



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Agronomía -Programa de Magister

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL COMPLEJO BIOCARBÓN-EXTRACTO
VEGETAL A NIVEL DE CAMPO PARA DISMINUIR LA NITRIFICACIÓN DE LOS**



Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas con
Mención en Suelos y Recursos Naturales

JHÓNATAN RENÉ REYES ESCOBAR
CHILLÁN-CHILE
2015

Profesor Guía: Maria Cristina Muñoz Vargas
Dpto. de Suelos y Recursos Naturales, Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Aprobada por:

Profesor Asistente, Cristina Muñoz V.
Ing. Agrónomo, Dr.

Guía

Profesor Titular, Erick Zagal
Ing. Agrónomo, MSc., PhD.

Asesor

Profesor Asociado, Marco Sandoval.
Ing. Agrónomo, MSc., Dr. Cs. Ambientales

Asesor

Profesor Asistente, Inés Figueroa Cares
Ing. Agrónomo, MSc., Dr. Cs. Horticultura

Directora Programa



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
CONCLUSIONES.....	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Página
Figura 1	Figura 1. Fotografías del BC mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido.....	15
Figura 2	Espectro FTIR del BC.....	16
Figura 3	Efecto de la adición de complejos BC-IBN sobre el IG de semillas de <i>Raphanus sativus</i> L. en dos dosis de aplicación (1 y 2 g de BC 100 g de suelo ⁻¹). Barras con la misma letra no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$).....	18
Figura 4	Efecto de la adición de complejos BC-IBN sobre la longitud radicular de plántulas de <i>Raphanus sativus</i> en dos dosis de aplicación (1 y 2 g de BC 100 g de suelo ⁻¹). Barras con la misma letra no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$).....	18
Figura 5	Dinámica general del N-inorgánico en el experimento en campo.....	19
Figura 6	Efecto de la adición de complejos BC-IBN y su contraparte de extracto crudo, sobre el proceso de nitrificación del suelo. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$).....	20
Figura 7	Evolución del contenido de nitrato en el suelo posterior a la aplicación de BioPino y Pino. Letras diferentes presentan diferencias significativas bajo el test de Duncan ($P \leq 0.05$).....	21
Figura 8	Evolución del contenido de nitrato en el suelo posterior a la aplicación de BioPeumo y Peumo. Letras diferentes presentan diferencias significativas bajo el test de Duncan ($P \leq 0.05$).....	21
Figura 9	Evolución del contenido de nitrato en el suelo posterior a la aplicación de BioEucalipto y Eucalipto. Letras diferentes presentan diferencias significativas bajo el test de Duncan ($P \leq 0.05$).....	22
Figura 10	Potencial de mineralización del nitrógeno en el suelo estudiado bajo condiciones controladas.....	23
Tabla 1	Caracterización química del BC.....	15

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL COMPLEJO BIOCARBÓN-EXTRACTO VEGETAL A NIVEL DE CAMPO PARA DISMINUIR LA NITRIFICACIÓN DE LOS SUELOS

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF BIOCHAR-PLANT EXTRACT COMPLEXES TO REDUCE SOIL NITRIFICATION IN FIELD EXPERIMENT

Palabras índice adicionales: nitrógeno, inhibidores de la nitrificación, biocarbón, extractos vegetales.

RESUMEN

En los sistemas de producción agrícola, uno de los problemas más grandes que enfrenta el productor es la pérdida de nitrógeno (N) por el dinámico ciclo de este elemento. En los últimos cincuenta años el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos a nivel mundial aumentó 10 veces, por consiguiente han aumentado las pérdidas de N por nitratos hacia aguas superficiales y profundas y formas gaseosas de N lo que igualmente constituye un factor de impacto ambiental derivado de la producción agrícola. En este contexto se busca evaluar el efecto de la formulación de inhibidores biológicos de la nitrificación (IBN) adsorbidos en una matriz de biocarbón (BC) para aumentar la eficiencia de uso del N reduciendo las tasas de nitrificación. Para ello se analizaron las características químicas y morfológicas del BC y se formuló el complejo BC-IBN con el uso de extractos vegetales obtenidos de pino (*Pinus radiata* D. Don), peumo (*Cryptocaria alba* Mol.) y eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill). Se realizó un ensayo de toxicidad sobre un cultivo sensible y un experimento a nivel de campo en un suelo Andisol, con aplicaciones de fertilizante junto con los tratamientos basados en extractos crudos y los complejos BC-IBN; durante tres meses se evaluó periódicamente la mineralización de N. El extracto de corteza de peumo adsorbido en BC presentó la mayor inhibición de la nitrificación (66%) a los 60 días después de su aplicación, comparado con el extracto crudo; indicando que el BC aumenta la vida útil de los IBN.

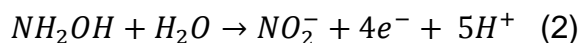
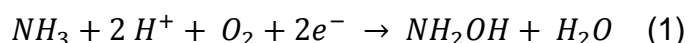
SUMMARY

One of the biggest problems farmers face in agricultural production systems is the loss of nitrogen (N) by the dynamic natural cycle of this element. The global use of nitrogen fertilizer has increased 10-fold in the last fifty years, resulting in increased N losses by nitrate leaching to surface water and groundwater, as well as N losses in gaseous forms; both constitute factors of environmental impact due to agricultural production. In this context, we evaluated the effect of the formulation of biological nitrification inhibitors (BNI) absorbed into a biochar (BC) matrix to increase nitrogen use efficiency by reducing nitrification rates. Chemical and morphological characteristics of BC were analyzed and a BC-BNI complex was formulated with the use of plant extracts from pine (*Pinus radiata* D. Don), peumo (*Cryptocaria alba* Mol.) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill). A toxicity assay was conducted on a sensitive crop and a field experiment was conducted in an Andisol soil, with fertilizer applications and treatments based on crude extracts and BC-BNI complexes. N mineralization was evaluated periodically during 3 months. The peumo bark extract absorbed in BC showed the highest inhibition of nitrification (66%) 60 days after application compared with the crude extract, indicating that BC increases the useful life of biological nitrification inhibitors.

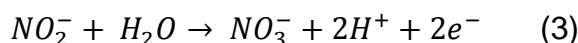
INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción agrícola, uno de los retos más grandes que enfrenta el productor es la pérdida de nitrógeno (N) por el manejo de la fertilización nitrogenada y el dinámico ciclo natural de este elemento, pues a lo largo del ciclo se presentan diferentes pérdidas disminuyendo la eficiencia del mismo, por otro lado se genera un problema de contaminación ambiental. Las adiciones de fertilizantes nitrogenados en los sistemas de producción agrícola representan la principal entrada de N reactivo al sistema; en la mayoría de los casos este elemento no está disponible para las plantas, para lo cual el N proveniente de fertilizantes sintéticos es transformado a amonio (NH_4^+) y luego a nitrato (NO_3^-) por medio de la oxidación biológica, proceso conocido como nitrificación (Stevenson y Cole, 1999). Este paso del ciclo natural del N se basa en el beneficio neto de dos etapas llevado a cabo por grupos de bacterias nitrificantes: las oxidantes del amoníaco y las oxidantes del nitrito, respectivamente.

Primera etapa: Bacterias quimioautótrofas aerobias nitrificantes como *Nitrosomonas* convierten el amonio en hidroxilamina (NH_2OH) mediante una reacción que es catalizada por la enzima amoniaco mono-oxigenasa (AMO) (ecuación 1). Posteriormente la hidroxilamina es convertida en nitrito (NO_2^-) mediante la enzima hidroxilamina oxido-reductasa (HAO) mediante la siguiente reacción (Paul, 2007):

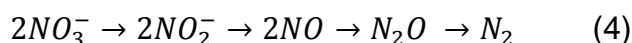


Segunda etapa: Bacterias presentes en el suelo, como *Nitrobacter* y *Nitrospira* (Freitag *et al.*, 2005) oxidan el nitrito hasta nitrato empleando la enzima nitrito óxido-reductasa (NOR) para catalizar la reacción (ecuación 3):



El nitrato formado a partir de los procesos anteriores es altamente susceptible a pérdidas por lixiviación, y la reducción a formas gaseosas por el proceso conocido como desnitrificación (ecuación 4); el cual constituye la mayor fuente de emisión de óxido nitroso (N_2O) a la atmósfera (Paul, 2007).

En la mayoría de los suelos, esto ocurre después de precipitaciones que saturan los poros del suelo y la difusión de oxígeno elemental (O_2) se reduce drásticamente, por lo que las bacterias desnitrificantes utilizan el nitrato en lugar de oxígeno como un aceptor de electrones durante la respiración; provocando su reducción (Paul, 2007).



Los procesos anteriores causan importantes problemas de contaminación ambiental, pues el uso desmedido de fertilizantes sintéticos que se originó a partir de la revolución verde está fuertemente ligado con la contaminación ambiental, básicamente por la alta emisión de gases efecto invernadero (GEI) por parte de los sistemas de producción agrícola. En los últimos 50 años, el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos a nivel mundial aumentó 10 veces, desde 10 Tg N año^{-1} ($1 \text{ Tg} = 10^{12} \text{ g}$) hasta aproximadamente $100 \text{ Tg N año}^{-1}$ (Robertson y Vitousek, 2009). La agricultura contribuye con alrededor del 30% del óxido nítrico (NO) y el 70% del óxido nitroso que es emitido a la atmósfera (Smith *et al.*, 1997; Hofstra y Bouwman, 2005). El óxido nitroso es un poderoso gas de efecto invernadero (GEI) con un potencial de calentamiento global 300 veces más fuerte que el dióxido de carbono (Kroeze, 1994; IPCC, 2007). Investigaciones recientes indican que cerca de 17 Tg N año^{-1} son emitidos a la atmósfera en forma de óxido nitroso (Galloway *et al.*, 2008; Schlesinger, 2009). Algunos estudios proyectan que para el año 2100 las emisiones de óxido nitroso aumentarán cuatro veces más comparadas con las actuales, debido al aumento en el uso de fertilizantes nitrogenados (Hofstra y Bouwman, 2005; Galloway *et al.*, 2008; Burney *et al.*, 2010; Kahrl *et al.*, 2010). Otro factor a considerar en la eficiencia del uso del N es la naturaleza iónica del nitrato, pues debido a su carga negativa es muy fácil que se pierda por lixiviación

en el perfil del suelo; en contraste, el amonio es adsorbido por parte de los coloides del suelo disminuyendo las pérdidas de N por lixiviación. Además, energéticamente se produce un ahorro en la planta al asimilar el N en forma de amonio (5 moles de ATP por molécula de amonio), mientras que para asimilar el N en forma de nitrato la planta necesita utilizar 20 moles de ATP por mol de nitrato (Salsac *et al.*, 1987). La mayoría de las plantas pueden usar el N como amonio o como nitrato (Salsac *et al.*, 1987; Boudsocq *et al.*, 2012).

