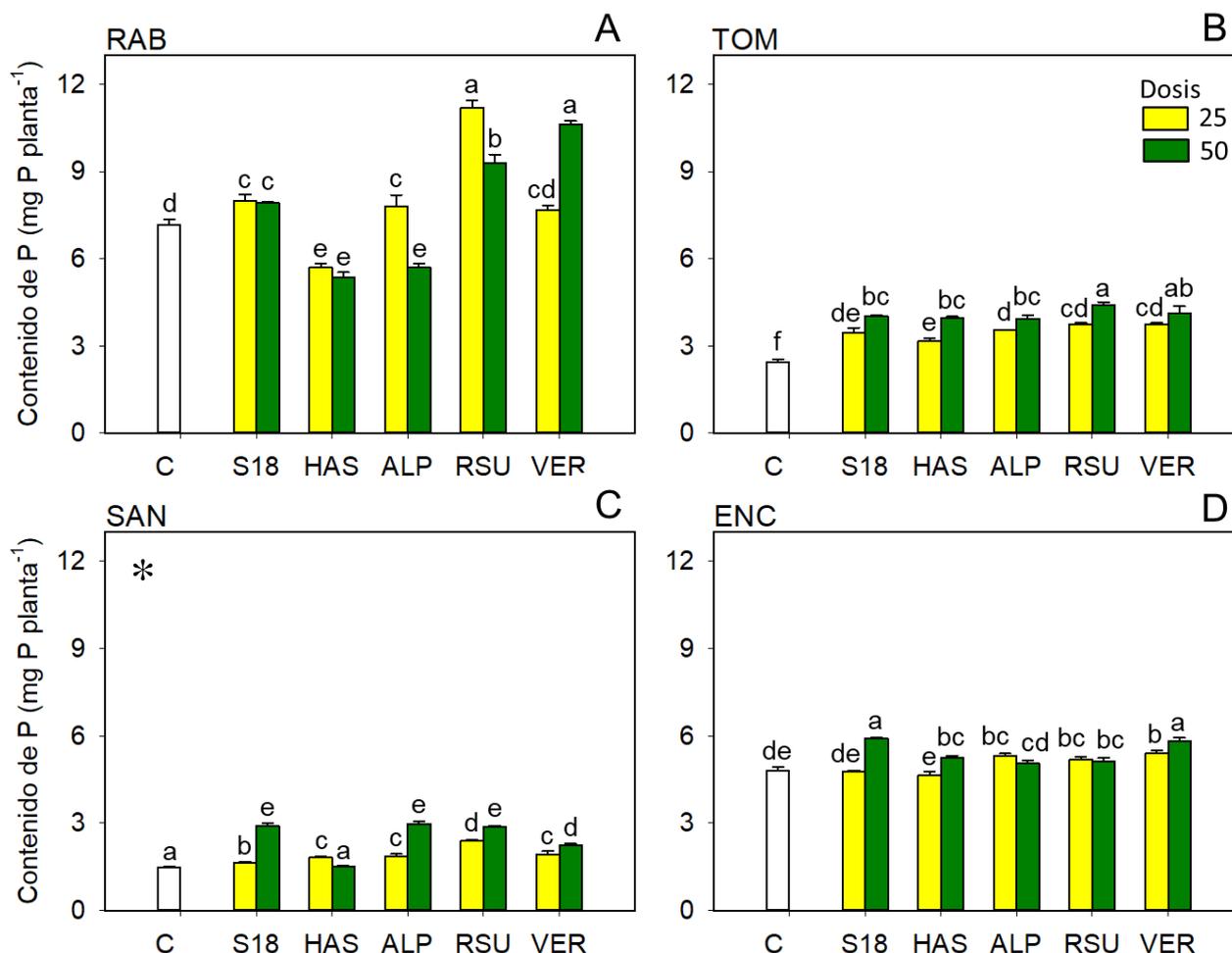
y dosis fueron significativamente superiores al C, excepto HAS-50 para el suelo SAN. A pesar de ello, no existieron grandes diferencias entre el resto de los tratamientos y dosis. Finalmente, en el suelo ENC, tan solo las combinaciones S18-50 y VER-50 obtuvieron contenidos de P significativamente superiores al resto.



**Figura 4.6** Concentración de P en el capítulo (g P kg MS<sup>-1</sup>) (media ± error estándar, n = 5) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD (*p* < 0,05). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamientos conforme al análisis post hoc LSD (*p* < 0,05). \*Letras en orden inverso debido a la transformación inversa de los datos.



**Figura 4.7** Concentración de P en el tallo y las hojas (g P kg MS<sup>-1</sup>) (media ± error estándar, n = 5) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD (p < 0,05). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamientos, o dosis de P (leyenda) conforme al análisis post hoc LSD (p < 0,05).



**Figura 4.8 Contenido de P en la planta** (mg P planta<sup>-1</sup>) (media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). \*Letras en orden inverso debido a la transformación inversa de los datos.

#### 4.2.4 Contenido de micronutrientes en las plantas de girasol

La Tabla A8.4 de los Anexos muestra las múltiples interacciones significativas para el ANOVA trifactorial de la concentración y contenido de micronutrientes (Fe, Cu y Zn) en la parte aérea del girasol. Como se observa en la Tabla 4.2, la concentración de Fe en el capítulo fue significativamente distinta según el tratamiento para los 4 suelos, sin existir ninguna diferencia respecto a la dosis de P ni interacciones significativas entre ambos factores. Concretamente, en el suelo RAB, fueron

significativamente superiores al C todos los tratamientos de base orgánica (ALP, RSU y VER) excepto HAS, que fue significativamente inferior al C; en el suelo TOM, todos los tratamientos que supusieron aplicación de P (inorgánico y orgánicos) redujeron la concentración de Fe en el capítulo; en SAN, todos los tratamientos excepto S18, fueron significativamente inferiores al C; y en el suelo ENC, VER produjo concentraciones de Fe en capítulo superiores a los demás.

**Tabla 4.2 Fe en material vegetal (capítulo) (mg Fe kg<sup>-1</sup>).** Media y error estándar para cada tratamiento y dosis de P, ( $n = 5$ ) en cada suelo (RAB, TOM, SAN y ENC). ANOVA factorial (tratamiento, dosis P). Las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ).

	RAB	TOM	SAN	ENC
Tratamiento				
Control	28,3 ± 1,1 b	63,2 ± 4,1 a	42,8 ± 0,9 a	24,6 ± 0,7 b
S18	27,1 ± 0,9 bc	47,8 ± 1,3 b	44,5 ± 5,3 a	25,4 ± 1,0 b
HAS	22,8 ± 0,9 c	40,2 ± 5,2 bc	23,8 ± 1,4 c	26,1 ± 1,5 b
ALP	36,3 ± 2,5 a	41,6 ± 1,3 bc	32,2 ± 2,2 b	25,7 ± 1,5 b
RSU	37,8 ± 2,5 a	30,8 ± 1,4 d	23,6 ± 1,5 c	24,1 ± 1,0 b
VER	38,7 ± 2,0 a	35,1 ± 0,9 cd	20,5 ± 1,9 c	30,4 ± 1,6 a
<i>p</i> valor (t)	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0098</b>
Dosis (mg P kg <sup>-1</sup> )				
25	25,9 ± 0,9	31,4 ± 1,4	31,2 ± 2,0	45,2 ± 2,6
50	26,2 ± 0,7	32,3 ± 1,6	31,3 ± 2,6	41,0 ± 2,4
<i>p</i> valor (d)	0,56	0,0772	0,957	0,7391
<i>p</i> valor (txd)	0,832	0,3538	0,345	0,0824

Tratamientos: C (sin P), S18 (super 18), HAS (harina de sangre), ALP (alperujo), RSU (residuo sólido urbano) y VER (vermicompost). La ausencia de letras indica la existencia de una interacción entre los factores tratamiento y dosis. En el caso de no existir interacción ( $p$  valor txd > 0,05), la ausencia de letras indica la inexistencia de diferencias significativas entre las medias.

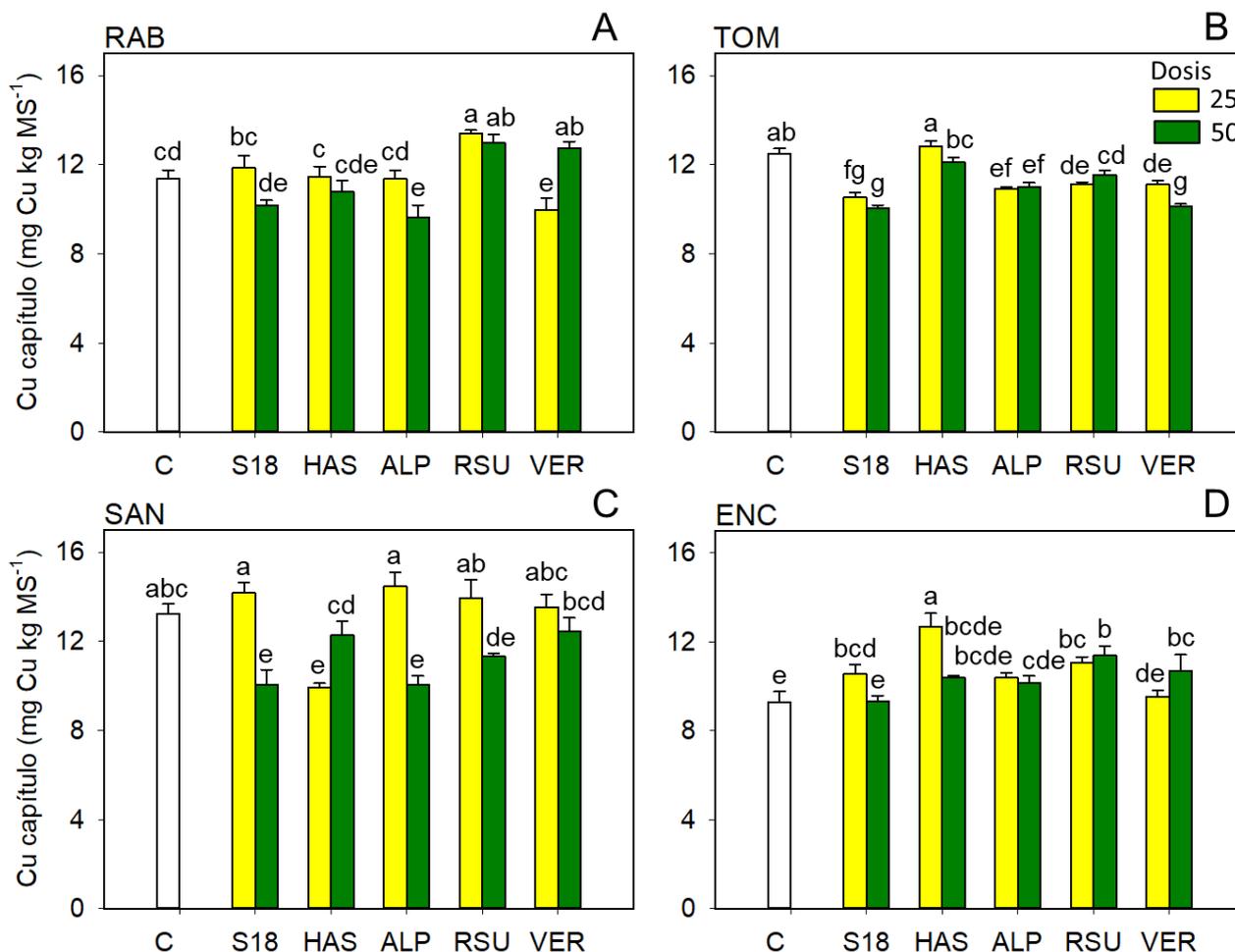
Para la concentración de Fe en el tallo y las hojas (Tabla 4.3), existieron interacciones significativas entre tratamiento y dosis en los suelos SAN ( $p < 0,05$ ), donde destacaron los tratamientos y dosis S18-25 y HAS-50 y ENC, donde los tratamientos y dosis no mostraron diferencias con respecto al C, o fueron significativamente inferiores al mismo. En el suelo RAB, todos los tratamientos excepto HAS y S18 redujeron la concentración de Fe con respecto al C, al igual que ocurrió en el suelo TOM donde, además, la dosis 25 produjo incrementos de concentración de Fe con respecto a la dosis 50 mg P kg<sup>-1</sup>.

**Tabla 4.3 Fe en material vegetal (tallo y hojas) (mg Fe kg<sup>-1</sup>).** Media y error estándar para cada tratamiento y dosis de P, (n = 5) en cada suelo (RAB, TOM, SAN y ENC). ANOVA factorial (tratamiento, dosis P). Las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD (p < 0,05).

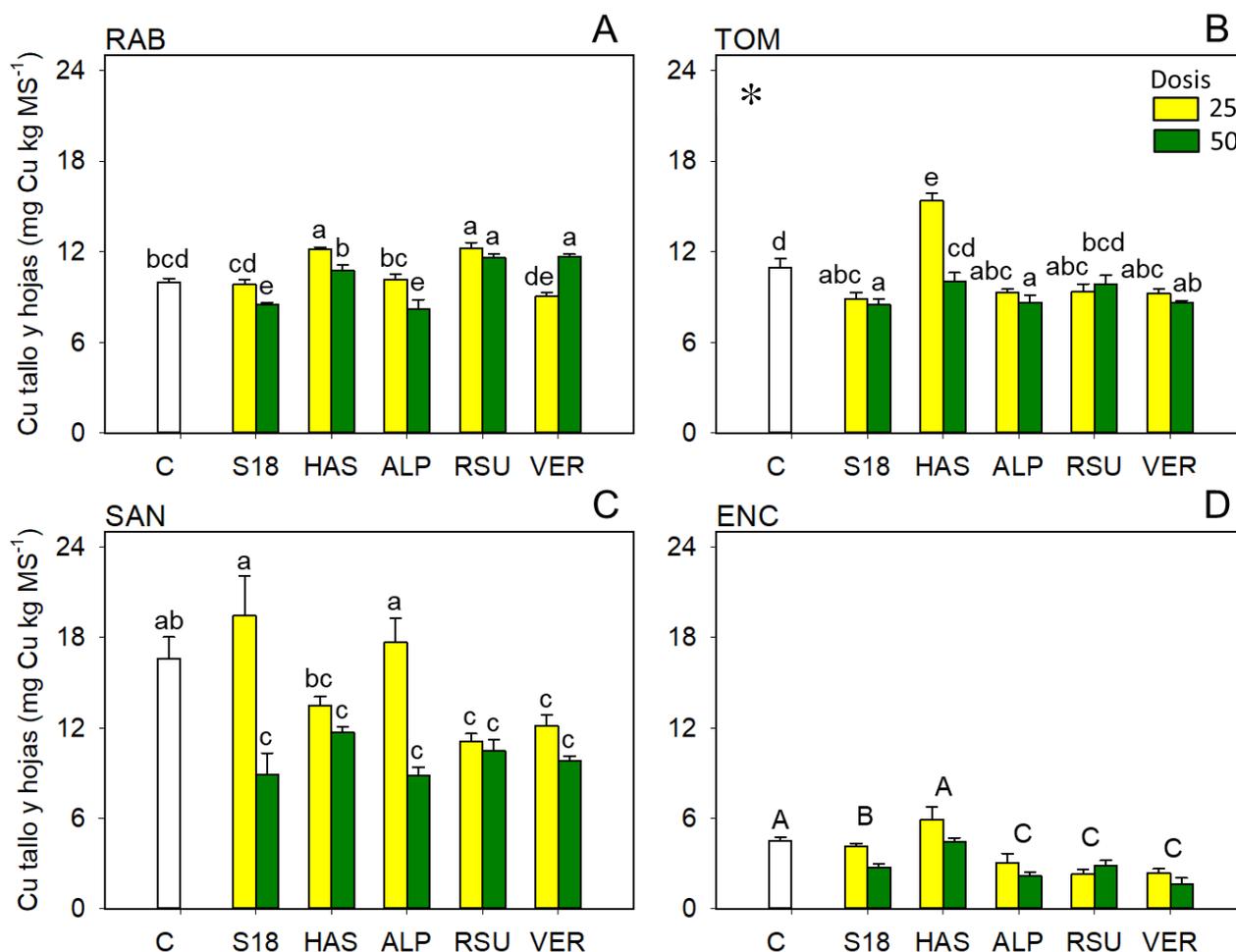
	RAB	TOM	SAN	ENC
Tratamiento				
Control	21,8 ± 1,5 ab	15,1 ± 1,9 a	41,3 ± 2,0	64,3 ± 4,9
S18	34,1 ± 2,8 b	25,0 ± 1,7 a	53,4 ± 2,8	62,2 ± 0,8
HAS	38,9 ± 2,5 a	26,3 ± 2,4 a	62,4 ± 4,5	67,8 ± 2,0
ALP	18,0 ± 1,7 c	13,8 ± 1,8 b	49,9 ± 4,7	56,4 ± 3,6
RSU	31,6 ± 2,3 c	20,7 ± 2,0 b	51,1 ± 5,7	51,9 ± 2,6
VER	16,4 ± 2,0 c	14,7 ± 1,7 b	38,9 ± 2,4	49,0 ± 10,8
<i>p</i> valor (t)	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,0005	0,2723 <sup>1</sup>
Dosis (mg P kg <sup>-1</sup> )				
25	27,4 ± 2,0	20,9 ± 1,4 a	51,42 ± 2,38	63,3 ± 3,2
50	26,2 ± 2,0	17,6 ± 1,4 b	47,56 ± 2,81	53,9 ± 2,9
<i>p</i> valor (d)	0,508	<b>0,0425</b>	0,2044	0,0247 <sup>1</sup>
<i>p</i> valor (txd)	0,701	0,937	<b>0,0424</b>	<b>0,0122<sup>1</sup></b>

<sup>1</sup>P valor de datos transformados al cuadrado. Tratamientos: C (sin P), S18 (super 18), HAS (harina de sangre), ALP (alperujo), RSU (residuo sólido urbano) y VER (vermicompost). La ausencia de letras indica la existencia de una interacción entre los factores tratamiento y dosis. En el caso de no existir interacción (*p* valor txd > 0,05), la ausencia de letras indica la inexistencia de diferencias significativas entre las medias.

En la Figura 4.9, se observan interacciones significativas entre los factores tratamiento y dosis (*p* < 0,05) en los 4 suelos para la concentración de Cu en el capítulo (Figura 4.9). En el suelo RAB (A), solo las combinaciones RSU 25 y 50 y VER-50 alcanzaron concentraciones de Cu en el capítulo superiores al C. Sin embargo, tanto en el suelo TOM (B), como SAN (C), ninguna combinación de tratamiento y dosis ocasionó incrementos significativos respecto al C, e incluso fueron inferiores. En el suelo ENC (D) solo la combinación HAS-25 fue significativamente superior al resto. Las concentraciones de Cu en el tallo y las hojas (Figura 4.10), mostraron interacciones significativas tratamiento × dosis (*p* < 0,05), en los suelos RAB, TOM y SAN, mientras que para ENC (D), solo existieron diferencias significativas respecto al tratamiento, resultando todos, excepto HAS, en concentraciones de Cu inferiores al C. Del mismo modo, en el suelo SAN (C), ninguna combinación de tratamiento y dosis fue significativamente superior al C. En los dos suelos restantes se obtuvieron concentraciones de Cu significativamente superiores en HAS-25, RSU 25 y 50 y VER-50 (RAB, A) y HAS 25 (TOM, B).



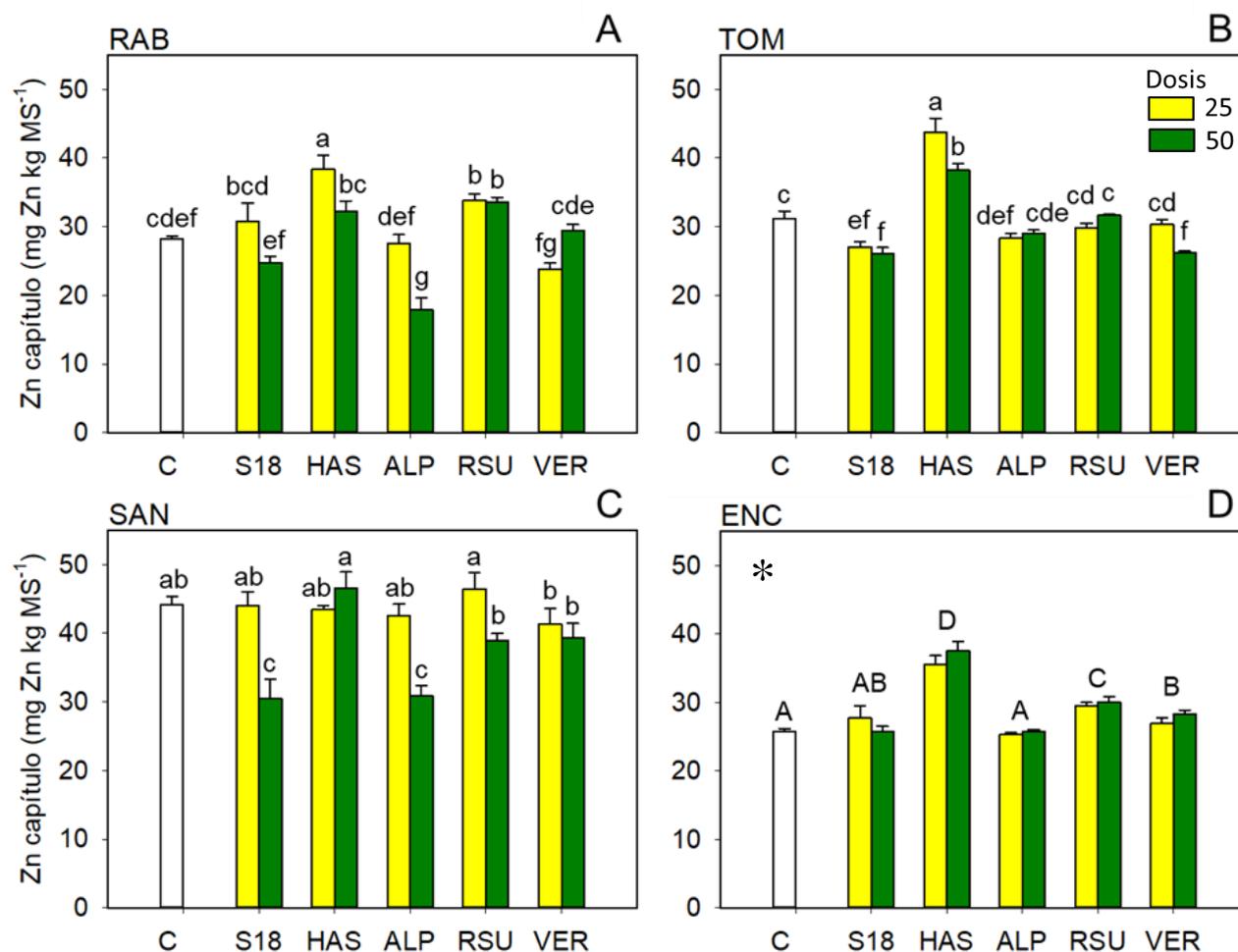
**Figura 4.9 Concentración de Cu en el capítulo** (mg Cu kg MS<sup>-1</sup>) (media ± error estándar,  $n = 5$ ) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ).



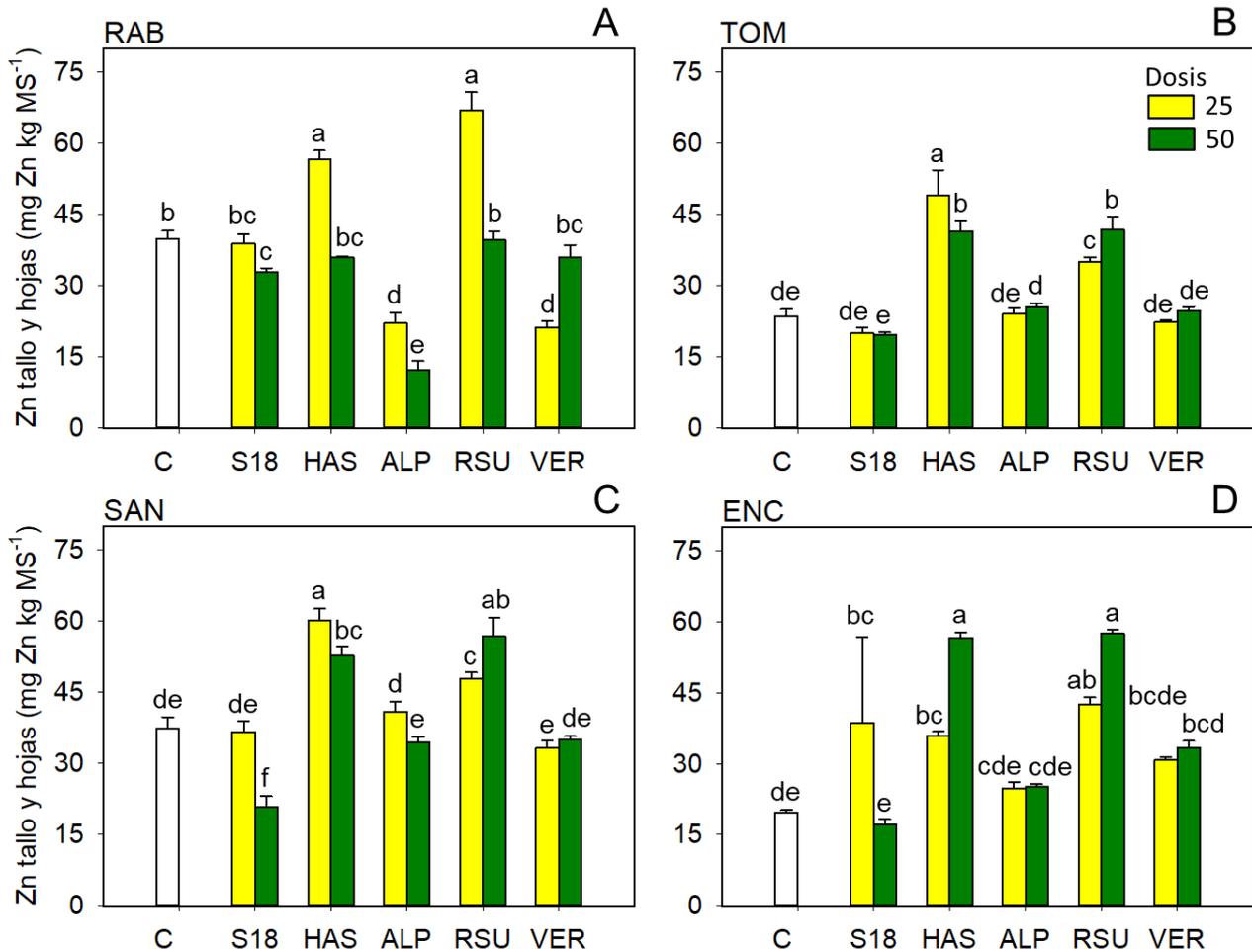
**Figura 4.10 Concentración de Cu en el tallo y las hojas** (mg Cu kg MS<sup>-1</sup>) (media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamientos conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). \*Letras en orden inverso debido a la transformación inversa de los datos.