Alrededor del mundo se han realizado muchos esfuerzos para plantear mecanismos que optimicen el uso del N en los suelos y dentro de las metodologías propuestas cabe mencionar el uso de inhibidores sintéticos de la nitrificación. Varios inhibidores sintéticos se han estudiado; sin embargo, solamente algunos como la nitrapirina, diciandiamida (DCD) y 3,4 – dimetil pirazol fosfato (DMPP); son los más utilizados (Weiske *et al.*, 2001; Zerulla *et al.*, 2001; Subbarao *et al.*, 2006a, 2012). Se ha cuestionado la utilización de algunos de ellos debido a que son nocivos para la actividad microbiana de los suelos y tienen un alto costo al consumidor. En el caso de la nitrapirina la cual ha sido utilizada en grandes áreas de producción de trigo en Norte América, su inestabilidad biológica ha sido un fuerte obstáculo para su uso en forma general (Sahrawat y Keeney, 1985; Subbarao *et al.*, 2012a).

Otra alternativa viable es la inhibición biológica de la nitrificación, la cual es definida por Subbarao *et al.* (2006) como la capacidad de suprimir el proceso de nitrificación en el suelo, mediante la liberación de exudados de raíces de plantas. Estudios recientes sobre mecanismos para aumentar la eficiencia del N en el suelo, demuestran que algunos compuestos fenólicos producidos por plantas que se desarrollan en ambientes limitados en N, pueden afectar el ciclo natural del elemento al inhibir la nitrificación. Lo anterior lleva a discutir sobre la optimización del uso del elemento en el sistema de producción agrícola mediante la inhibición de ciertos procesos de su ciclo natural.

En la actualidad existen varios estudios realizados en el área de inhibidores naturales de la nitrificación, los cuales han sido aislados mediante extractos de plantas. Medina (2011) estudió la acción inhibitoria de diferentes extractos de

plantas que se desarrollan en suelos Mediterráneos de Chile, así mismo evaluó diferentes dosis de aplicación de inhibidores biológicos de la nitrificación (IBN), encontrando que la dosis de 4 mg L⁻¹ mostró los mejores resultados, mientras que el extracto que presentó el mayor efecto inhibitorio fue el de corteza de *Eucalyptus globulus* Labill. Baeza (2012) evaluó el efecto inhibitorio de extractos de plantas del género *Cryptocarya alba* Mol. y *Pinus radiata* D. Don, incluyendo el efecto del inhibidor sintético Diciandiamida (DCD) sobre suelo Andisol y Alfisol; obteniendo que el uso del extracto acuoso de raíz de *C. alba* y el extracto etanólico de corteza de *P. radiata*, demostraron ser efectivos en la acumulación de amonio en el suelo Andisol, aumentando con ello la biomasa microbiana del suelo y consecuentemente las emisiones de CO₂, no ocurriendo lo mismo en el suelo Alfisol. Lo anterior lleva a discutir el efecto de las características del suelo y la especie cultivada sobre el efecto de los inhibidores naturales de la nitrificación. Suescún *et al.* (2012) reportó que el extracto acuoso de hoja de *Quillaja saponaria* Mol. y el extracto etanólico de *P. radiata*, son efectivos inhibiendo la mineralización del N; y Torres (2012) al estudiar las pérdidas de N desde un suelo Andisol mediante el uso de extractos vegetales, determinó que los extractos de corteza de *E. globulus* y hoja de *C. alba*, redujeron entre un 30% a 40% la formación de nitratos al ser comparado con el efecto inhibitorio de DCD.

La dificultad que se presenta al utilizar extractos vegetales como IBN, es que su efecto en el suelo es de corto plazo. Es así como Torres (2012) determinó que aplicaciones de extractos acuosos de hoja y corteza de *E. globulus*, y hoja de *C. alba* disminuyeron la tasa de producción de nitrato hasta 13 días en un suelo Andisol. Así, la búsqueda de nuevas alternativas para aumentar la eficiencia de los IBN puede ser una adecuada vía para disminuir las pérdidas de N tendiendo hacia sistemas agrícolas que minimicen su impacto en el medioambiente. Es así que Patra (2002) en un estudio a nivel de laboratorio, evaluó el efecto del recubrimiento de gránulos de urea con extractos de plantas medicinales y aromáticas, y un inhibidor de la nitrificación sintético (DCD) sobre la eficiencia del uso del N en plantas de menta japonesa (*Mentha arvensis* cv. 77) y encontró un aumento en la producción, en una comparación con plantas fertilizadas con urea

no recubierta, concluyendo que los recubrimientos de *Artemisia annua* y *Azadirachta indica* demostraron ser igual de efectivos que DCD. En la misma línea de investigación, Patra *et al.* (2006) en un estudio de incubación de suelos a nivel de laboratorio, evaluó el efecto del aceite de *Mentha spicata*, aceite demetholizado de *Mentha arvensis*, terpenos de *Mentha sp.* como materiales recubiertos y un inhibidor de la nitrificación para retardar la hidrólisis de la urea y la nitrificación en los suelos. Encontrando una disminución en la tasa de nitrificación, potenciando su efecto a medida que aumentó el nivel de cobertura del fertilizante.

Otro aspecto a resaltar es que los inhibidores naturales al compararse con los de origen químico, son menos persistentes, biodegradables, económicos y amigables con el ambiente (Patra *et al.*, 2002). Weisser (2014) determinó que el recubrimiento de urea con extractos vegetales liofilizados (siguiendo la metodología descrita por Patra *et al.*, 2002) no tuvo ningún efecto sobre la hidrólisis de la urea y la nitrificación, tanto a nivel de laboratorio como a nivel de campo, a pesar que los extractos vegetales generaron inhibición de ambos procesos al actuar en estado acuoso, por lo que la posibilidad de aplicar técnicas o nuevas formulaciones en estos compuestos debe ser evaluado dependiendo de la naturaleza del compuesto orgánico. En los esfuerzos por mejorar la acción de los extractos vegetales se reconocen diversas técnicas como lo son el mejoramiento genético, aislamiento de extractos biológicos, unión de los extractos biológicos con otros compuestos (Subbarao *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2014). Dentro de lo anterior cabe resaltar el potencial de desarrollo que presenta la utilización de biocarbón (BC), material con elevada capacidad para adsorber compuestos orgánicos. El BC ha sido definido por Lehmann (2009) como un producto de la descomposición térmica de materiales orgánicos bajo condiciones limitadas de oxígeno, normalmente a temperaturas < 700 °C. Aunque su utilización ha cobrado auge en las últimas décadas, el BC fue encontrado hace miles de años en la amazonia brasilera (Glaser, 2001). El BC tiene un amplio uso en la agricultura incluyendo secuestro de carbono (C) por representar una forma de C recalcitrante, aumento de la retención de N, incremento de la capacidad de retención de agua

del suelo, biorremediación de suelos y mitigación del cambio climático (Lehmann *et al.*, 2003; Lehmann *et al.*, 2006; Woolf *et al.*, 2010).

En la misma área de investigación Muñoz *et al.* (2014) evaluó el efecto de adsorber extractos biológicos con probado efecto inhibitorio sobre una matriz de BC bajo condiciones controladas; determinando que el efecto del BC aumenta la vida útil del extracto vegetal retardando la conversión de amonio a nitrato. Otro aspecto importante es que algunos extractos tuvieron efecto sobre la actividad de la ureasa, aumentando con lo anterior la eficiencia del uso del N en el suelo, por lo que la adsorción de los extractos en BC representa una importante ventaja del producto sobre la inhibición de la nitrificación. Según los antecedentes expuestos en la presente propuesta, algunos IBN representan una alternativa para controlar las pérdidas de N reactivo en ambientes agrícolas con la ventaja de no causar problemas ambientales al medio. Sin embargo, se degradan al corto plazo, es por ello que se pretende aumentar la vida útil de estos IBN, mediante la formulación de complejos de biocarbón con inhibidores biológicos de la nitrificación (BC-IBN) y su aplicación a nivel de campo.

HIPÓTESIS

La formulación de los IBN fijados en una matriz de BC, incrementa su efectividad respecto a los inhibidores naturales aplicados como extracto crudo sobre el suelo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el complejo BC-IBN es una alternativa viable, comparada con el uso de extractos vegetales crudos con probado efecto inhibitorio de la nitrificación, a nivel de campo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características morfológicas y químicas del BC.
- Determinar si existen riesgos de fitotoxicidad al aplicar el complejo BC-IBN.
- Evaluar la aplicación de extractos crudos respecto al complejo BC-IBN, sobre la nitrificación de los suelos a nivel de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en un suelo Andisol de la serie Arrayán en la estación experimental “El Nogal” (36° 34' S y 74° 06' O) en la provincia de Ñuble, en la Octava Región de Chile, la clasificación taxonómica corresponde a *thermic Humic Haploxerands*. El material parental son cenizas volcánicas modernas y la topografía es plana con pendientes simples en el rango de 0 a 1%, buen drenaje y pluviometría anual 1.000 a 1.500 mm (Stolpe, 2006).