En la Figura 4.11 (concentración de Zn en el capítulo) se observa la existencia de interacciones significativas entre tratamiento y dosis en los suelos RAB, TOM y SAN ( $p < 0,05$ ), en los cuales, las combinaciones de tratamiento y dosis que produjeron incrementos significativos en la concentración de Zn respecto al C fueron, HAS-25 y RSU 25 y 50 en RAB (A) y HAS 25 y 50 en TOM (B). Sin embargo, en el suelo SAN ninguna combinación resultó en concentraciones de Zn en el capítulo

significativamente superiores al C. En el suelo ENC, donde solo existieron diferencias significativas respecto al tratamiento, HAS, RSU y VER incrementaron la concentración de Zn respecto al C. En la Figura 4.12 se observa como existieron interacciones significativas tratamiento  $\times$  dosis en los 4 suelos ( $p < 0,05$ ) para la concentración de Zn en el tallo y las hojas. Las combinaciones de tratamiento y dosis que incrementaron la concentración de Zn en el tallo de forma significativa respecto al C fueron, HAS-25 y RSU-25 en RAB (A), HAS y RSU 25 y 50 en los suelos TOM (B) y SAN (C), y S18-25 y HAS y RSU 25 y 50 en el suelo ENC (D).



**Figura 4.11 Concentración de Zn en el capítulo** (mg Zn kg MS<sup>-1</sup>) (media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamientos conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). \*Letras en orden inverso debido a la transformación inversa de los datos.



**Figura 4.12 Concentración de Zn en el tallo y las hojas** (mg Zn kg MS<sup>-1</sup>) (media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.5 Variables analizadas en el suelo

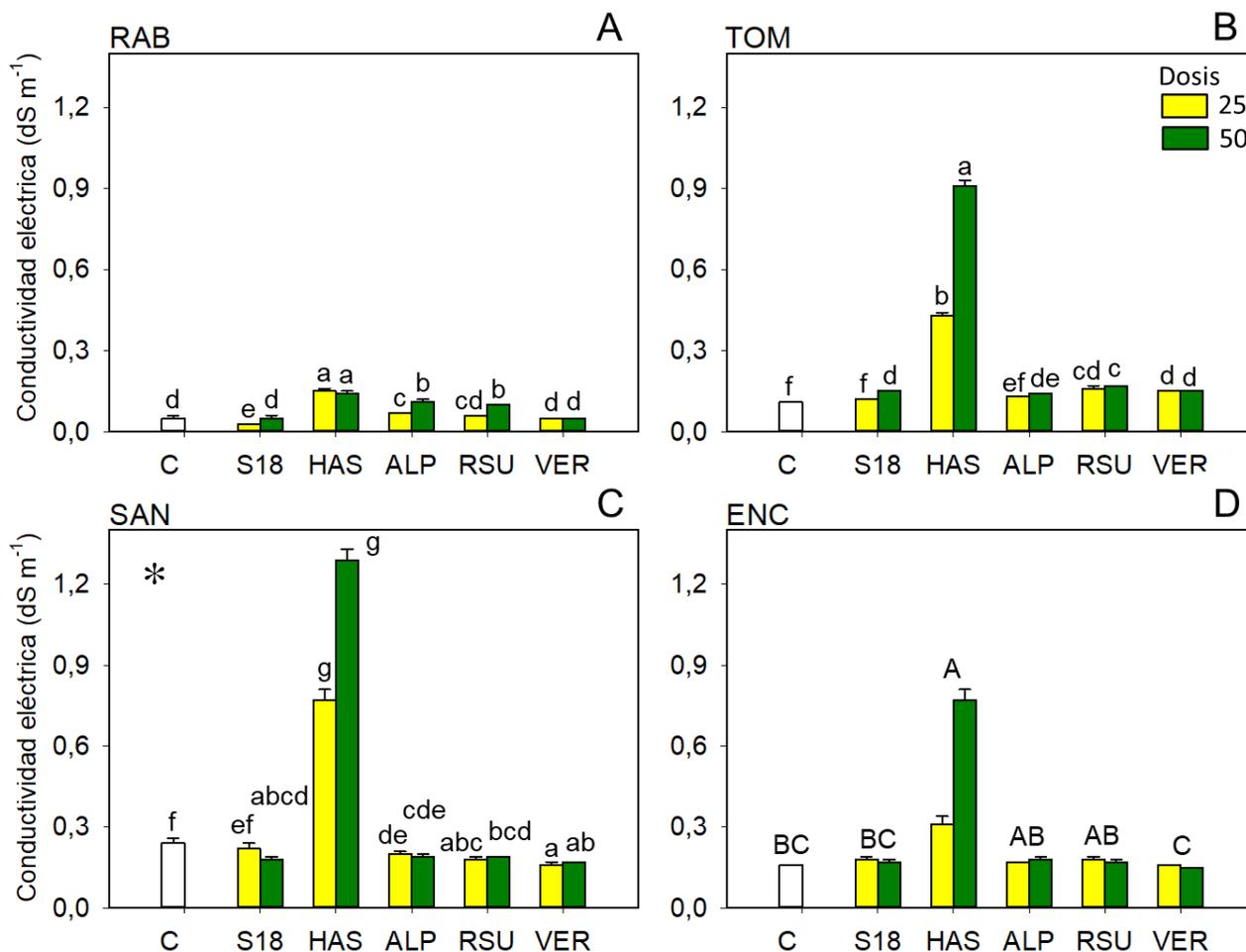
La Tabla A.8.5 de los Anexos recoge los  $p$  valores del ANOVA trifactorial (suelo, tratamiento y dosis), donde se observan las múltiples interacciones ( $p < 0,05$ ) para las variables pH (1:2,5), conductividad eléctrica (1:5), P Olsen, fosfatasa ácida y fosfatasa básica. De ahí que en este apartado solo se muestren los resultados del ANOVA de 2 factores para cada suelo independientemente.

En la Tabla 4.4, donde se recogen los resultados de pH, se observan interacciones significativas entre tratamiento y dosis en los suelos RAB y TOM ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en los suelos SAN y ENC, solo existieron diferencias significativas de pH según tratamiento. Comparando las combinaciones de tratamiento y dosis respecto al C y S18; ALP, RSU y VER 25 y 50 lo aumentaron en el suelo RAB (A), reduciéndolo HAS 25 y 50. En el suelo TOM, todos los tratamientos y dosis, excepto ALP 25, redujeron el pH. En el suelo SAN, VER lo aumentó, mientras que HAS lo redujo, como ocurrió en el suelo ENC para todos los tratamientos.

**Tabla 4.4 pH en el suelo (1:2,5).** Media y error estándar para cada tratamiento y dosis de P, ( $n = 5$ ) en cada suelo (RAB, TOM, SAN y ENC). ANOVA factorial (tratamiento, dosis P). Las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ).

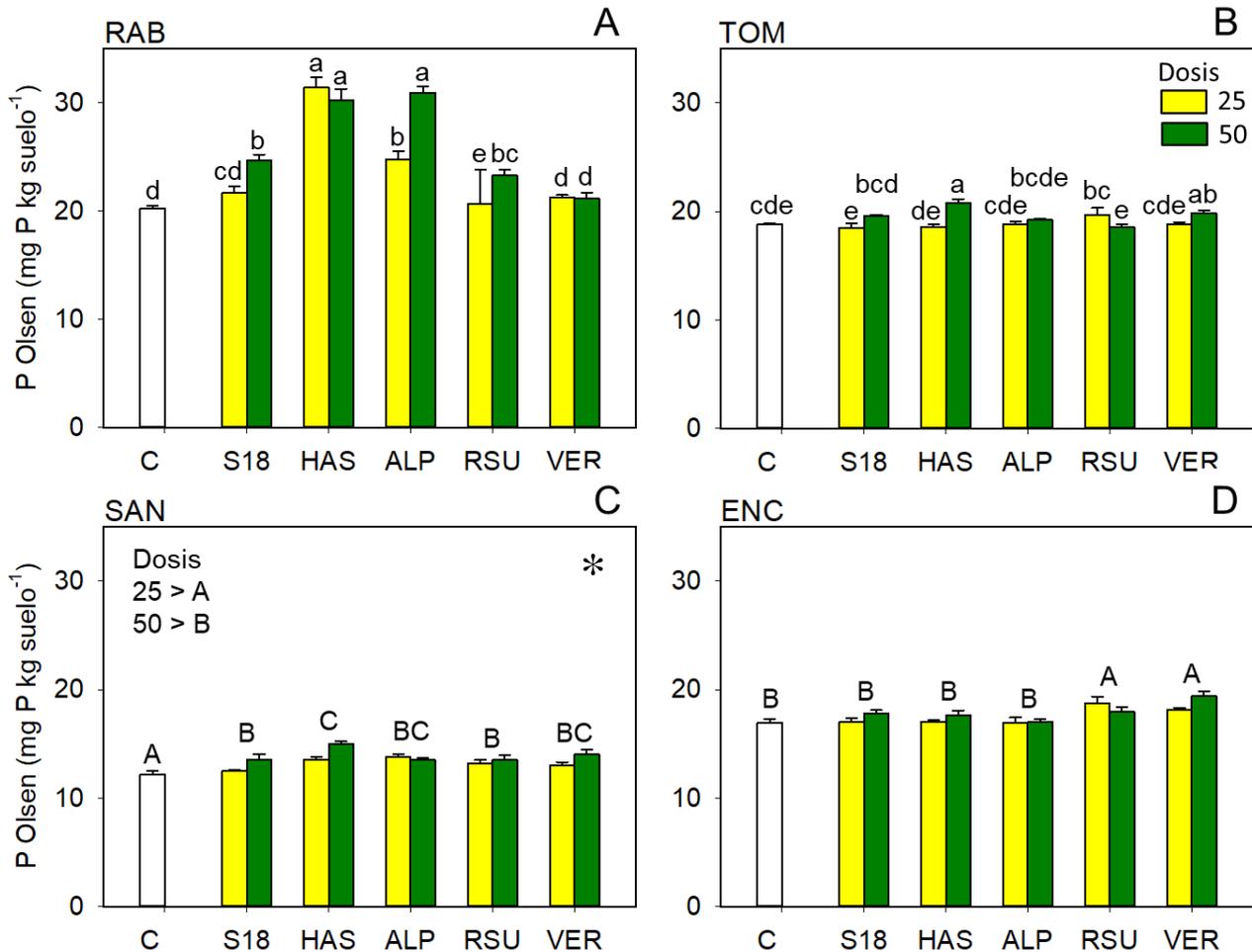
Suelo	RAB	TOM	SAN	ENC
Tratamiento				
Control	5,34 ± 0,06	7,85 ± 0,07	7,83 ± 0,05 b	7,84 ± 0,04 a
S18	5,25 ± 0,04	7,80 ± 0,02	7,89 ± 0,06 ab	7,63 ± 0,01 b
HAS	4,76 ± 0,09	7,15 ± 0,01	7,52 ± 0,03 c	7,38 ± 0,03 c
ALP	6,33 ± 0,12	7,51 ± 0,11	7,83 ± 0,01 b	7,58 ± 0,04 b
RSU	6,50 ± 0,13	7,40 ± 0,02	7,94 ± 0,05 ab	7,66 ± 0,04 b
VER	5,91 ± 0,07	7,37 ± 0,02	7,96 ± 0,06 a	7,58 ± 0,04 b
P valor (t)	<0,0001	<0,0001	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Dosis (mg P kg <sup>-1</sup> )				
25	5,51 ± 0,10	7,57 ± 0,05	7,86 ± 0,04	7,64 ± 0,03
50	5,86 ± 0,14	7,46 ± 0,06	7,80 ± 0,03	7,59 ± 0,03
P valor (d)	<0,0001	0,0047	0,0924	0,104
P valor (txd)	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,002</b>	0,3102	0,231
Tratamientos: C (sin P), S18 (super 18), HAS (harina de sangre), ALP (alperujo), RSU (residuo sólido urbano) y VER (vermicompost). La ausencia de letras indica la existencia de una interacción entre los factores tratamiento y dosis. En el caso de no existir interacción ( $p \text{ valor txd} > 0,05$ ), la ausencia de letras indica la inexistencia de diferencias significativas entre las medias.				