Selección y obtención de extractos vegetales. El material vegetal fue seleccionado del área Mediterránea del centro sur de Chile (35° 58' S y 72° 17' W); incluyendo tres especies leñosas en estado fenológico vegetativo, las especies evaluadas fueron: pino (*Pinus radiata* D. Don), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) y peumo (*Criptocaria alba* Mol), obteniéndose muestras de corteza de cada especie. El material fue secado al aire, eliminándose material ajeno al tejido vegetal, siendo posteriormente molido mediante un molino eléctrico (Molinox, España), obteniendo una granulometría inferior a 2 mm. Los extractos de plantas usados para este estudio se encuentran caracterizados en trabajos previos realizados por: Baeza (2011), Medina (2011), Torres (2012) y Suescún *et al.* (2012), y fueron seleccionados por su contenido de fenoles totales, taninos condensados, alto grado de condensación de moléculas orgánicas y alta capacidad de formar complejos con proteínas. Los extractos vegetales se obtuvieron mediante la metodología de Murillo y Méndez (2007), donde se macera el material vegetal en agua en una relación 1:10 (vegetal: solvente), hirviéndolo durante 45 minutos y filtrándolo al vacío. Los extractos obtenidos se almacenaron a 4 °C en frasco cerrado a resguardo de la luz, por un período no superior a 2 semanas. La metodología para determinar los sólidos totales es la descrita por Domínguez (1973), donde un volumen conocido de muestra se seca en cápsulas de porcelana (previamente pesadas) y el peso seco de la muestra se divide por el volumen de muestra.

Obtención y pre-tratamiento del biocarbón. El BC se obtuvo a partir de trozos de corteza de pino (*Pinus radiata* D. Don) la cual fue triturada en molino (Thomas, España) a un tamaño de 2 mm, posteriormente se llevó a un pirolizador eléctrico a

escala piloto de la Universidad de la Frontera, Temuco, Chile, con capacidad máxima de proceso de 5 kg de materia prima, obteniendo 1 kg de material con 51,5% de humedad. Las condiciones de pirolisis fueron: 15 h con un flujo de N a $0,5 \text{ L min}^{-1}$, alcanzando una temperatura máxima de $550 \text{ }^\circ\text{C}$, con un tiempo de residencia de dos horas a la máxima temperatura (Muñoz *et al.*, 2014).

Para el pre-tratamiento del BC con el fin de eliminar impurezas en la matriz, se utilizó la metodología propuesta por Muñoz *et al.* (2014) por lo que se pesaron 10 g de BC y se agitaron con 50 mL de agua destilada durante 4 h, para luego filtrar y lavar con agua caliente durante 25 minutos, dejando secar en oscuridad.

Se realizó una activación de la superficie de contacto del BC, para potenciar la adsorción de compuestos fenólicos contenido en los extractos vegetales (Muñoz *et al.* 2014), para ello se utilizó sulfato de amonio, de acuerdo a metodología descrita por Hina *et al.* (2010). Donde, 500 mg de cada una de las tres muestras fueron mezcladas con sulfato de amonio (5 mg N L^{-1}) en una dosis equivalente a $11,5 \text{ mg}$ sólidos totales por gramo de BC. Las muestras fueron incubadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en un sistema Batch con agitación constante de 150 rpm por 5 horas.

Formulación del complejo biocarbón-extracto vegetal. Para adsorber los compuestos orgánicos contenido en los extractos vegetales sobre la matriz de BC, se utilizó la metodología indicada por Muñoz *et al.* (2014). Se pesaron 10 gramos de BC para cada tratamiento y se colocaron en frascos de vidrio con tapa. A cada frasco se le agregaron 400 mL de agua destilada, 18,9 gramos de solución de sulfato de amonio comercial (5 g N L^{-1}) y 230 mg de sólidos totales de cada extracto vegetal. Los frascos se colocaron en un agitador recíproco, durante 36 h, a 150 rpm, luego se filtraron al vacío en matraz Kitasato con embudo Büchner, usando papel filtro (Whatman N° 42). El producto resultante se secó a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ y en oscuridad por 36 horas. Se consideró un tratamiento control, el cuál consistió en BC activado sin extractos vegetales.

Caracterización del biocarbón

Caracterización física. Se analizó la estructura y porosidad del BC mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido en el Laboratorio de Microscopia

Electrónica de la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción. Se utilizó un equipo ETEC Autoscan (SEM).

Caracterización química. El BC se analizó por espectroscopia infra-roja con transformación de Fourier (FT-IR) en un equipo Bruker modelo Tensor 27, aplicando la técnica de formación de la pastilla con bromuro de potasio (KBr) (Celi *et al.*, 1997) para obtener espectros en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} . Las pastillas de KBr fueron preparadas mediante presión al vacío, mezclando 1 mg de BC y 250 mg de KBr (ambos secos a 60 °C por 36 h y finamente molidos en un mortero de ágata) a 10000 kg cm^{-2} de presión; se obtuvo una pastilla clara y transparente, y la evaluación se realizó por duplicado. Los espectros FT-IR fueron determinados a una resolución de 2 y 16 barridos por muestra. Adicionalmente, se realizó un análisis químico del BC mediante metodología de análisis foliar propuesto por Longeri (2000).

Prueba de toxicidad. Se realizó un experimento de toxicidad aguda para evaluar el efecto del BC y los complejos BC-IBN sobre la germinación en semillas de rabanito (*Raphanus sativus* L.). Las muestras de suelo fueron obtenidas de la estación experimental “El Nogal” a una profundidad de 10 cm, las dosis evaluadas fueron las mismas que se utilizaron en el experimento en campo (1 y 2 g de BC por 100 g de suelo) y se incluyó un testigo sin aplicación. Las muestras fueron incubadas en bolsas de polietileno por un periodo de 15 días, en cámara de crecimiento a temperatura de 25 ± 2 °C y 60-70% de humedad a capacidad de campo. Los ensayos de germinación se realizaron luego de la incubación y se hicieron extractos en relación de 1:10 (mezcla: solución) siguiendo la metodología de Sobrero y Ronco (2004). Para determinar el índice de germinación (IG) se utilizó la fórmula de Tiquia y Tam (2000), un desarrollo mínimo de raíz de 5 mm fue utilizado como criterio estándar de germinación de semillas (USEPA, 1982).

Evaluación de la mineralización de N a nivel de campo

Establecimiento del ensayo. Se estableció un ensayo en la Estación Experimental “El Nogal” de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción. Las parcelas tuvieron una dimensión de 0,3 m^2 donde todos los tratamientos recibieron una dosis de fertilizante equivalente a 100 U N ha^{-1} . La

aplicación de los extractos crudos y complejo de BC-IBN se realizó a dosis de 1 g de BC para 100 g de suelo, y de IBN en forma cruda en dosis equivalente a 0,23 mg de sólidos totales por gramo de suelo.

Diseño experimental. Se consideró un diseño experimental completamente al azar compuesto por 1 control con 6 tratamientos cada uno localizados en forma aleatoria con tres repeticiones.

BC = Control (suelo con BC sin extractos)
 BioPeumo = Complejo de BC con extracto de corteza de peumo
 Peumo = Extracto de corteza de peumo líquido
 BioPino = Complejo de BC con extracto de corteza de pino
 Pino = Extracto liofilizado de corteza de pino
 BioEucalipto = Complejo de BC con extracto de hoja de eucalipto
 Eucalipto = Extracto de hoja de eucalipto líquido

Disponibilidad de nitrógeno inorgánico. Se evaluó el contenido de N mineral disponible a las 24, 72, 120 h posterior a la fertilización y después se continuó monitoreando cada 7 días hasta cumplirse 90 días post fertilización. Para determinar el contenido de N mineral (N-NH_4^+ y N-NO_3^-), se utilizó el método basado en las determinaciones colorimétricas de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-). Se mezclaron 5 g de suelo seco con K_2SO_4 (2M) y se agitó en un agitador recíproco durante 60 minutos a 180 rpm y se filtró con papel filtro (Whatman N° 5). Se cuantificó el N-NH_4^+ mediante nesslerización, leyendo su absorbancia en espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Spectronic, modelo 336001) a 490 nm (Longeri *et al.*, 1979); y N-NO_3^- mediante nitración con ácido salicílico, leyendo su absorbancia en espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Spectronic, modelo 336001) a 410 nm (Robarge *et al.*, 1983). El contenido de NH_4^+ y NO_3^- se expresó en mg kg^{-1} (miligramos por kilogramos de suelo seco).

Registro de temperatura y humedad. Se utilizó un termómetro digital (Taylor 1441) y un medidor de humedad digital portátil (N1500 Novus). La humedad se expresó en términos de WFPS (%).

Análisis estadístico de los resultados. El análisis estadístico se realizó de acuerdo a un diseño completamente al azar, los resultados se analizaron mediante

la prueba de Shapiro-Wilks, para evaluar la normalidad. Luego de comprobarse los supuestos; los resultados se analizaron con estadística paramétrica y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Duncan, con un nivel de confianza 95% ($P \leq 0,05$). El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico InfoStat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