En la Figura 4.13 (CE en el extracto 1:5), donde existieron interacciones significativas tratamiento × dosis para todos los suelos ( $p < 0,05$ ), excepto en ENC (diferencias significativas según tratamiento), destacó el incremento de la CE que supuso el tratamiento HAS en sus 2 dosis de P (25 y 50) sobre los 4 suelos. Sin embargo, este efecto fue menor en el suelo RAB que en los 3 restantes. El comportamiento de los demás tratamientos y dosis, causaron diferentes efectos sobre la CE dependiendo del suelo.



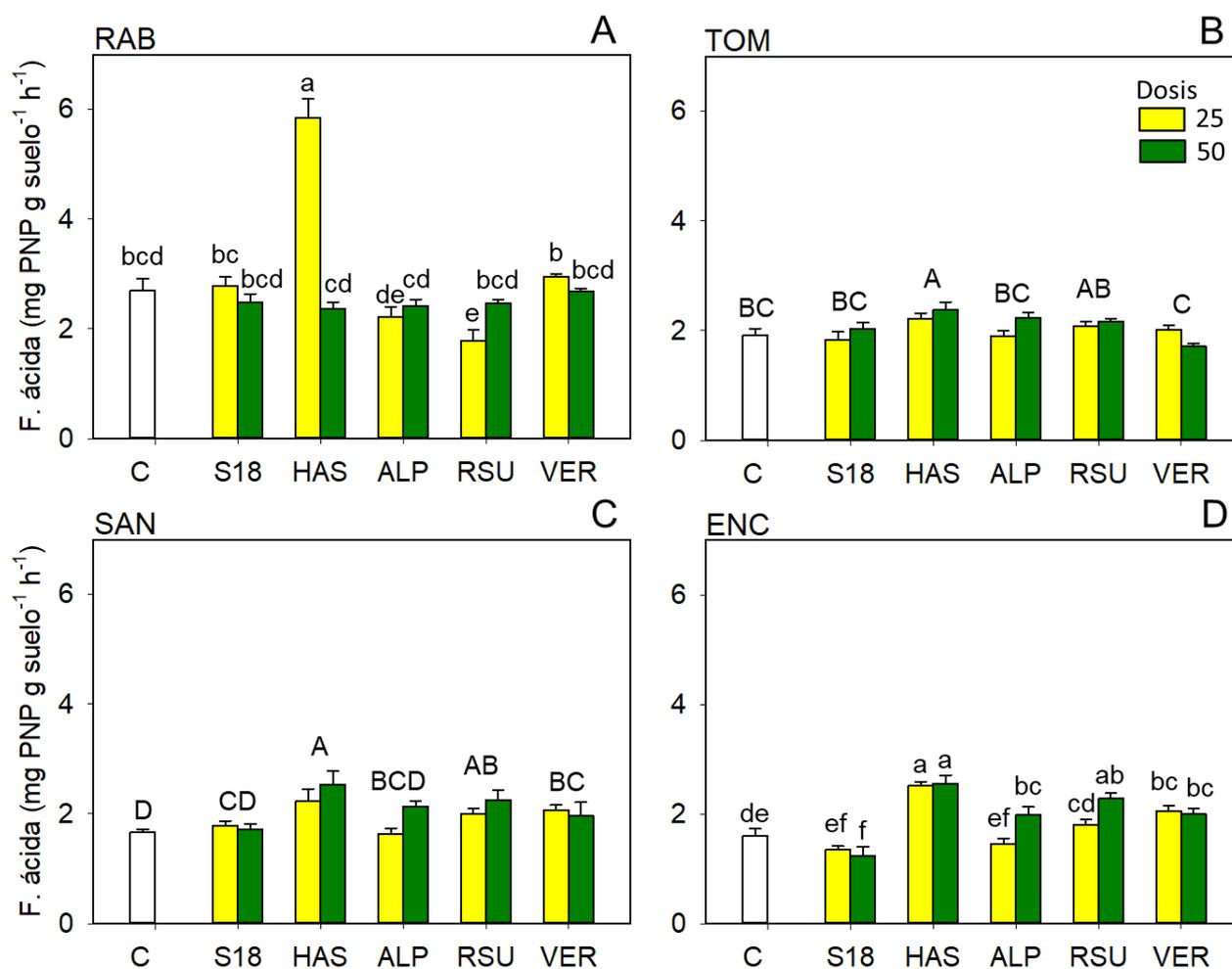
**Figura 4.13 Conductividad eléctrica en el suelo (dS m<sup>-1</sup>)** (media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamientos conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). \*Letras en orden inverso debido a la transformación inversa de los datos.

En cuanto a la concentración de P Olsen (Figura 4.14), solo se observaron interacciones significativas entre tratamiento y dosis en los suelos RAB y TOM ( $p < 0,05$ ). En ellos, las combinaciones que incrementaron significativamente el P Olsen respecto al C fueron HAS 25 y 50, ALP 25 y 50, S18-50 y RSU-50 (A), y HAS-50 y VER-50 (B). En el suelo SAN, todos los tratamientos incrementaron significativamente el P respecto al C, destacando HAS, además, estos valores aumentaron cuando se aplicó la dosis 25. Sin embargo, para el suelo ENC, fueron RSU y VER los tratamientos donde el P Olsen fue superior a los demás.



**Figura 4.14** P Olsen (mg P kg suelo<sup>-1</sup>) (media  $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamientos y/o dosis (leyenda) conforme al análisis post hoc LSD ( $p < 0,05$ ). \*Letras en orden inverso debido a la transformación inversa de los datos.

Respecto a los valores de fosfatasa ácida, se observaron interacciones significativas entre los factores tratamiento y dosis en los suelos RAB y ENC ( $p < 0,05$ ), donde las combinaciones que mostraron la mayor actividad fosfatasa fueron HAS-25 (A), muy superior a las demás, y HAS 25 y 50 (D). Sin embargo, para los suelos TOM y SAN, donde solo existieron diferencias significativas según tratamiento, fue HAS el que reportó mayores valores en ambos suelos, seguido de RSU y VER en SAN (C), significativamente superiores a C.



**Figura 4.15** Fوسفاتasa ácida (mg PNP g suelo<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (media ± error estándar, n = 5) de las plantas de girasol cultivadas sobre los suelos RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D) en función del tratamiento (C: sin P, S18: super 18, HAS: Harina de sangre, ALP: alperujo, RSU: residuo sólido urbano y VER: vermicompost) y de la dosis de P (25 y 50 mg P kg<sup>-1</sup>). Las letras indican diferencias significativas entre las medias para las distintas combinaciones de tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD (*p* < 0,05). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamientos conforme al análisis post hoc LSD (*p* < 0,05).

En la Tabla 4.5, se observa como los valores de fوسفاتasa básica en el suelo RAB fueron menores que en el resto de los suelos. Además, en el suelo SAN, existió una interacción significativa tratamiento x dosis (*p* < 0,05), donde la combinación HAS-25 presentó valores significativamente superiores al resto. En los suelos RAB, TOM y ENC, donde solo se observaron diferencias significativas según el tratamiento, ALP, RSU y HAS, en RAB, y HAS en ENC, presentaron valores

de fosfatasa básica significativamente superiores al C. Sin embargo, en el suelo TOM, solo S18 y HAS destacaron sobre el C, aunque sin diferencias significativas.

**Tabla 4.5 Fosfatasa Básica (mg PNP g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).** Media y error estándar para cada tratamiento y dosis de P, (*n* = 5) en cada suelo (RAB, TOM, SAN y ENC). ANOVA factorial (tratamiento, dosis P). Las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD (*p* < 0,05).

Suelo	RAB	TOM	SAN	ENC
Tratamiento				
Control	1,37 ± 0,17 c	4,76 ± 0,10 cd	3,63 ± 0,07	4,17 ± 0,24 b
S18	1,33 ± 0,15 c	5,14 ± 0,13 d	3,96 ± 0,19	4,11 ± 0,13 b
HAS	1,85 ± 0,08 b	5,29 ± 0,25 d	4,54 ± 0,28	6,60 ± 0,16 a
ALP	2,59 ± 0,22 a	4,15 ± 0,15 ab	4,03 ± 0,08	4,37 ± 0,11 b
RSU	2,12 ± 0,14 b	4,45 ± 0,10 bc	4,02 ± 0,10	4,27 ± 0,15 b
VER	1,36 ± 0,13 c	3,94 ± 0,10 a	3,47 ± 0,10	4,25 ± 0,10 b
P valor (t)	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001<sup>1</sup></b>	<0,0001	<b>&lt;0,0001<sup>2</sup></b>
Dosis (mg P kg <sup>-1</sup> )				
25	1,68 ± 0,09	4,65 ± 0,14	3,99 ± 0,12	4,60 ± 0,17
50	1,85 ± 0,14	4,59 ± 0,11	3,90 ± 0,09	4,65 ± 0,20
P valor (d)	0,159	0,808 <sup>1</sup>	0,4839	0,715 <sup>2</sup>
P valor (txd)	0,072	0,984 <sup>1</sup>	<b>0,0257</b>	0,217 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>P valor de datos transformados a la inversa, <sup>2</sup>P valor de datos transformados al cuadrado. Tratamientos: C (sin P), S18 (super 18), HAS (harina de sangre), ALP (alperujo), RSU (residuo sólido urbano) y VER (vermicompost). La ausencia de letras indica la existencia de una interacción entre los factores tratamiento y dosis. En el caso de no existir interacción (*p* valor txd > 0,05), la ausencia de letras indica la inexistencia de diferencias significativas entre las medias.



## 5. DISCUSIÓN

En este estudio se observó como la aplicación de fertilizantes de P de base orgánica (harina de sangre-HAS, alperujo compostado-ALP, residuo sólido urbano compostado-RSU y vermicompost-VER) tuvo diferentes efectos en el crecimiento del cultivo, debido fundamentalmente a la diferente composición de estos fertilizantes y a su aplicación sobre suelos con distintas propiedades físico-químicas (textura, pH, contenido en  $\text{CO}_3^{2-}$  y contenido en P Olsen). El efecto residual (segundo cultivo sobre el mismo suelo) que tuvieron estos fertilizantes de base orgánica sobre el desarrollo del cultivo de girasol fue comparable en la mayoría de los suelos al obtenido con la aplicación de un fertilizante tradicional de P (superfosfato 18, S18). Sin embargo, el tratamiento con HAS provocó por norma general un menor crecimiento de las plantas, asemejándose a la no aplicación de P (C). Este menor crecimiento fue el motivo principal de que el índice de clorofila (SPAD) fuese mayor en las plantas fertilizadas con HAS que con el resto de los tratamientos, ya que al haber crecido menos, la concentración de clorofila y de nutrientes en sus tejidos fue mayor, lo cual se reflejó en un elevado contenido de Fe, Cu y Zn en el tallo y en las hojas de estas plantas. Además, el alto contenido de nitrógeno (N) en la HAS respecto al resto de los fertilizantes de base orgánica, también pudo incrementar el verdor en las hojas.

La absorción de P y de micronutrientes como Fe, Cu y Zn por el cultivo, se encuentra estrechamente ligada a la presencia y disponibilidad de estos elementos en el suelo. En los suelos calcáreos como TOM, SAN y ENC, donde la dinámica de estos nutrientes es de mayor complejidad, el contenido de P y de micronutrientes fue inferior a los del suelo RAB (no calcáreo), como era de esperar. De acuerdo con Alloway (2009) el elevado pH de los suelos calcáreos, tamponado alrededor de 8.0 debido a la presencia de carbonatos, limita la disponibilidad de los nutrientes en este tipo de suelos y, por lo tanto, también puede limitar el crecimiento de los cultivos. Aun así, los valores de micronutrientes en el suelo RAB (especialmente Fe y Cu) son considerablemente elevados, lo que podría explicarse porque la recogida del suelo para el presente estudio se hiciera en una época en la que se hubiese realizado recientemente algún tipo de tratamiento al olivar, cultivado en intensivo en la finca donde se recogió el suelo.