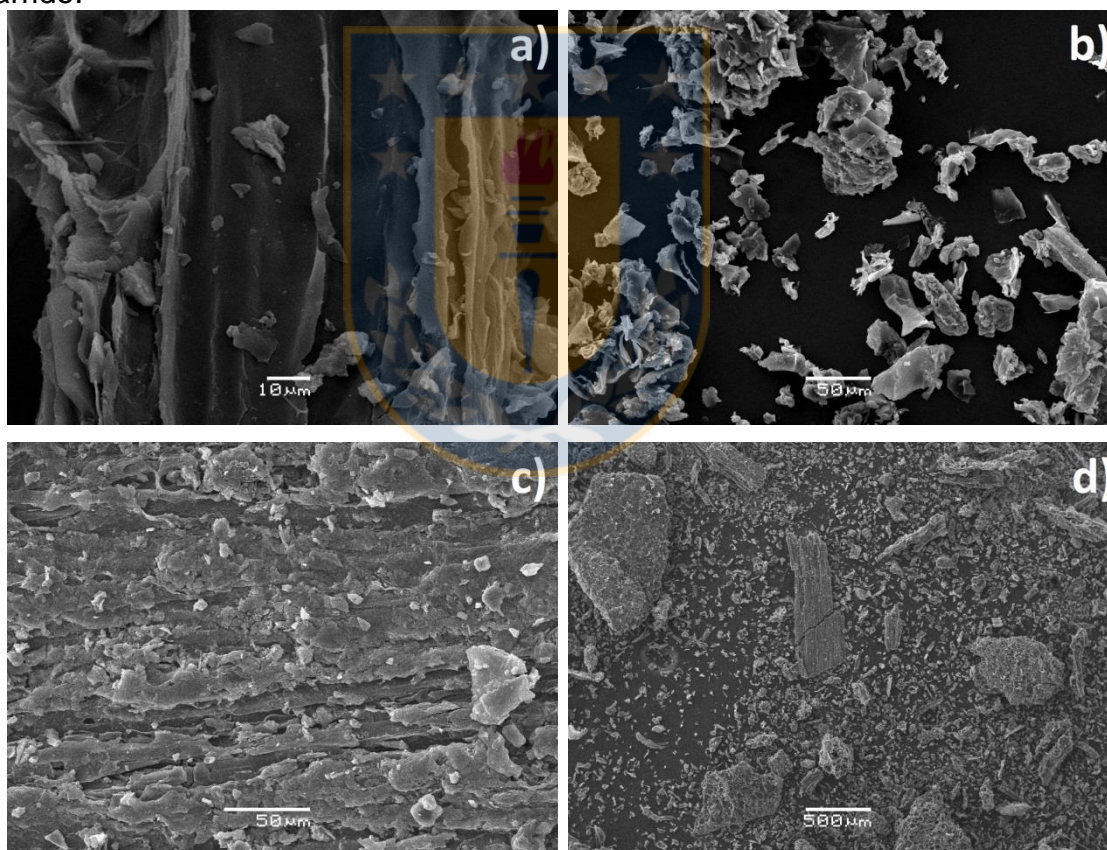
Caracterización química del biocarbón. El BC utilizado en el experimento fue proveniente de corteza de pino y carbonizado a una temperatura máxima de 500 °C, en la Tabla 1 se presenta la caracterización química del BC. A pesar que los valores de microelementos son altos, no presentan riesgo de fitotoxicidad pues no son solubles porque el BC es una forma altamente estable de C y puede permanecer en el suelo durante cientos o miles de años (Ascough *et al.* 2009; Gavin *et al.* 2003; Gouveia *et al.* 2002; Preston y Schmidt, 2006). Dado que no existe una normativa para la aplicación de BC en Chile, se utilizó el Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas, Decreto 4, Ministerio Secretaría General de la Presidencia; se determinó que los valores de cobre y cinc se encuentran dentro del margen permisible de aplicación.

Tabla 1. Caracterización química del BC.

Parámetro	Valor	Unidad
pH (1:2)	7,59	
Nitrógeno (N)	0,25	%
Carbono (C)	46,3	%
Fósforo (P)	0,05	%
Potasio (Ca)	0,35	%
Calcio (Ca)	0,82	%
Magnesio (Mg)	0,12	%
Azufre (S)	0,38	%
Hierro (Fe)	6400,00	mg kg ⁻¹
Manganeso (Mn)	200,00	mg kg ⁻¹
Cinc (Zn)	59,00	mg kg ⁻¹
Cobre (Cu)	10,50	mg kg ⁻¹
Boro (B)	17,80	mg kg ⁻¹

Microscopia electrónica de barrido. En la Figura 1 (a y c) se observan amplias cavidades en la estructura del BC, propiciando una eficaz matriz para la adsorción de moléculas, además en la Figura 1 (b y c) en escala a 50 μm se observan poros que brindan mayor área de superficie específica; resultados similares fueron encontrados por González *et al.* (2013) e Hina (2014). En la Figura 1 d se observa la textura rugosa de las partículas de BC lo cual otorga una mayor capacidad de adsorción; diversos estudios confirman la alta capacidad de adsorción del BC (Chun *et al.* 2004; Zhu *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011; Taghizadeh-Toosi, 2012; Zeng *et al.*, 2013).

Figura 2. Fotografías del BC mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido.

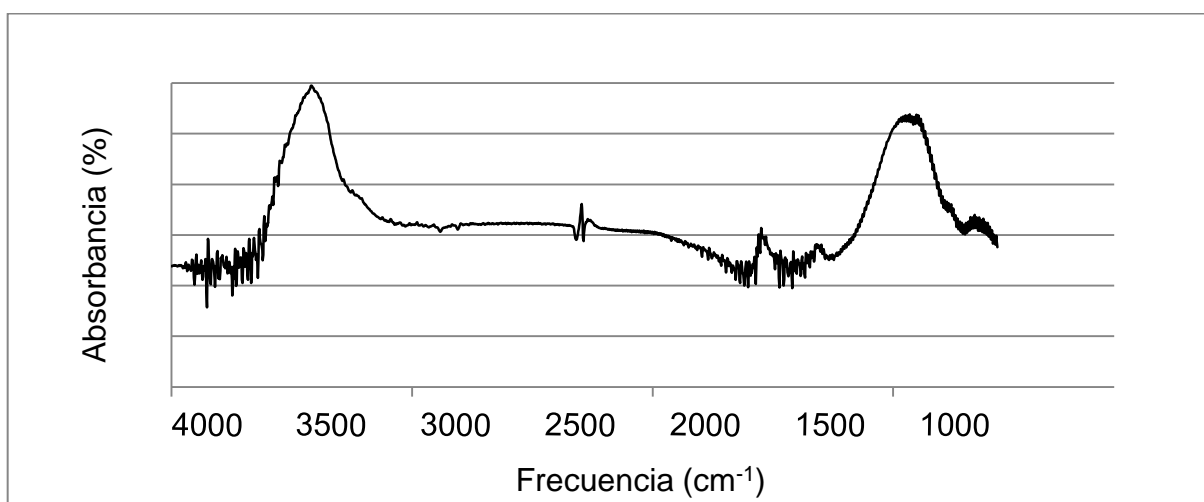


Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR). Se realizó un análisis (FTIR) con el objetivo de determinar los grupos funcionales presente en la estructura química del BC. El espectro de FTIR se presenta en la Figura 2, donde diferentes bandas en el espectro representan diferentes grupos funcionales, las

vibraciones encontradas en la región del 3700 cm^{-1} se deben a la predominancia de cadenas alifáticas, mientras que los picos de absorción en la región de los 1660 y 1630 cm^{-1} denotan la presencia de enlaces carbono-carbono consecuencia de anillos aromáticos; resultados similares fueron encontrados por Nishiyama *et al.* (1998); Graber *et al.* (2010) y González *et al.* (2013).

Las vibraciones típicas de compuestos aromáticos se encuentran en la región de los 1600 y 1510 cm^{-1} proveniente de la lignina de la corteza de pino. Nishiyama (1998) señala que la condensación de anillos aromáticos es debida a la desoxigenación ocurrida al carbonizar la muestra a 500 °C ; los picos de absorción en la región 1740 cm^{-1} indican la presencia de anillos aromáticos con grupos carbonilo y carboxilo, y son debido a la carbonización de la hemicelulosa presente en la madera utilizada como materia prima para BC. Los resultados revelan una estructura firme con cadenas cíclicas de carbono que aportan estabilidad al compuesto, la matriz de BC es estable en términos de carbono y reactivo en términos de carga por las cadenas alifáticas que permiten la adsorción de moléculas. El BC obtenido resulta en una estructura química con predominancia de compuestos aromáticos que confiere resistencia a la degradación biológica (Baldock y Smernick, 2002) determinando que las características físicas y órgano químicas de la estructura del BC son la principal razón de la alta estabilidad del BC (Schmidt y Noack, 2000; Lehmann, 2009).

Figura 2. Espectro FTIR del BC



El BC utilizado en este experimento es una matriz de C altamente estable con alto grado de porosidad, características que indican alta capacidad de adsorción de moléculas y estabilidad del complejo.

Pruebas de germinación

Los resultados del índice de germinación (IG) (Figura 3) indican que no existe diferencia significativa ($P > 0,05$) en la aplicación de complejos BC-IBN sobre la germinación de semillas de *Raphanus sativus* L. El IG en todos los casos fue mayor al 50%, el cual fue utilizado como límite inferior tóxico en bioensayos (Emino y Warman, 2004). Los resultados indican que no hubo efecto de fitotoxicidad en ningún tratamiento evaluado; resultados similares encontró Escalante (2013) al evaluar el efecto de la adición de BC derivado de rastrojos de maíz, en un suelo franco arenoso en dosis de 0, 5, 10, 15 y 20 ton ha⁻¹, quien tampoco encontró efectos negativos del BC sobre la germinación en semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.).

En relación a la Figura 4, los resultados obtenidos indican que no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos evaluados, lo que demuestra que no hubo efecto negativo por parte de los complejos BC-IBN, sobre la longitud de radícula en plántulas de rabanito (*Raphanus sativus*). Estos resultados difieren de los encontrados por Rogovska *et al.* (2012) quienes evaluaron el efecto de BC producidos con base en diferentes materias primas, procesos termoquímicos y temperaturas, sobre el porcentaje de germinación de semillas y longitud radicular de maíz (*Zea mays* L.); con relación al IG no encontraron diferencias significativas, mientras que al evaluar el efecto del BC sobre la longitud radicular, encontraron que tres BC producidos a altas temperaturas inhibieron significativamente el crecimiento radicular (16% en comparación al testigo), atribuyendo esto a un efecto negativo de hidrocarburos aromáticos policíclicos presente en los tratamientos que causaron la inhibición del crecimiento radicular. Nuestros resultados demuestran que no hubo fitotoxicidad en la germinación de semillas para las dosis evaluadas, lo que podría asegurar que no hay sustancias tóxicas en los tratamientos; resultados similares fueron

reportados por Escalante (2003) utilizando BC procedente de rastrojos de maíz y aplicándolos sobre semilla de *L. sativa*.

Figura 3. Efecto de la adición de complejos BC-IBN sobre el IG de semillas de *Raphanus sativus* L. en dos dosis de aplicación (1 y 2 g de BC 100 g de suelo⁻¹). Barras con la misma letra no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$).

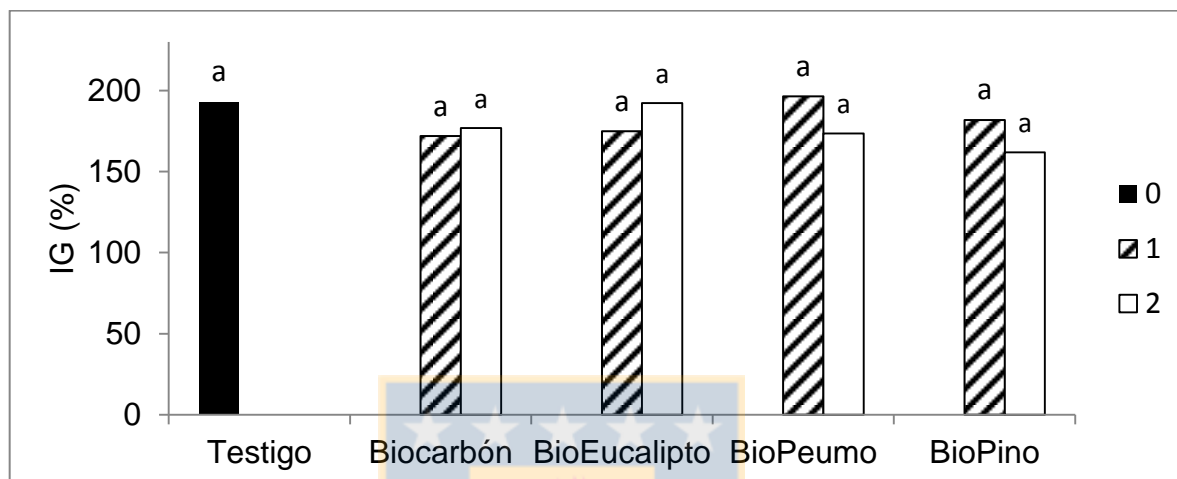
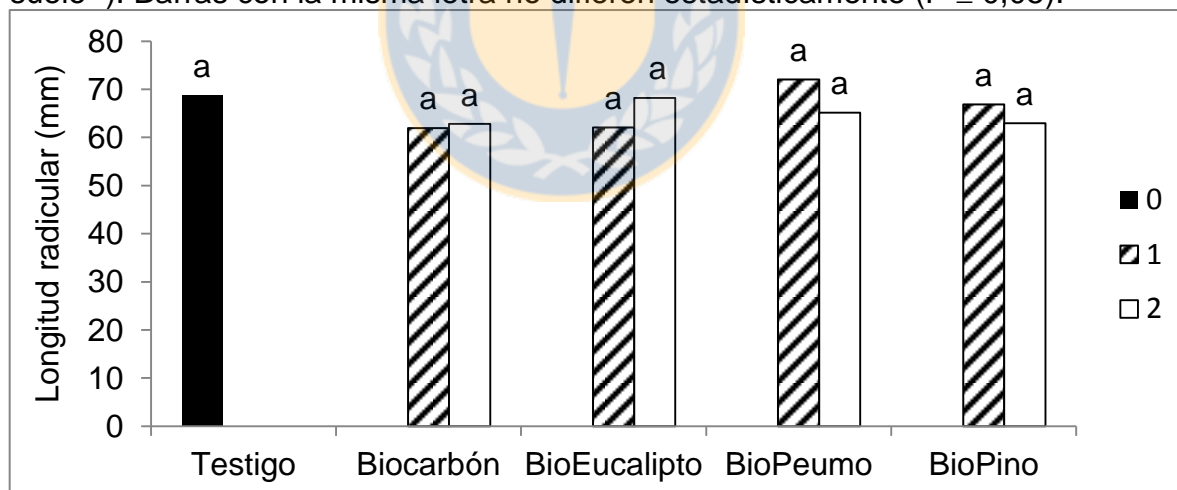


Figura 4. Efecto de la adición de complejos BC-IBN sobre la longitud radicular de plántulas de *Raphanus sativus* en dos dosis de aplicación (1 y 2 g de BC 100 g de suelo⁻¹). Barras con la misma letra no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$).

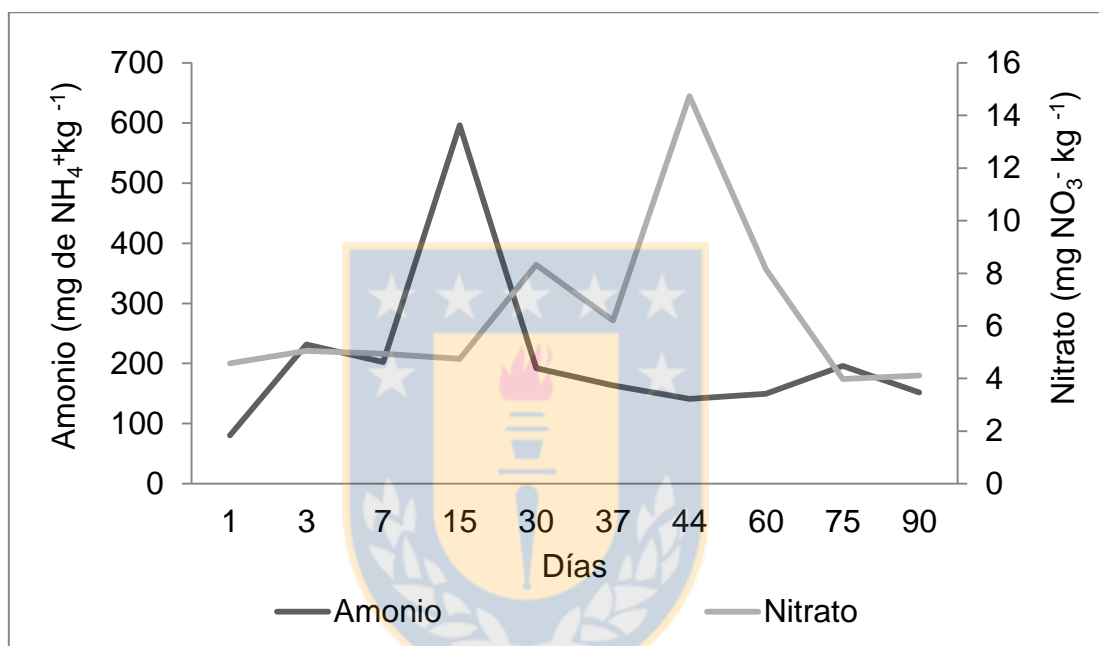


Diversos estudios han demostrado el impacto que tienen los compuestos fenólicos producidos por plantas, sobre la germinación de semillas (Muscolo *et al.*, 2001; Reigosa *et al.*, 1999; Tejeda-Sartorius, 2008). En nuestro experimento se comprobó que la dosis de 1 g de BioPeumo por 100 g de suelo mejoró la longitud radicular de plántulas de rabanito; sin embargo las diferencias no fueron

significativas ($P > 0,05$); la estimulación de la germinación de semillas por adiciones de BC a los suelos, fue comprobada en plantas forestales por Choi *et al.* (2005) y Tian *et al.* (2007).

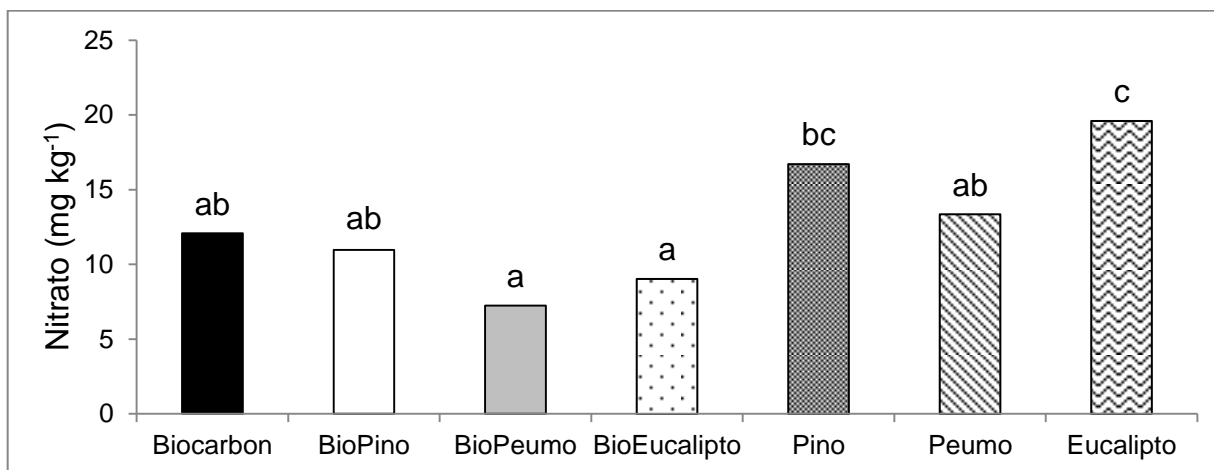
Dinámica de transformación de N en un suelo con aplicaciones de complejo BC-IBN

Figura 3. Dinámica general del N-inorgánico en el experimento en campo.



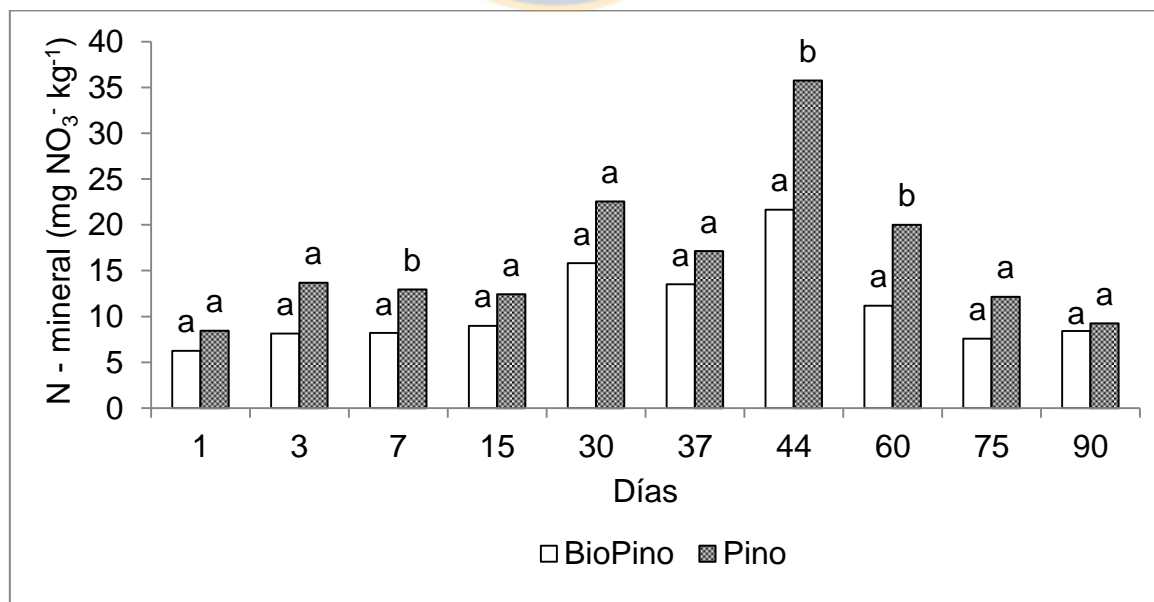
En la Figura 5 se observa el comportamiento general del N inorgánico en todos los tratamientos en función del tiempo mientras que la Figura 6 muestra el N acumulado durante los 90 días de duración del experimento, en cada uno de los tratamientos sobre la nitrificación ($\text{mg NO}_3^- \text{kg}^{-1}$). Se observa un notorio efecto de los complejos de BC-IBN, los cuales presentaron los niveles más bajos de nitrato, siendo el complejo BioPeumo y BioEucalipto los que mostraron los menores niveles de nitrato; sin embargo, no se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la aplicación de los complejos BC-IBN y el control, aunque BioEucalipto es diferente respecto de Eucalipto ($P \leq 0.05$).