En un estudio llevado a cabo por Recena et al. (2017) se determinó que la fracción de P orgánico puede representar hasta un 75% del P total en suelos mediterráneos, lo que implica de forma directa una menor disponibilidad de P para los cultivos en los suelos calcáreos, que se refleja de forma directa en el contenido de P disponible para los cultivos (P Olsen) de los suelos TOM, SAN y ENC. Esta menor disponibilidad se observó en suelos como SAN (finca de cultivos en extensivo), con un

contenido inicial muy bajo de P disponible, debido principalmente a la no fertilización con P en esta finca en un periodo de tiempo considerable, y como TOM y ENC (fincas de cultivos en extensivo), con un contenido medio debido a una fertilización más regular en los últimos años. Sin embargo, el uso de fertilizantes de base orgánica, en algunos casos, permitió que al final del cultivo de girasol se alcanzasen niveles de P Olsen en el suelo superiores al alcanzado con el fertilizante inorgánico S18. El motivo por el que el nivel de P Olsen se ha mantenido en el suelo o incluso se ha incrementado con la aplicación de fertilizantes de base orgánica tras dos cultivos (trigo y girasol), reside en el contenido de materia orgánica aportado mediante estos fertilizantes, lo que según Krey et al. (2013) favoreció un incremento de la actividad microbiana en el suelo, y por ello de la mineralización de los nutrientes como el P, que en un primer momento se encontraba en formas orgánicas como parte de estos fertilizantes y que se ha ido transformado en formas de P disponibles para los cultivos por medio de la acción de los microorganismos del suelo (mineralización).

El incremento en la disponibilidad de nutrientes (como el P) en el suelo fue clave para mejorar su absorción por las plantas, como pudo observarse en las plantas de girasol que crecieron sobre el suelo RAB (no calcáreo), donde además del elevado P disponible que el suelo contenía de forma inicial, las plantas pudieron tomar parte del P presente tanto en formas orgánicas (tras la acción de los microorganismos) como inorgánicas en los fertilizantes de base orgánica (He et al., 2009). Así la mineralización continua del P orgánico produjo un aumento de la absorción de P por la planta. Esto ocurrió en el suelo RAB para los tratamientos RSU y VER, sin embargo, esta absorción fue menor cuando se utilizó tanto el fertilizante químico S18, como los fertilizantes orgánicos HAS y ALP para este suelo. No obstante, en los suelos calcáreos, las plantas que fueron fertilizadas con fertilizantes de base orgánica también alcanzaron contenidos de P similares e incluso superiores a los obtenidos con la aplicación del fertilizante inorgánico de P (S18). A pesar de ello, en los suelos TOM y SAN, con niveles iniciales de P Olsen medio y bajo, los fertilizantes orgánicos aplicados en la dosis  $50 \text{ mg P kg}^{-1}$ , permitieron generalmente una mayor absorción de P por el cultivo que con la dosis  $25 \text{ mg P kg}^{-1}$ . La razón por la cual las plantas fertilizadas con fertilizantes de base orgánica absorbieron cantidades similares de P a las plantas fertilizadas con S18 fue que, el P presente en los fertilizantes de base orgánica, que se encuentra principalmente en distintas formas orgánicas, es transformado hacia formas de P disponibles para los cultivos mediante un proceso de mineralización (Bowman y Cole, 1978). En este proceso, los microorganismos del suelo tienen un importante papel, ya que son los encargados de incrementar la actividad de las enzimas que hidrolizan las formas orgánicas de P, realizando aportes de P inorgánico al suelo al ritmo en el que las plantas lo van demandando (Annaheim et al., 2013).

Por el contrario, y de forma más acusada en suelos calcáreos (Chand y Tomar, 1994), la aplicación del fertilizante químico de P S18, que proporciona P en formas inmediatamente disponibles para los cultivos, tiene como consecuencia la inmovilización de una fracción considerable del mismo por la materia orgánica del suelo o por su precipitación en formas de P insolubles como fosfatos de Ca o Fe (Shen et al., 2011). Esto suele ocurrir cuando el fertilizante químico se va disolviendo y se generan elevadas concentraciones de P (elemento poco móvil en suelo) alrededor del grano de fertilizante, favoreciéndose su precipitación. Sin embargo, con la aplicación de fertilizantes de base orgánica, al ser la mineralización un proceso más gradual, el P (y otros nutrientes) va liberándose gradualmente en formas inorgánicas favoreciéndose una mayor disponibilidad para las plantas (y microorganismos del suelo) y una menor precipitación.

La mineralización del P es un proceso complejo en el que participan los microorganismos del suelo que producen enzimas encargadas de poner el P orgánico a disposición de los cultivos (Dick et al., 2000). Para ello, el P orgánico experimenta una serie de reacciones como la hidrólisis de estas formas orgánicas complejas y su transformación a formas inorgánicas, más simples y asimilables por el cultivo. La cuantificación de la actividad de estas enzimas permite estimar la capacidad de los microorganismos del suelo para mineralizar el P orgánico. Así, los valores de la fosfatasa ácida y básica al final del ciclo del cultivo pueden ofrecer una idea de la tasa de mineralización del P orgánico cuando el cultivo se encontraba en plena floración. En los suelos calcáreos, se obtuvieron niveles de fosfatasa ácida más elevados cuando se aplicaron fertilizantes de base orgánica que cuando se utilizó el fertilizante químico S18. Este comportamiento se observó con los tratamientos de HAS, RSU y VER, para los suelos SAN y ENC, y para HAS, RSU y ALP en el caso del suelo TOM, obteniéndose siempre en mayor cantidad para la dosis 50 mg P kg<sup>-1</sup>. Estos niveles de fosfatasa ácida confirman la capacidad de los fertilizantes de base orgánica de promover la actividad de las enzimas y los microorganismos del suelo, y también se observa como en el suelo donde se aplicaron estos fertilizantes orgánicos, la tasa de mineralización del P orgánico era mayor que en los suelos donde el P se aplicó en formas inorgánicas. En el suelo ENC, incluso se puede observar como el nivel de fosfatasa ácida para el C (sin P aplicado) era superior al del fertilizante S18, debido a que estas enzimas se produjeron en mayor medida para hidrolizar el P presente en este suelo en formas no disponibles para los cultivos, de forma que se pudiesen satisfacer los requerimientos de P del cultivo. Sin embargo, cuando el S18 se aplicó al suelo, no se favoreció la actividad de los microorganismos (de acuerdo con el comentario anterior), por poner a disposición de las plantas altos niveles de P inmediatamente disponible.

Sin embargo, para el suelo RAB, con un mayor nivel de P disponible para los cultivos, no existieron diferencias en la actividad de la fosfatasa ácida entre la aplicación de fertilizantes de base orgánica y la aplicación del fertilizante S18, ya que no existió la necesidad de mineralizar el P que fue demandado por las plantas, al existir cantidades suficientes de P disponible en el suelo. Tan solo destacó muy por encima del resto la fosfatasa ácida en el tratamiento de HAS dosis 25, lo que pudo ser consecuencia del escaso crecimiento que tuvo el cultivo anterior y, por lo tanto, al inmovilizarse el fósforo presente en el suelo por no haber sido utilizado, requirió una mayor actividad de las enzimas en este momento para proveer de P al cultivo de girasol en formas asimilables por el mismo.

Respecto a la fosfatasa básica, los menores valores de esta enzima se obtuvieron para el suelo RAB en comparación con los 3 suelos calcáreos. Esto se debe fundamentalmente al pH ácido de este suelo, en comparación con el pH de los suelos calcáreos, donde la actividad de esta enzima fue bastante mayor, entre otros motivos por la escasa disponibilidad inicial de P en el suelo, lo que obligó a mineralizar el P orgánico presente en los fertilizantes de base orgánica como HAS, ALP y RSU, que dieron lugar a los mayores valores de fosfatasa básica en los suelos calcáreos SAN y ENC.

Los fertilizantes de base orgánica, además de aportar P y mantener niveles de P disponible en suelo similares e incluso superiores a los observados para el S18, favorecen la funcionalidad (Glenk et al., 2012) y salud del suelo a diferencia de los fertilizantes inorgánicos (en este caso, el S18). Cabe destacar la ya comentada actividad de los microorganismos del suelo, que se ve favorecida con la aplicación de productos orgánicos al suelo. Asimismo, el ciclo de otros elementos (no solo el P) se puede ver favorecido porque los fertilizantes de P base orgánica constituyen también un importante input de micronutrientes como el Fe, Cu y Zn al suelo.

El contenido de micronutrientes en el material vegetal osciló en función de los fertilizantes de base orgánica utilizados y de los suelos sobre los que se aplicó, además, la concentración de los nutrientes en las distintas partes de la planta, dependieron de la dinámica de cada nutriente y de su movilidad en los tejidos vegetales. En el caso del Fe, tanto su concentración en el capítulo, como en el tallo y las hojas fue menor en la mayoría de los suelos cuando se aplicaron fertilizantes de base orgánica que cuando se utilizó S18. Tan solo el tratamiento de HAS en la dosis de 25 mg P kg<sup>-1</sup>, aumentó la concentración de Fe en el tallo y las hojas de las plantas cultivadas sobre los 4 suelos. Esta menor concentración de Fe generalizada pudo deberse a que los fertilizantes de base orgánica pusieron a disposición del cultivo una mayor cantidad de P, pudiendo desarrollarse efectos antagónicos entre ambos nutrientes como los estudiados por Sánchez-Rodríguez et al. (2013; 2014; 2015) o a una inmovilización de parte de dichos nutrientes por los microorganismos del suelo.

Las concentraciones de Cu fueron mayores en el capítulo que en el tallo y las hojas para los 4 suelos, lo que pudo deberse a una traslocación de este nutriente al órgano floral que en el momento de la cosecha se encontraba completamente abierto. Esto se reflejó de una forma más evidente en el suelo ENC, donde la concentración de Cu en el tallo y las hojas fue muy inferior a los demás suelos, coincidiendo con que este fue el suelo donde las plantas alcanzaron antes la apertura floral. Sin embargo, en el suelo SAN, donde algunas plantas no alcanzaron la plena floración y estas fueron más pequeñas, por norma general reportó las concentraciones de Cu más elevadas, tanto en el capítulo, como en el tallo y las hojas.

Las concentraciones de Zn en el material vegetal también fueron muy variadas en función del suelo, el tratamiento y la dosis de P. El tratamiento con HAS supuso una mayor concentración de Zn en las plantas que crecieron sobre los 4 suelos, tanto en el capítulo, como en el tallo y las hojas, donde también destacó RSU, tratamiento más rico en Zn, por lo que aumentó la fitodisponibilidad del mismo en el suelo favoreciendo su absorción por el cultivo. Estudios anteriores han mostrado que la aplicación combinada de ambos nutrientes, P y Zn es la estrategia idónea para aumentar producción y calidad del grano en cereales como el maíz, minimizando problemas de precipitación de fosfatos de Zn en el suelo y de traslocación de ambos nutrientes al grano (Sánchez-Rodríguez et al., 2021).

Esta menor disponibilidad de nutrientes en los suelos calcáreos se reflejó de forma directa en el rendimiento potencial y en la biomasa de las plantas cultivadas sobre estos suelos. Concretamente, las que crecieron sobre el suelo SAN mostraron un rendimiento potencial y una biomasa inferior al resto de los suelos, debido principalmente al escaso contenido inicial de P Olsen y de micronutrientes en este suelo. El P es un elemento poco móvil en el suelo y, una vez los valores de P disponible han descendido considerablemente, es complicado volver a recuperar valores adecuados para el cultivo, lo que se demuestra con los resultados del presente estudio (SAN VS. TOM y ENC); por su compleja dinámica en suelos calcáreos, se requerirían aplicaciones frecuentes de P no muy elevadas para incrementar la disponibilidad de este elemento hasta valores satisfactorios para los cultivos. No obstante, las plantas que crecieron sobre los 3 suelos calcáreos y que fueron fertilizadas con fertilizantes de base orgánica alcanzaron un rendimiento potencial similar o incluso mayor al obtenido con la aplicación en cada suelo del fertilizante químico S18, exceptuando el tratamiento de HAS. Sin embargo, en el suelo ENC, este tratamiento también resultó en rendimientos potenciales superiores al fertilizante inorgánico, lo que pudo deberse a la textura arcillosa del suelo ENC, que favoreció la adsorción de determinados compuestos (potencialmente tóxicos para la planta) de la HAS en la superficie de estas arcillas, los cuales, en otros suelos pudieron haber limitado el crecimiento de las plantas. Por otro lado, en el suelo arenoso RAB el efecto de estos subproductos sobre el incremento

del rendimiento potencial y de la biomasa no fue tan notable como en los suelos calcáreos. Esto se debió fundamentalmente al pH ácido de este suelo, donde los nutrientes se encontraron con una mayor disponibilidad para los cultivos, no limitando en ningún caso el desarrollo del girasol.

Este estudio ha permitido conocer cómo afectan la aplicación de los fertilizantes de P de base orgánica a propiedades físico-químicas del suelo como el pH y la conductividad eléctrica. Esta última variable experimentó de forma general un incremento considerable cuando se aplicó HAS. El aumento observado en la conductividad eléctrica provocó una reducción del rendimiento potencial en las plantas que crecieron sobre los suelos TOM y SAN y que habían sido fertilizadas con HAS. Sin embargo, en el suelo RAB, de lavado más fácil debido a su textura arenosa, este aumento de la conductividad eléctrica fue mucho menor que en los suelos calcáreos TOM, SAN y ENC. También los fertilizantes de base orgánica causaron una reducción del pH de los suelos calcáreos TOM y ENC permitiendo así incrementar la disponibilidad de nutrientes en este tipo de suelos, donde su pH básico es el factor principal que limita la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, en los suelos ácidos como RAB, será más aconsejable el uso de fertilizantes de base orgánica como ALP, RSU y VER, los cuales incrementaron su pH, al contrario de lo que ocurrió con el tratamiento HAS, que lo redujo aún más, alcanzándose valores de pH en suelo que pueden afectar negativamente al desarrollo de los cultivos.

Finalmente, después de analizar detenidamente los resultados obtenidos en este estudio, se puede afirmar que el uso de fertilizantes de P de base orgánica ha permitido un correcto desarrollo del cultivo de girasol sobre los 4 suelos utilizados. Esto se demuestra con los resultados de rendimiento potencial y biomasa del cultivo, donde se observó que con el uso de estos subproductos se alcanzaron los mismos valores de productividad que en el caso de utilizar un fertilizante químico de P como el S18, salvo en casos puntuales que se han remarcado anteriormente. Del mismo modo, el contenido de nutrientes como P, Fe, Cu y Zn fue similar o incluso superior para muchas combinaciones de estos fertilizantes de base orgánica y de las dosis de P empleadas, que al utilizar el fertilizante químico.

De esta manera y en línea con Ott y Rechberger (2012), la aplicación de estas estrategias de fertilización han conseguido que nutrientes como el P se reincorporen y se reutilicen en los propios sistemas agroindustriales, de forma que con la aplicación de estas prácticas basadas en la economía circular se consiga cerrar el ciclo de los nutrientes en estos sistemas. Además, mediante el uso de los fertilizantes de base orgánica se reduce la generación de residuos procedentes de distintas actividades y se aumenta la salud del suelo, ya que el aporte de materia orgánica de estos fertilizantes incentiva la actividad y la presencia de los microorganismos en el suelo, que junto con las plantas permiten realizar un intercambio constante de nutrientes.

Aunque las formas de carbono e incluso la materia orgánica en suelo al final del ensayo no se han determinado en este estudio, el secuestro de carbono es otra de las funciones del suelo que se ve favorecida con la aplicación de subproductos de base orgánica como fertilizantes, así como el incremento de la materia orgánica del suelo, que es uno de los objetivos básicos que se proponen desde la Misión “Un acuerdo sobre el suelo para Europa” del programa Horizonte Europa, cuyo lema es: *Cuidar del suelo es cuidar la vida* ([https://research-and-innovation.ec.europa.eu/system/files/2020-09/ec\\_rtd\\_mission-soil-citizens-summary\\_es.pdf](https://research-and-innovation.ec.europa.eu/system/files/2020-09/ec_rtd_mission-soil-citizens-summary_es.pdf)) para los suelos mediterráneos, que tienen un contenido en materia orgánica escaso. Incrementar el contenido en materia orgánica de nuestros suelos tiene, a su vez, consecuencias positivas en la estructura del suelo y en el ciclo del agua (capacidad de regulación de inundaciones y sequías, disponibilidad y calidad del agua).

La aplicación de estas estrategias de fertilización permitirá trabajar en sintonía con los objetivos del *Green Deal* mediante la aplicación de los principios de economía circular, aumentando el porcentaje de suelos sanos y con múltiples funcionalidades, que permitan construir sobre ellos sistemas agroindustriales sostenibles y resilientes de forma que además de aumentar la productividad de los cultivos, el suelo aporte otros servicios ecosistémicos a la creciente población actual.

Finalmente, dadas las circunstancias ambientales, económicas e incluso las tensiones geopolíticas en las que se ve inmersa la agricultura, las estrategias de fertilización deben ser integrales, holísticas, y contemplar no sólo el aporte de un determinado nutriente (en este caso el P) sino la capacidad del suelo de proveer servicios ecosistémicos, su funcionalidad y la salud del suelo.

## 5.1 TRABAJO FUTURO

El ensayo realizado en este TFM ha permitido obtener resultados de gran interés. Aún así se deberían realizar otras determinaciones adicionales que permitan obtener información sobre la relación existente entre la dinámica de nutrientes aportados por estos fertilizantes de base orgánica y las propiedades del suelo que influyen en ella. Para ello, como continuación de este estudio se seguirá avanzando con diferentes análisis entre los que destaca la determinación de la actividad de otras enzimas de suelo como la  $\beta$ -glucosidasa, donde se obtendrán resultados relacionados con la dinámica del carbono y de como ésta se modifica al aplicar fertilizantes con contenidos altos de materia orgánica. El estudio de la modificación de las formas de carbono y las distintas fracciones de P en suelo debido a la aplicación de fertilizantes de base orgánica es otro de los aspectos que quedan pendientes como trabajo futuro para completar lo presentado en el presente trabajo.

Además, de forma externa a este TFM, se llevarán a cabo distintos ensayos de campo donde se combinarán productos orgánicos con fertilizantes químicos y se evaluará su efecto sobre distintos suelos y cultivos sometidos a diferentes manejos agrícolas. De este modo se conseguirá determinar, en condiciones de campo, el efecto de estos fertilizantes de base orgánica sobre el suelo y los cultivos.

## 6. CONCLUSIONES

1. Los fertilizantes de P de base orgánica utilizados en este estudio permitieron incrementar la disponibilidad de P en suelos calcáreos a niveles similares a los obtenidos con el uso de fertilizantes de síntesis (inorgánicos) de P, incluso después de dos cultivos (trigo y girasol).
2. El efecto residual de los fertilizantes de P de base orgánica ALP, RSU y VER sobre el crecimiento y el rendimiento del cultivo de girasol, fue comparable al obtenido con el uso de fertilizantes químicos tradicionales (S18).
3. Las propiedades físico-químicas de los suelos utilizados, como el pH y el contenido de  $\text{CO}_3^{2-}$ , influyeron sobre la dinámica de los nutrientes aportados con la aplicación de fertilizantes de P de base orgánica. Estas diferencias se observaron entre los suelos calcáreos y el no calcáreo evaluado.
4. Los fertilizantes de P de base orgánica modificaron la actividad enzimática de la fosfatasa ácida y básica en los suelos calcáreos de una forma distinta a como lo hizo el fertilizante inorgánico de P S18. Esta variación puede estar relacionada con el aumento de la mineralización del P orgánico contenido en los fertilizantes de base orgánica.
5. El fertilizante de P de base orgánica HAS, realizó un aporte considerable de P y micronutrientes en los suelos calcáreos y de textura arcillosa, pero el incremento en la conductividad eléctrica del mismo desaconsejó su uso en zonas mediterráneas con escasas posibilidades de lavado (escasa precipitación). Su uso en suelos arenosos donde el lavado es más fácil puede ser más recomendable que en suelos calcáreos y/o arcillosos.
6. El efecto de la dosis de P tras dos cultivos (trigo y girasol) no fue apreciable en la mayoría de las variables analizadas, recomendándose el uso de una dosis similar a las dos utilizadas.



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alloway, B.J. (2009). Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environmental Geochemistry and Health*, 31, 537-548.
- Annaheim, K.E., Rufener, C., Frossard, E. & Bünemann, E. (2013). Hydrolysis of organic phosphorus in soil water suspensions after addition of phosphatase enzymes. *Biology and Fertility of Soils*, 49, 1203-1213.
- Barrow, N.J. & Debnath, A. (2014). Effect of phosphate status on the sorption and desorption properties of some soils of northern India. *Plant Soil*, 378, 383-395.
- Bowman, R.A. & Cole, C. (1978). Transformations of organic phosphorus substrates in soils as evaluated by NaHCO<sub>3</sub> extraction. *Soil Science*, 125, 49-54.
- Bünemann, E.K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R.E., Deyn, G.D., de Goede, R., Flesskens, L., Geissen, V., Kuyper, T.W., Mäder, P., Pulleman, M., Sukkel, W., van Groenigen, J.W. & Brussaard, L. (2018). Soil quality – A critical review. *Soil Biology and Biochemistry*, 120, 105-125.
- Chand, T. & Tomar, N.K. (1994). Correlation of soil properties with phosphate fixation in some alkaline-calcareous soils of northwest India. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 8, 77-91.
- Chen, M. & Graedel, T.E. (2016). A half-century of global phosphorus flows, stocks, production, consumption, recycling, and environmental impacts. *Global Environmental Change*, 36, 139-152.
- Chien, S.H. & Hammond, L.L. (1989). Agronomic effectiveness of partially acidulated phosphate rock as influenced by soil phosphorus-fixing capacity. *Plant Soil*, 120, 59-64.
- Costanza, R., d Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., Oneill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387, 253-260.
- Damon, P.M., Bowden, B., Rose, T. & Rengel, Z. (2014). Crop residue contributions to phosphorus pools in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 74, 127-137.
- de Freitas, J.R., Banerjee, M.R. & Germida, J.J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 24, 358-364.

- de Santiago, A., Quintero, J.M., Carmona, E. & Delgado, A. (2008). Humic substances increase the effectiveness of iron sulfate and Vivianite preventing iron chlorosis in white lupin. *Biology and Fertility of soils*, 44, 875-883.
- Delgado, A., Madrid, A., Kassem, S., Andreu, L. & del Campillo, M.D. (2002). Phosphorus fertilizer recovery from calcareous soils amended with humic and fulvic acids. *Plant and Soil*, 245, 277-286.
- Delgado, A. & Scalenghe, R. (2008). Aspects of phosphorus transfer from soils in Europe. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171, 552-575.
- Dick, W., Cheng, L. & Wang, P. (2000). Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1915-1919.
- Domínguez-Vivancos, A. (1996). *Tratado de fertilización*. Mundi-prensa.
- Eichler-Löbermann, B., Köhne, S., Kowalski, B., & Schnug, E. (2008). Effect of catch cropping on phosphorus bioavailability in comparison to organic and inorganic fertilization. *Journal of Plant Nutrition*, 31, 659-676.
- Ehlers, K., Bakken, L.R., Frostegard, A., Frossard, E. & Bünenmann, E.K. (2010) Phosphorus limitation in a Ferralsol: impact on microbial activity and cell internal P pools. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 558-566.
- Eivazi, F. & Tabatabai, M. (1977). Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9, 167-172.
- Elser, J. & Bennett, E. (2011). A broken biogeochemical cycle. *Nature*, 478, 29-31.
- Elser, J.J., Elser, T.J., Carpenter, S.R. & Brock, W.A. (2014). Regime Shift in Fertilizer Commodities Indicates More Turbulence Ahead for Food Security. *PLOS ONE*, 9 (5).
- Franz, M. (2008). Phosphate fertilizer from sewage sludge ash (SSA). *Waste Management*, 28, 1809-1818.
- Frossard, E., Condon, L.M., Oberson, A., Sinaj, S. & Fardeau, J.C. (2000). Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environmental Quality*, 29, 15-23.
- García-Albacete, M., Martín, A. & Cartagena, M.C. (2012) Fractionation of phosphorus biowastes: characterisation and environmental risk. *Waste Management*, 32:1061–1068
- García-López, A.M. & Delgado, A. (2016). Effect of *Bacillus subtilis* on phosphorus uptake by cucumber as affected by iron oxides and the solubility of the phosphorus source. *Agricultural and Food Science*, 25, 216-224.