Figura 4. Efecto de la adición de complejos BC-IBN y su contraparte de extracto crudo, sobre el proceso de nitrificación del suelo. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$).



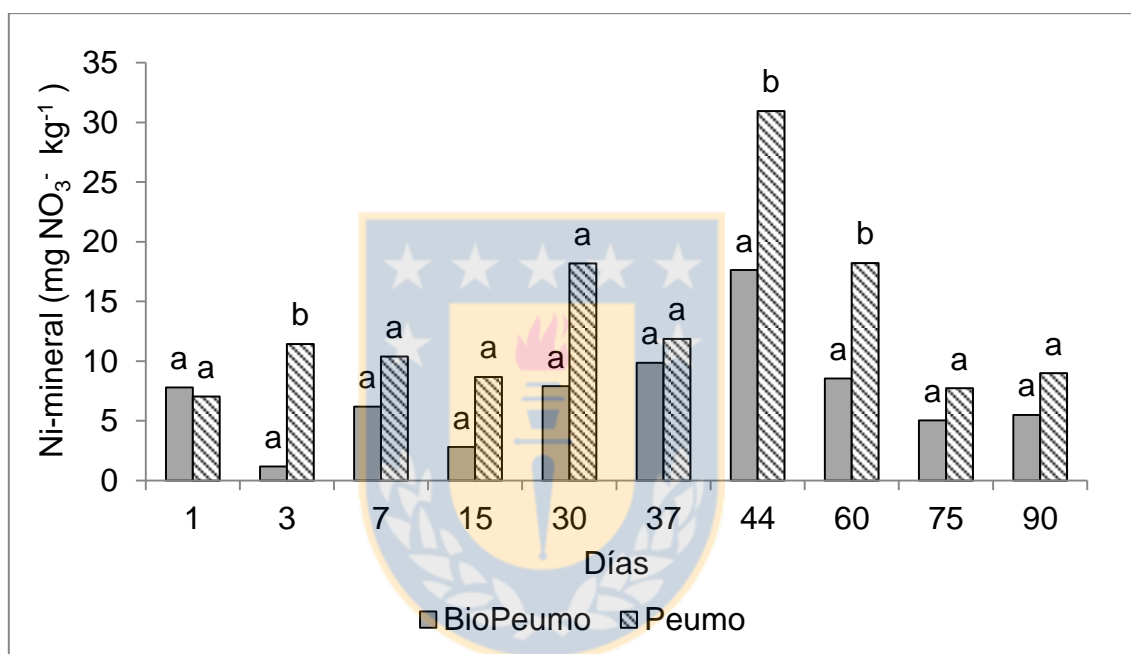
Al comparar el efecto del complejo BC-IBN, contra el IBN aplicado en forma cruda, para el caso del Pino, se encontró que el complejo BioPino tuvo mejores resultados al inhibir la nitrificación un 59% más que el extracto crudo de Pino, además se encontró que el BioPino presentó mejores resultados incluso 60 días después de la aplicación de los tratamientos (Figura 7).

Figura 5. Evolución del contenido de nitrato en el suelo posterior a la aplicación de BioPino y Pino. Letras diferentes presentan diferencias significativas bajo el test de Duncan ($P \leq 0.05$)



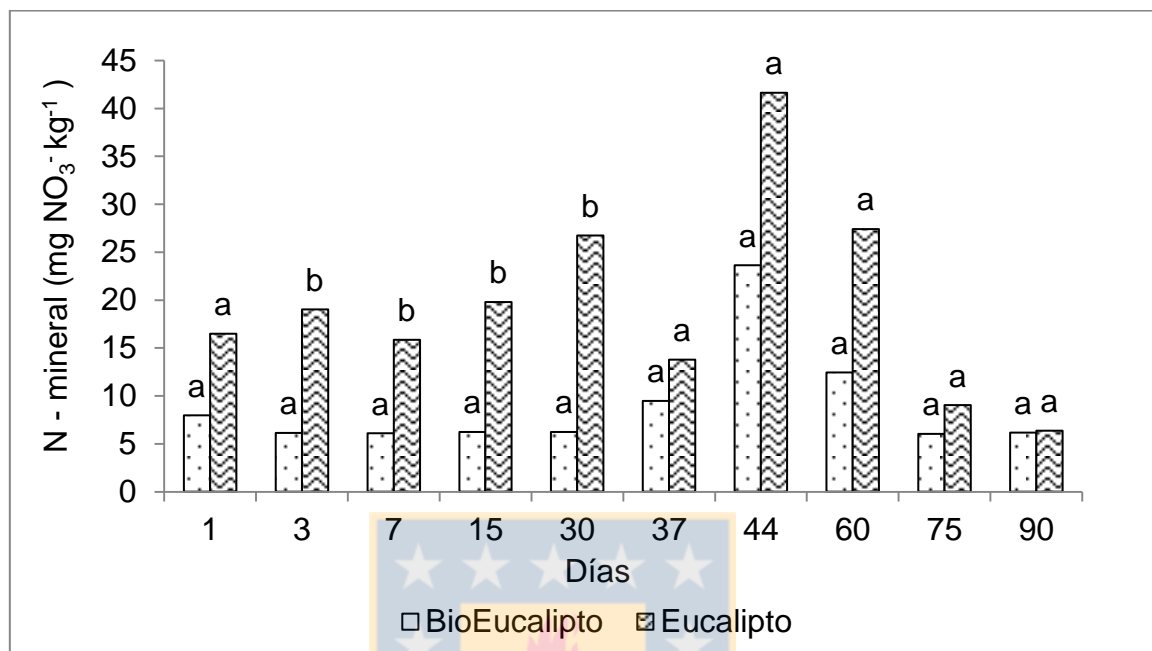
En la Figura 8 se muestra el efecto del BioPeumo frente a Peumo, donde el complejo presentó mejores efectos sobre la inhibición de la nitrificación, en este caso el porcentaje de inhibición de la nitrificación del complejo contra el extracto crudo fue de 66%, además el complejo BioPeumo tuvo efectos sobre la nitrificación incluso 60 días después de la aplicación al suelo de los tratamientos.

Figura 8. Evolución del contenido de nitrato en el suelo posterior a la aplicación de BioPeumo y Peumo. Letras diferentes presentan diferencias significativas bajo el test de Duncan ($P \leq 0.05$)



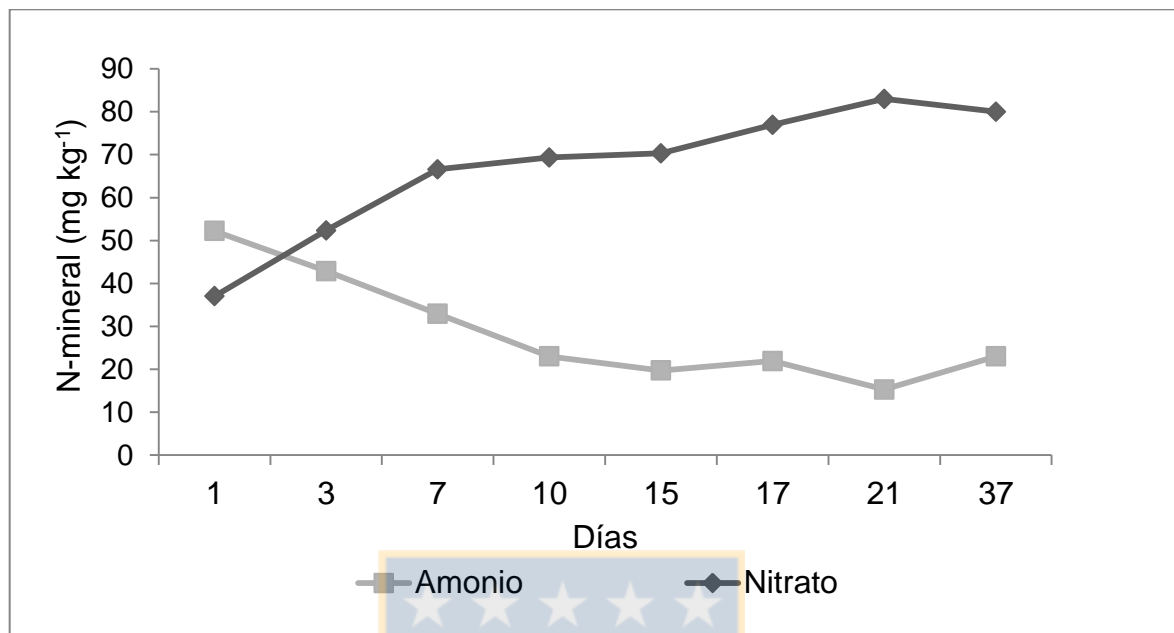
Similares resultados fueron encontrados al comparar el efecto del BioEucalipto frente al Eucalipto, los niveles de nitrato fueron más bajos en los tratamientos a los que se les aplicó el complejo BioEucalipto. Además el complejo BC-IBN inhibió un 68% más la nitrificación que el extracto crudo de Eucalipto, en la Figura 9 se observa que el complejo BioEucalipto tuvo efectos significativos ($P \leq 0.05$) de manera consistente desde el tercer día y hasta 30 días después de la aplicación de los tratamientos.