- Gee, G.W. & Bauder, J.W. (1979). Particle-size analysis by hydrometer-simplified method for routine textural analysis and a sensitivity test of measurement parameters. *Soil Science Society of America Journal*, 43, 1004-1007.
- Gell, K., De Ruijter, F. J., Kuntke, P., De Graaff, M., & Smit, A. L. (2011). Safety and effectiveness of struvite from blackwater and urine as a phosphorus fertilizer. *Journal of Agricultural Science*, 3, 67.
- Glenk, K., McVittie, A. & Moran, D. (2012). Deliverable D3.1: Soil and Soil Organic Carbon within an Ecosystem Service Approach Linking Biophysical and Economic Data. (<http://smartsoil.eu/smartsoil-toolbox/project-deliverables/>).
- Gopinath, K.A., Saha, S., Mina, B.L., Pande, H., Kundu, S. & Gupta, H.S. (2008). Influence of organic amendments on growth, yield and quality of wheat and on soil properties during transition to organic production. *Nutr Cycl Agroecosyst*, 82, 51–60.
- He, Z., Griffin, T.S. & Honeycutt, C.W. (2004). Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus in swine manure and soil. *Journal of Environmental Quality*, 33, 367-372.
- He, Z.L., Baligar, V., Martens, D.C., Ritchey, K.D. & Elrashidi, M. (1999). Effect of byproduct, nitrogen fertilizer, and zeolite on phosphate rock dissolution and extractable phosphorus in acid soil. *Plant Soil*, 208, 199-207.
- He, Z.Q., Honeycutt, C.W., Griffin, T.S., Cade-Menum, B.J., Pellechia, P.J. & Dou, Z.X. (2009). Phosphorus Forms in Conventional and Organic Dairy Manure Identified by Solution and Solid State P-31 NMR Spectroscopy. *Journal of Environmental Quality*, 38, 1909-1918.
- Hukari, S., Hermann, L. & Nattorp, A. (2016). From wastewater to fertilisers - Technical overview and critical review of European legislation governing phosphorus recycling. *Science of the Total Environment*, 542, 1127-1135.
- Jasinski, S.M. (2010) Phosphate rock: Mineral commodity summaries. US Geological Survey.
- Jorquera, M.A., Hernández, M.T., Rengel, Z., Marschner, P. & Mora ML. (2004) Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils*, 44, 25-34.
- Katanda, Y., Zvomuya, F., Flaten, D., & Cicek, N. (2016). Hog-manure-recovered struvite: Effects on canola and wheat biomass yield and phosphorus use efficiencies. *Soil Science Society of America Journal*, 80, 135-146.

- Krey, T., Vassilev, N., Baum, C. & Eichler-Löbermann, B. (2013). Effects of long-term phosphorus application and plantgrowth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. *European Journal of Soil Biology*, 55, 124-130.
- Lindsay, W.L. & Norwell, W.A. (1978). Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper. *Soil Science of America Journal*, 42, 421-428.
- MacDonald, G.K., Bennett, E.M., Potter, P.A. & Ramankutty, N. (2011). Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 3086-3091.
- McDowell, R.W., Cox, N., Daughney, C.J., Wheeler, D. & Moreau, M. (2015). A National Assessment of the Potential Linkage between Soil, and Surface and Groundwater Concentrations of Phosphorus. *Journal of the American Water Resources Association*, 51, 992-1002.
- Nash, D.M., Haygarth, P.M., Turner, B.L., Condon, L.M., McDowell, R.W., Richardson, A.E., Watkins, M. & Heaven, M.W. (2014). Using organic phosphorus to sustain pasture productivity: A perspective. *Geoderma*, 221, 11-19.
- Nesme, T. & Withers, P.J.A. (2016). Sustainable strategies towards a phosphorus circular economy. *Nutr Cycl Agroecosyst*, 104, 259–264.
- Olsen, S.R., Watanabe, F.S., Cosper, H.R., Larson, W.E. & Nelson, L.B. (1954). Residual Phosphorus Availability in long-time Rotations on Calcareous Soils. *Soil Science*, 78, 141-151.
- Ott C. & Rechberger, H. (2012). The European phosphorus balance. *Resources, Conservation and Recycling*, 60, 159-172.
- Pagliari, P.H. & Laboski, C.A. (2012). Investigation of the inorganic and organic phosphorus forms in animal manure. *Journal of Environmental Quality*, 41, 901-910.
- Pagliari, P.H. & Laboski, C.A. (2013). Dairy manure treatment effects on manure phosphorus fractionation and changes in soil test phosphorus. *Biology and Fertility of Soils*, 1-13.
- Pizzeghello, D., Berti, A., Nardi, S. & Morari, F. (2011). Phosphorus forms and P-sorption properties in three alkaline soils after long-term mineral and manure applications in north-eastern Italy. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 141, 58-66.
- Recena, R., Díaz, I. & Delgado, A. (2017). Estimation of total plant available phosphorus in representative soils from Mediterranean areas. *Geoderma*, 297, 10-18.

- Recena, R., Díaz, I., del Campillo, M.C., Torrent, J. & Delgado, A. (2016). Calculation of threshold Olsen P values for fertilizer response from soil properties. *Agronomy for Sustainable Development*, 36, 54.
- Richardson, A.E., Lynch, J.P., Ryan, P.R., Delhaize, E., Smith, F. A., Smith, S.E., Harvey, P.R., Ryan, M.H., Veneklaas, E.J., Lambers, H., Oberson, A., Culvenor, R.A. & Simpson, R.J. (2011). Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant Soil*, 349, 121-156.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability. Update on microbial phosphorus. *Plant Physiology*, 156, 989-996.
- Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., García, C., Hernández, T. & Tejada, M. (2015). Accelerated degradation of PAHs using edaphic biostimulants obtained from sewage sludge and chicken feathers. *Journal of Hazardous Materials*, 300, 35-42.
- Rosado, R., del Campillo, M.C., Martínez, M.A., Barrón, V. & Torrent, J. (2002). Long-term effectiveness of vivianite in reducing iron chlorosis in olive trees. *Plant and Soil*, 241, 139-144.
- Saavedra, C., Velasco, J., Pajuelo, P., Perea, F. & Delgado, A. (2007). Effects of tillage on phosphorus release potential in a Spanish vertisol. *Soil Science Society of America Journal*, 71, 56-63.
- Sample, E.C., Soper, R.J. & Racz, G.J. (1980). Reactions of phosphate fertilizers in soils. The role of phosphorus in agriculture, 263-310.
- Sánchez-Rodríguez, A.R., del Campillo, M.C. & Torrent, J. (2013). Phosphate aggravates iron chlorosis in sensitive plants grown on model calcium carbonate-iron oxide systems. *Plant and Soil*, 373, 31-42.
- Sánchez-Rodríguez, A.R., del Campillo, M.C. & Torrent, J. (2014). The severity of iron chlorosis in sensitive plants is related to soil phosphorus levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2766-2773.
- Sánchez-Rodríguez, A.R., del Campillo, M.C. & Torrent, J. (2017). Phosphorus reduces the zinc concentration in cereals pot-grown on calcareous Vertisols from southern Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3427-3432.
- Sánchez-Rodríguez, A.R., Rey, M.D., Nechate-Drif, H., Castillejo, M.A., Jorrián-Novo, J.V., Torrent, J., del Campillo, M.C. & Sacristán, D. (2021). Combining P and Zn fertilization to enhance yield and grain quality in maize grown on Mediterranean soils. *Scientific Reports*, 11, 1.

- Sattari, S.Z., Bouwman, A.F., Giller, K.E. & van Ittersum, M.K. (2012). Residual soil phosphorus as the missing piece in the global phosphorus crisis puzzle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6348-6353.
- Schröder, J.J., Smit, A.L., Cordell, D. & Rosemarin, A. (2011). Improved phosphorus use efficiency in agriculture: A key requirement for its sustainable use. *Chemosphere*, 84, 822-831.
- Schoumans, O.F., Bouraoui, F., Kabbe, C., Oenema, O. & van Dijk, K.C. (2015). Phosphorus management in Europe in a changing world. *Ambio*, 44, 180-192.
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W. & Zhang, F. (2011). Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiol*, 156, 997-1005.
- Sinaj, S., Traore, O. & Frossard, E. (2002). Effect of compost and soil properties on the availability of compost phosphate for white clover (*Trifolium repens* L.). *Nutrient Cycling Agroecosystems*, 62, 89-102.
- Staver, K.W. & Brinsfield, R.B. (2001). Agriculture and Water Quality on the Maryland Eastern Shore: Where Do We Go from Here? Long-term solutions to accelerated eutrophication must provide mechanisms for redistributing nutrients flowing into concentrated animal-producing regions. *BioScience*, 51, 859-868.
- Sundara, B., Natarajan, V. & Hari, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*, 77, 3-9.
- Van Wesemael, B., Verstraten, J.M. & Sevink, J. (1995) Pedogenesis by clay dissolution on acid, low-grade metamorphic rocks under mediterranean forests in southern Tuscany (Italy). *Catena*, 24, 105-125.
- Vogel, T., Eichler-Löbermann, B., & Nelles, M. (2017). Phosphorus effects of recycled products from municipal wastewater on crops in a field experiment. *Plant, Soil and Environment*, 63, 475-482.
- Walkley, A. & Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37, 29-38.
- Withers, P.J.A., van Dijk, K.C., Neset, T.S., Nesme, T., Oenema, O., Rubaek, G.H., Schoumans, O.F., Smit, B. & Pellerin, S. (2015). Stewardship to tackle global phosphorus inefficiency: The case of Europe. *AMBIO*, 44, 193-206.

Withers, P.J.A., Sylvester-Bradley, R., Jones, D.L., Healey, J.R. & Talboys, P.J. (2014). Feed the Crop not the Soil: Rethinking Phosphorus Management in the Food chain. *Environmental Science and Technology*, 48, 6523-6530.

Zoysa, A.K.N., Loganathan, P. & Hedley, M.J. (2001). Comparison of the agronomic effectiveness of a phosphate rock and triple superphosphate as phosphate fertilisers for tea (*Camellia sinensis* L.) on a strongly acidic Ultisol. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 59, 95-105.



## 8. ANEXOS

**Tabla A.8.1 Evolución del estadio fenológico (dosis 25)**, media para los distintos tratamientos (C, S18, HAS, ALP, RSU y VER), y suelos (RAB, TOM, SAN y ENC) ( $n = 5$ ). Tratamientos: C (sin P), S18 (super 18), HAS (harina de sangre), ALP (alperujo), RSU (residuo sólido urbano) y VER (vermicompost).

<b>Tiempo (DDS)</b>	<b>21</b>				<b>42</b>			
<b>Suelo</b>	RAB	TOM	SAN	ENC	RAB	TOM	SAN	ENC
Tratamiento								
C	30	30	30	30	32	32	32	32
S18	30	30	30	30	33	32	32	32
HAS	30	30	30	30	33	33	32	32
ALP	30	30	30	30	32	32	32	32
RSU	30	30	30	30	32	32	32	32
VER	30	30	30	30	33	32	32	32
<b>Tiempo (DDS)</b>	<b>62</b>				<b>76</b>			
<b>Suelo</b>	RAB	TOM	SAN	ENC	RAB	TOM	SAN	ENC
Tratamiento								
C	55	55	53	55	63	63	63	63
S18	55	55	53	54	63	63	63	63
HAS	55	55	53	55	62	62	61	63
ALP	55	55	54	55	63	63	63	63
RSU	53	55	55	55	63	63	63	63
VER	55	55	54	55	63	62	61	63

**Tabla A.8.2 Evolución del estadio fenológico (dosis 50)**, media para los distintos tratamientos (C, S18, HAS, ALP, RSU y VER), y suelos (RAB, TOM, SAN y ENC) ( $n = 5$ ). Tratamientos: C (sin P), S18 (super 18), HAS (harina de sangre), ALP (alperujo), RSU (residuo sólido urbano) y VER (vermicompost).

<b>Tiempo (DDS)</b>	<b>21</b>				<b>42</b>			
<b>Suelo</b>	RAB	TOM	SAN	ENC	RAB	TOM	SAN	ENC
Tratamiento								
C	30	30	30	30	32	32	32	32
S18	30	30	30	30	33	32	32	32
HAS	30	30	30	30	34	33	32	32
ALP	30	30	30	30	32	32	32	32
RSU	30	30	30	30	33	32	32	32
VER	30	30	30	30	32	32	32	32
<b>Tiempo (DDS)</b>	<b>62</b>				<b>76</b>			
<b>Suelo</b>	RAB	TOM	SAN	ENC	RAB	TOM	SAN	ENC
Tratamiento								
C	55	55	53	55	63	63	63	63
S18	55	55	55	55	63	63	63	63
HAS	55	55	51	55	63	62	57	63
ALP	55	55	55	55	63	63	63	63
RSU	55	55	55	54	63	62	63	63
VER	54	55	55	55	63	63	63	63

**Tabla A.8.3** ANOVA factorial (suelo, tratamiento, dosis P) para Rendimiento potencial, biomasa, índice de cosecha, P en capítulo, P en tallo y hojas y contenido de P en la planta, p valor para cada factor, interacciones dobles y triples.

Variable	Rdto. potencial	Biomasa	Índice de cosecha	P capítulo	P tallo y hojas	Contenido de P
<i>p</i> valor (s)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (t)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (d)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<b>0,939</b>	<b>0,5213</b>	<0,0001
<i>p</i> valor (s x t)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (s x d)	<0,0001	<0,0001	0,0013	<b>0,374</b>	0,0379	<0,0001
<i>p</i> valor (t x d)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (s x t x d)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

El código que acompaña a cada P valor indica el factor o la interacción a la que hacen referencia siendo: (s) suelo, (t) tratamiento, (d) dosis, (s x t) suelo x tratamiento, (s x d) suelo x dosis, (t x d) tratamiento x dosis, (s x t x d) suelo x tratamiento x dosis. Marcados en negrita los p valores > 0,05 (efecto del factor o interacción no significativa)

**Tabla A.8.4** ANOVA factorial (suelo, tratamiento, dosis P) para micronutrientes en el material vegetal: Fe, Cu, y Zn en capítulo; Fe, Cu y Zn en tallo y hojas, p valor para cada factor, interacciones dobles y triples.