Figura 6. Evolución del contenido de nitrato en el suelo posterior a la aplicación de BioEucalipto y Eucalipto. Letras diferentes presentan diferencias significativas bajo el test de Duncan ($P \leq 0.05$)



En la Figura 10 se observa una gráfica del potencial de mineralización de N del mismo suelo sin aplicación de extractos vegetales ni BC, cabe mencionar que la prueba del potencial de mineralización de N se realizó en laboratorio y bajo condiciones controladas a temperatura de 22 °C y 60% de humedad de espacio poroso (WFPS) por lo que se infiere que en campo los resultados no serían exactamente iguales, sin embargo se concluye que el suelo tiene un elevado potencial de mineralización de N.

Figura 7. Potencial de mineralización del nitrógeno en el suelo estudiado bajo condiciones controladas.



Al comparar el potencial de nitrificación del suelo con el contenido de nitrato encontrado en las Figura 6 se comprueba el efecto inhibitorio de los extractos vegetales. Diversos estudios realizados por Muñoz *et al.* (2014), Weisser (2014), Suescún *et al.* (2012) Medina (2011), también comprobaron dicho efecto. El efecto de inhibición de la nitrificación es atribuido a los metabolitos secundarios contenidos en los extractos acuosos de las cortezas de Pino, Peumo y Eucalipto. Los taninos representan uno de los mayores grupos de metabolitos secundarios que son sintetizados por las plantas, estos compuestos han demostrado influenciar el ciclo del N en el suelo (Schmidt *et al.*, 2013; Smolander, *et al.*, 2012), pudiendo alterar la cantidad de N inorgánico y microorganismos del suelo (Hättenschwiler y Vitousek, 2000; Kraus *et al.*, 2003).

Weisser (2014) al caracterizar los extractos de corteza de peumo y eucalipto encontró que ambos extractos contenían proantocianidinas que son moléculas formadas por la unión de catequina, conteniendo la catequina en sus extremos anillos de seis carbonos unidos a dos grupos hidroxilo en la posición *para* y *ortho*, respectivamente; estas características moleculares le confieren un alto efecto inhibitorio de la nitrificación según lo comprobado por Zhang *et al.* (2010). Weisser

(2014) en el mismo estudio también determinó que el extracto de corteza de peumo presentó el mayor efecto de inhibición de la nitrificación, atribuyéndole un efecto inhibitorio sobre la población de bacterias nitrificantes del amonio. Los resultados anteriores coinciden con los encontrados en el presente estudio pues el tratamiento que produjo la mayor inhibición de la nitrificación fue BioPeumo; y al comparar solamente el efecto de los extractos crudos, Peumo fue el que inhibió en mayor grado el proceso de nitrificación del suelo. Otro mecanismo de inhibición puede ser el bloqueo de las vías amonio monooxigenasa e hidroxilamina oxidoreductasa (Subbarao *et al.*, 2006b), lo que explica la inhibición de la nitrificación en todos los tratamientos a excepción del BC.

Al analizar los resultados obtenidos en todas las evaluaciones, fue mayor el efecto de BC-IBN frente a los extractos crudos sobre la inhibición de la nitrificación; lo anterior demuestra un claro efecto del BC sobre la vida útil del extracto vegetal. Se infiere que las proantocianidinas encontradas en los extractos de Pino, Peumo y Eucalipto (Weisser, 2014) son adsorbidas por la superficie activada del BC. A este respecto, revisión bibliográfica con base en las características de pirolisis y el material original sugieren que el área superficial del BC en este estudio se encuentra en el rango entre 400 a 2300 m² g⁻¹ (Williams y Reed, 2006; Downie *et al.*, 2009; Major *et al.*, 2009) lo que indica una alta capacidad de adsorción. Lo anterior sugiere que el grupo hidroxilo de la catequina se une a la superficie del BC, funcionando así la matriz de BC como un medio de soporte y protección, adsorbiendo una alta concentración de taninos que progresivamente serán liberados al suelo inhibiendo la nitrificación, lo que prolonga el efecto de los metabolitos secundarios; lo anterior explica porqué los extractos vegetales de Pino, Peumo y Eucalipto siguieron funcionando hasta 30 y 60 días después de la aplicación.

El mecanismo por el que los IBN se preservan en el tiempo incluye una protección física por el que los compuestos se introducen en los nanoporos u otras estructuras de oclusión y la protección que brinda la adsorción, ambos mecanismos protegen los taninos del ataque enzimático y aumentan su vida útil en el suelo. Determinándose que las dos características fundamentales del BC

que contribuyen potencialmente a su capacidad de adsorber y estabilizar los taninos, son su estructura de poros bien desarrollada y su química superficial altamente adsorbente (Kasozi *et al.*, 2010).

Resultados similares fueron encontrados por Kasozi *et al.* (2010) en un estudio de adsorción de catecol y ácidos húmicos en matrices de BC proveniente de diferentes materiales vegetales y pirolizado a 250, 400 y 650° C. Estos autores concluyeron que el BC proveniente de corteza de pino y pirolizado a 650° C adsorbió mayor cantidad de fenoles; lo que coincide en parte con el material vegetal usado en este experimento y la temperatura de pirolisis.

El BC solo, también ha demostrado alterar el ciclo del N (Singh *et al.*, 2000; Clough y Condon, 2010) pues se considera que grupos funcionales de carácter ácido ubicados en la superficie activa del BC forman enlaces débiles con el NH₃ que proviene de la hidrólisis de la urea, lo que altera el ciclo del N y retrasa la formación de NH₄⁺ y posteriormente NO₃⁻ (Asada *et al.*, 2006; Kastner *et al.*, 2009; Clough y Condon, 2010; Taghizadeh-Toosi *et al.*, 2012; Márquez-Montesino *et al.*, 2013); lo anterior explica porqué se retrasó el proceso de nitrificación comparado con el potencial de nitrificación del suelo (Figura 10) y la razón por la que el BC presentó mayor efecto de inhibición de nitrificación comparado con la aplicación de extractos crudos (Figura 6).

CONCLUSIONES

El BC es una matriz de carbono altamente estable formada en su mayoría por anillos aromáticos, características que confieren estabilidad al complejo y alta capacidad de adsorción de moléculas.

El BC en las dosis aplicadas no presenta toxicidad al no inhibir la germinación de semillas de rabanito (*Raphanus sativus* L.) y el desarrollo de la raíz.

El BC funciona como un medio de soporte y protección a los componentes orgánicos de los inhibidores biológicos de la nitrificación, lo que prolonga el efecto de los compuestos hasta 30 y 60 días después de la aplicación a nivel de campo; destacando el complejo BioPeumo al presentar hasta un 66% de inhibición de la nitrificación respecto el extracto crudo de corteza de Peumo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asada, T., T. Ohkubo, K. Kawata and K. Oikawa. 2006. Ammonia adsorption on bamboo charcoal with acid treatment. *J. Health Sci.* 52:585-589.
2. Ascough P.L., M.I. Bird, F. Brock, T.F.G. Higham, W. Meredith, C.E. Snape and C.H. Vane. 2009. Hydrolysis as a new tool for radiocarbon pre-treatment and the quantification of black carbon. *Quat Geochronol* 4:140-147.
3. Baeza, C. 2011. Estudio del efecto de inhibidores de la nitrificación sobre emisiones de gases de efecto invernadero y actividad biológica en suelos agrícolas. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
4. Baldock, J.A. and R.J. Smernik. 2002. Chemical composition and bioavailability of thermally altered *Pinus resinosa* (Red Pine) wood. *Org. Geochem.* 33:1093-1109.
5. Boudsocq, S., A. Niboyet and J.C. Lata. 2012. Plant preference for ammonium versus nitrate: A neglected determinant of ecosystem functioning? *Am. Nat.* 180:60-69.
6. Burney J.A., S.J. Davis and D.B. Lobell. 2010. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. *PNAS.* 107: 12052-12057.
7. Chen, X., G. Chen, L. Chen, Y. Chen, J. Lehmann, M. McBride and A. Hay. 2011. Adsorption of copper and zinc by biochars produced from pyrolysis of hardwood and corn straw in aqueous solution. *Bioresource Technol.* 102: 8877-8884.
8. Choi, D., K. Makoto, A.M. Quoreshi and Y. Qu. 2009. Seed germination and seedling physiology of *Larix kaempferi* and *Pinus densiflora* in seedbeds with charcoal and elevated CO₂. *Landsc. Ecol. Eng.* 5:107-113.
9. Chun, Y., G.Y. Sheng, C.T. Chiou and B.S. Xing. 2004. Compositions and sorptive properties of crop residue-derived chars. *Environ. Sci. Technol.* 38:4649-4655.
10. Clough T.J. and L.M. Condon. 2010. Biochar and the nitrogen cycle. *J. Environ. Qual.* 39:1218-1223.
11. Downie, A., A. Crosky and P. Munroe. 2009. Physical properties of biochar. pp. 13-32. In J. Lehmann and S. Joseph (Eds.) *Biochar for environmental management: Science and technology.* Earthscan, London, England.

12. Domínguez, X. 1973. Métodos de investigación fotoquímica. Editorial Limusa, México D. F. México.
13. Emino, E. and P. Warman. 2004. Biological assay for compost quality. *Compost Sci. Util.* 12(4):342-348.
14. Escalante, M. A. 2013. Biocarbones, caracterización y efecto en la biomasa y nutrición de N, P y K en una gramínea. Tesis, título Doctorado en Ciencias especialista en Edafología. Colegio de Posgraduados. Texcoco, México.
15. Freitag, T.E., L. Chang, C.D. Clegg and J. Prosser. 2005. Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12):8323-8334.
16. Galloway, J.N., A.R. Townsend and J.W. Erisman. 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions and potential solutions. *Science* 320: 889-892.
17. Gavin, D.G., L.B. Brubaker and K.P. Lertzman. 2003. Holocene fire history of a coastal temperate rainforest based on soil charcoal radiocarbon dates. *Ecology* 84:186-201.
18. Glaser, E., L. Haumaier, G. Guggenberger and W. Zech. 2001. The "*Terra Preta*" phenomenon: A model sustainable agriculture in the humid tropics. *Naturwissenschaften* 88:37-41.
19. González, M. A., M. Cea, N. Sangaletti, A. González, C. Toro, M.C. Diez, N. Moeno, X. Querol and R. Navia. 2012. Biochar derived from agricultural and forestry residual biomass: Characterization and Potential Application for Enzymes Immobilization. *JBMB.* 6(3): 1-12.
20. Gouveia, S.E., L.C.R. Pessenda, R. Aravena, R. Boule, R. Scheel- Ybert, J.A. Bendassol, A.S. Ribero, and H.A. Freitas. 2002. Carbon isotopes in charcoal and soils in studies of paleovegetation and climate changes during the late Pleistocene and the Holocene in the southeast and centerwest regions of Brazil. *Global Planet Change.* 33:95-106.
21. Graber, E., Y. Harel, M. Kolton, E. Cytryn, A. Silber, D. David. L. Tsechansky, M. Borenshtein and Y. Elad. 2010. Biochar impact of development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. *Plant Soil.* 337:481-496.