Variable	Fe capítulo	Cu capítulo	Zn capítulo	Fe tallo y hojas	Cu tallo y hojas	Zn Tallo y hojas
<i>p</i> valor (s)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (t)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (d)	<b>0,438</b>	<0,0001	<0,0001	0,0009	<0,0001	<b>0,0312</b>
<i>p</i> valor (s x t)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0341	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (s x d)	<b>0,181</b>	<0,0001	<0,0001	<b>0,1583</b>	<0,0001	0,0002
<i>p</i> valor (t x d)	<b>0,732</b>	<0,0001	<0,0001	0,0031	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (s x t x d)	<b>0,228</b>	<0,0001	<0,0001	0,0009	<0,0001	<0,0001

El código que acompaña a cada P valor indica el factor o la interacción a la que hacen referencia siendo: (s) suelo, (t) tratamiento, (d) dosis, (s x t) suelo x tratamiento, (s x d) suelo x dosis, (t x d) tratamiento x dosis, (s x t x d) suelo x tratamiento x dosis. Marcados en negrita los p valores > 0,05 (efecto del factor o interacción no significativa)

**Tabla A.8.5** ANOVA factorial (suelo, tratamiento, dosis P) para pH (1:2,5), conductividad eléctrica (1:5), P Olsen, fosfatasa ácida y fosfatasa básica, p valor para cada factor, interacciones dobles y triples.

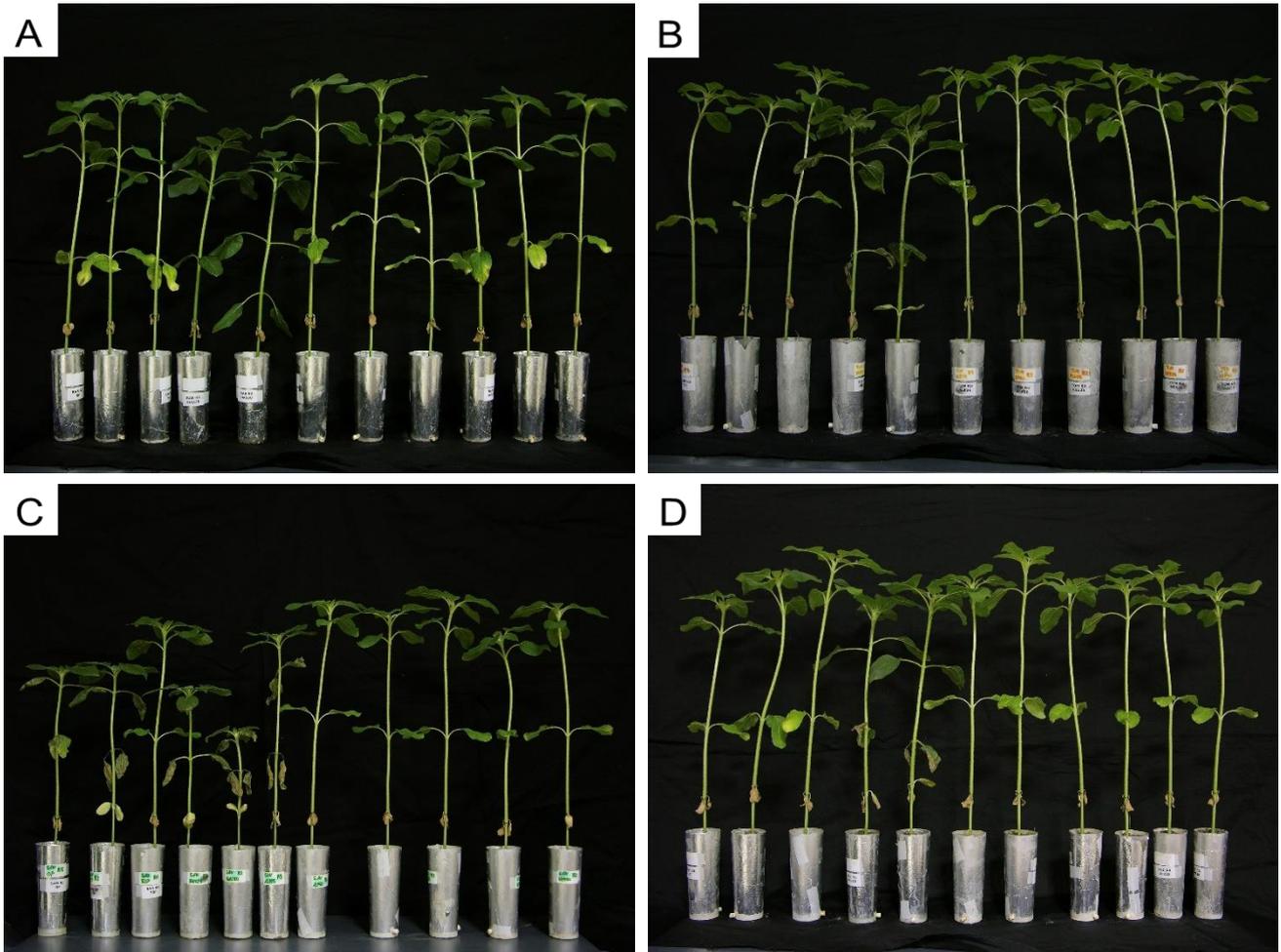
Variable	pH	CE	P Olsen	Fosfatasa ácida	Fosfatasa básica
<i>p</i> valor (s)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (t)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (d)	<b>0,0725</b>	<0,0001	<0,0001	<b>0,328</b>	<b>0,7764</b>
<i>p</i> valor (s x t)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>p</i> valor (s x d)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<b>0,4413</b>
<i>p</i> valor (t x d)	0,0014	<0,0001	0,0156	<0,0001	<b>0,1933</b>
<i>p</i> valor (s x t x d)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<b>0,0611</b>

El código que acompaña a cada P valor indica el factor o la interacción a la que hacen referencia siendo: (s) suelo, (t) tratamiento, (d) dosis, (s x t) suelo x tratamiento, (s x d) suelo x dosis, (t x d) tratamiento x dosis, (s x t x d) suelo x tratamiento x dosis. Marcados en negrita los p valores > 0,05 (efecto del factor o interacción no significativa)

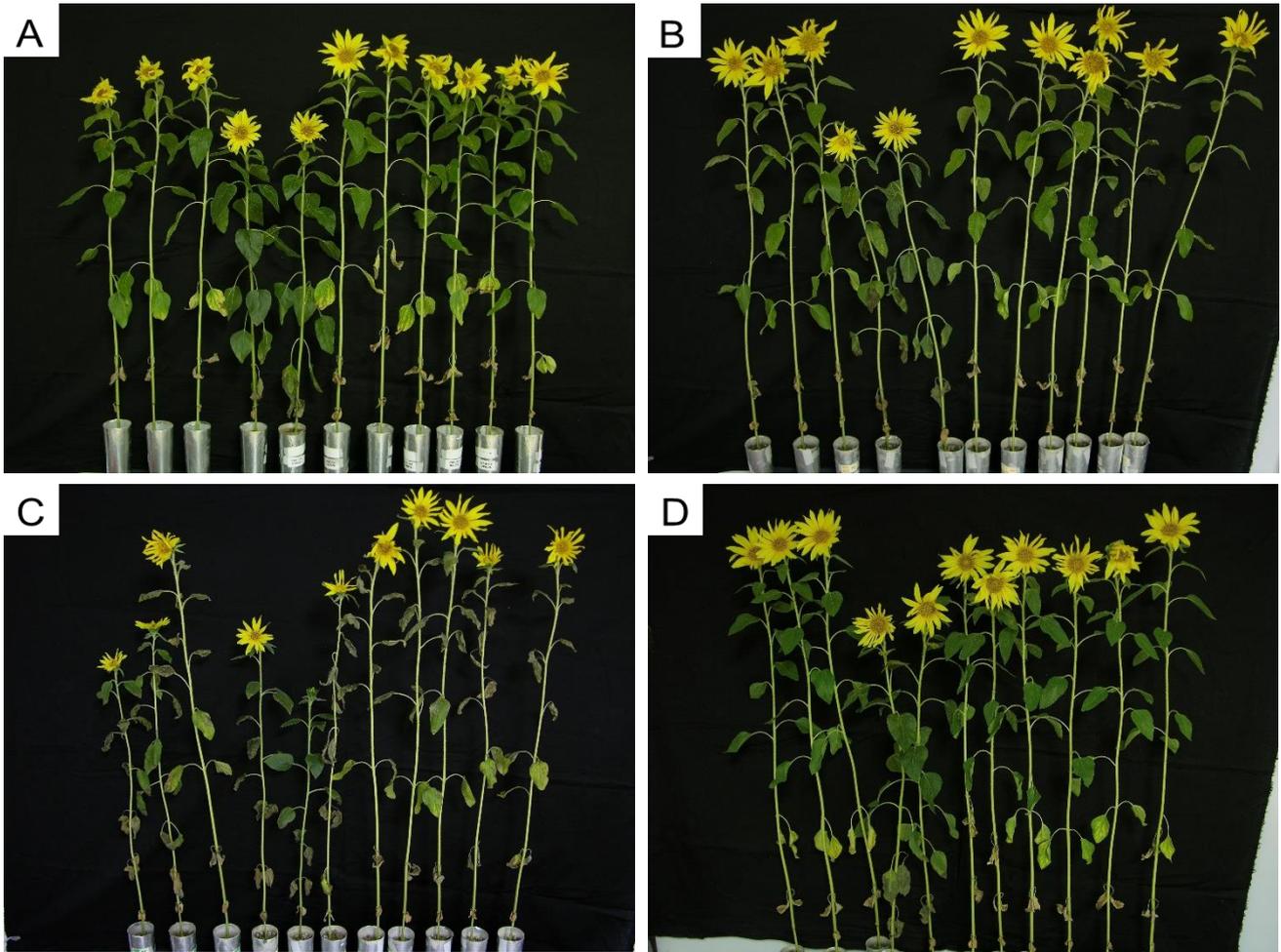
**Tabla A.8.6 Producción vegetal de girasol: índice de cosecha** (Rendimiento potencial Biomasa total<sup>-1</sup>). Media y error estándar para cada tratamiento y dosis de P, (n = 5) en cada suelo (RAB, TOM, SAN y ENC). ANOVA factorial (Tratamiento, dosis P). Las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias para los distintos tratamiento y dosis de P conforme al análisis post hoc LSD (p < 0,05).

	RAB	TOM	SAN	ENC
Tratamiento				
Control	0,38 ± 0,01 c	0,28 ± 0,01 b	0,14 ± 0,01	0,37 ± 0,01
S18	0,44 ± 0,02 ab	0,38 ± 0,01 a	0,23 ± 0,02	0,34 ± 0,02
HAS	0,31 ± 0,01 d	0,27 ± 0,01 b	0,21 ± 0,02	0,34 ± 0,02
ALP	0,46 ± 0,02 a	0,39 ± 0,02 a	0,27 ± 0,03	0,42 ± 0,01
RSU	0,42 ± 0,01 bc	0,39 ± 0,02 a	0,28 ± 0,02	0,35 ± 0,01
VER	0,45 ± 0,02 ab	0,42 ± 0,02 a	0,24 ± 0,01	0,42 ± 0,02
<i>p</i> valor (t)	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<0,0001 <sup>1</sup>	<0,0001
Dosis (mg P kg <sup>-1</sup> )				
25	0,40 ± 0,01	0,33 ± 0,01 b	0,20 ± 0,01	0,37 ± 0,01
50	0,42 ± 0,01	0,38 ± 0,02 a	0,26 ± 0,02	0,38 ± 0,01
<i>p</i> valor (d)	0,1521	<b>&lt;0,0001</b>	<0,0001 <sup>1</sup>	0,209
<i>p</i> valor (txd)	0,0636	0,134	<b>&lt;0,0001</b> <sup>1</sup>	<b>&lt;0,0001</b>

<sup>1</sup>P valor de datos transformados a la inversa. La ausencia de letras indica la existencia de una interacción entre los factores tratamiento y dosis. En el caso de no existir interacción (P valor txd > 0,05), la ausencia de letras indica la inexistencia de diferencias significativas entre las medias.



**Figura A.8.1** Plantas de girasol a los 40 DDS, según suelo: RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D). Tratamiento y dosis de P, de izquierda a derecha: C, S18-25, S18-50, HAS-25, HAS-50, ALP-15, ALP-50, RSU-25, RSU-50, VER-25 y VER-50.



**Figura A.8.2** Plantas de girasol a los 80 DDS, según suelo: RAB (A), TOM (B), SAN (C) y ENC (D). Tratamiento y dosis de P, de izquierda a derecha: C, S18-25, S18-50, HAS-25, HAS-50, ALP-15, ALP-50, RSU-25, RSU-50, VER-25 y VER-50.