22. Hättenschwiler, S., and P.M. Vitousek. 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends Ecol. Evol.* 15:238-243.
23. Hina, K., P. Bishop, M. Camps, R. Calvelo-Pereira, J. Maciá-Agulló, J. Hindmarsh, J. Hanly, F. Macías and M. Hedley. 2010. Producing biochars with enhanced surface activity through alkaline pre-treatment of feedstocks. *Soil Res.* 48(7):606-617.
24. Hina, K. 2014. Comparison of Pine Bark, Biochar and Zeolite as Sorbents for $\text{NH}_4^+\text{-N}$ Removal from Water. *CLEAN.* 42 (9999):1-6.
25. Hofstra N. and A.F. Bouwman. 2005. Denitrification in agricultural soils: summarizing published data and estimating global annual rates. *Nutr. Cyc. Agroecosys.* 72: 267-278.
26. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2007. *Climate change: the physical science basis – summary for policy makers.* Paris: World Meteorological Organization/United Nations Environmental Program.
27. Kahrl E., Y. Li, Y. Su, T. Tenngkeit, A. Walkes and J. Xu. 2010. Greenhouse gas emissions from nitrogen use in China. *Environ. Sci. Policy* 13: 688-694.
28. Kasozi, G.N., A.R. Zimmerman, Nkedi-Kizza and G. Bing. 2010. Catechol and Humic Acid Sorption onto a Range of Laboratory-Produced Black Carbons (Biochars). *Environ. Sci. Technol.* 44:6189-6195.
29. Kastner J.R., J. Miller and K.C. Das. 2009. Pyrolysis conditions and ozone oxidation effects on ammonia adsorption in biomass generated chars. *J. Hazard Mater.* 164:1420-1427.
30. Kraus, T.E.C., R.A. Dahlgren and R.J.Z. Zasoski. 2003. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems. *Plant Soil.* 256: 41-66.
31. Kroeze, C. 1994. Nitrous oxide and global warming. *Sci. Total Environ.* 143:193-209.
32. Lata, J.C., V. Degrange, X. Raynaud, P.A. Maron, R. Lens and L. Abbadie. 2004. Grass populations control nitrification in savanna soils. *Functional Ecology* 18:605-611.
33. Lehmann, J. and S. Joseph. 2009. *Biochar for Environmental Management.* Earthscan. England.

34. Lehmann, J., Jr. Da Silva, C. Steiner, T. Nehls, W. Zech and B. Glaser. 2003. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: Fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant Soil*. 249:343-357.
35. Lehmann, J., J. Gaunt and M. Rondon. 2006. Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems – a review. *Mitig. adapt. strategies glob. chang.* 11:403-427. DOI: 10.1007/s11027-005-9006-5
36. Longeri, L. 2000. Análisis de tejido vegetal. Departamento de suelos. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción, Chile.
37. Major, J., C. Steiner, A. Downie and J. Lehmann. 2009. Biochar effects on nutrient leaching. pp. 271-287. In J. Lehmann and S. Joseph (Eds.) *Biochar for environmental management: Science and technology*. Earthscan, London, England.
38. Marquez-Montecino, F. Zanzi-Vigouroux, R. Birbas, D. Aguiar-Trujillo L. Ramos-and B. Robaina. 2013. Carbón activado de semillas de tomate para adsorción de vapores de amoniaco, benceno y gasolina. *Ingeniería mecánica* ISSN 1815-5944.
39. Medina N. 2011. Inhibición de los procesos biológicos precursores de las emisiones de óxido nitroso mediante el uso de extractos vegetales. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
40. Muñoz, C., C. Quilodran and R. Navia. 2014. Evaluation of biochar-plant extracts complexes on soil nitrogen dynamics. *JBMB*. 8:1- 9.
41. Murillo, E. y J. Méndez. 2007. Guía metodológica para la investigación fotoquímica preliminar en plantas medicinales. Facultad de Ciencias. Universidad de Tolima, Ibagué, Colombia.
42. Muscolo, A., M. Panucci and M. Sidari. 2001. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. *Plant Growth Regul.* 35:31-35.
43. Nishiyama, K., T. Hata, Y. Imamura and S. Ishihara. 1998. Analysis of chemical structure of wood charcoal by X-ray photoelectron spectroscopy. *J. Wood Sci.* 44:56-61.

44. Pares R. y Juarez A. 2002. Bioquímica de los microorganismos. Editorial reverte, S.A. España.
45. Patra, D., U. Kiran, S. Chand and M. Anwar. 2008. Use of urea coated with natural products to inhibit urea hydrolysis and nitrification in soil. *Biol. Fert. Soils*. 45:617-621.
46. Patra, D., U. Kiran and P. Pande. 2006. Urease and nitrification retardation Properties in natural essential oils and their byproducts. *Commun. Soil Sci. Plan*. 37:11-12.
47. Patra, D., M. Anwar, C. Sukhmal, U. Kiran, D.K. Rajput and S. Kumar. 2002. Nimin and *Mentha spicata* oil as nitrification inhibitors for optimum yield of Japanese mint. *Commun. Soil Sci. Plan*. 33(3-4):451-460
48. Patra, D and U. Kiran. 2003. Medicinal and aromatic plant materials as nitrification inhibitors for augmenting yield and nitrogen uptake of Japanese mint (*Mentha arvensis* L. *Var. Piperascens*). *Bioresource Technol*. 86:267-276.
49. Paul, E. 2007. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Third Edition. Academic Press. USA.
50. Preston C. M. and M. W. I. Schmidt. 2006. Black (pyrogenic) carbon in boreal forests: a synthesis of current knowledge and uncertainties. *Biogeosciences Discuss*. 3:211-271.
51. Quillodrán C. 2013. Evaluación de inhibidores naturales de la nitrificación formulados con una matriz de biocarbón. Tesis Magister en Ciencias Agronómicas con mención en Suelos y Recursos Naturales. Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.
52. Reigosa, M., X. Souto and L. González. 1999. Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regul*. 28:83-88.
53. Robarge, W., A. Edwards and B. Johnson. 1983. Water and waste water analysis for nitrate via nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plan* 14:1207.
54. Rogovska, N., D. Laird, R. Cruse, S. Trabue and E. Heaton. 2012. Germination tests for assensing biochar quality. *J. Environ. Qual*. 41:1014-1022.
55. Robertson, G.P. and P.M. Vitousek. 2009. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. *Ann. Rev. Environ. Resour*. 34:97-125.

56. Sadzawka, A., M. Carrasco, R. Grez, M. Mora, H. Flores, A. Neaman. 2006. Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Centro Regional de Investigación La Platina, Serie No30, Santiago, Chile. 164 p.
57. Sahrawat, K.L. and D.R. Keeney. 1985. Perspectives for research on development of nitrification inhibitors. *Commun. Soil Sci. Plan.* 16: 517-524.
58. Salsac, L., S. Chaillou, J. Morot-Gaudry and C. Lesaint. 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 805-812.
59. Schlesinger, W.H. 2009. On the fate of anthropogenic nitrogen. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA.* 106: 203-208.
60. Schmidt, M. and A. Noack. 2000. Black carbon in soils and sediments: Analysis, distribution, implications, and current challenges. *Global Biogeochem. Cy.* 4(3): 777-793.
61. Smith, K.A., I.P. McTaggart and H. Tsuruta. 1997. Emissions of N₂O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation. *Soil Use Manage.* 13:296-304.
62. Singh, B.P., B. Hatton, B. Singh, A. Cowie and A. Kathuria. 2010. Influence of biochars on nitrous oxide emission and nitrogen leaching from two contrasting soils. *J. Environ. Qual.* 39:1224-1235.
63. Smolander, A., S. Kanerva, B. Adamczyk and V. Kitunen. 2012. Nitrogen transformations in boreal forest soils - does composition of plant secondary compounds give an explanations? *Plant Soil.* 350:1-26.
64. Sobrero, M.C. y A. Ronco. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). pp: 71-79. En: *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*, G.Castillo (Ed.) México.
65. Stolpe, N. 2006. Descripciones de los principales suelos de la octava Región de Chile. *Publicaciones Universidad de Concepción.* Chillán, Chile.
66. Subbarao, G.V., O. Ito, K.L. Sahrawat, W.L. Berry, K. Nakahara, T. Ishiwaka, T. Watanabe, K. Suenaga, M. Rondon and I.M. Rao. 2006a. Scope and Strategies for regulation of nitrification in agricultural systems – challenges and opportunities. *J. Plant Sci.* 25:303-335.

67. Subbarao, G.V., T. Ishikawa, O. Ito, K. Nakahara, H.Y. Wang, and W.L. Berry. 2006b. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. *Plant Soil*. 288:101-112.
68. Subbarao G.V., H.Y. Wang, O. Ito, K. Nakahara and W.L. Berry. 2007. NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. *Plant Soil*. 290: 245-257.
69. Subbarao, G.V., K.L. Sahrawat, K. Nakahara, Ishiwaka, T., M. Kishii, M. Rao, C.T. Hash, T.S. George, S. Srinivasa, P. Nardi, D. Bonnett, W. Berry, K. Suenaga and J.C. Lata. 2012. Biological nitrification inhibition – a novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. *Adv. Agron.* 114: 249–302.
70. Suescún, F., L. Paulino, E. Zagal, C. Ovalle and C. Muñoz. 2012. Plant extracts from the Mediterranean zone of Chile potentially affect soil microbial activity related to N transformations: A laboratory experiment, *Acta Agr. Scan.* 62(6):556-564.
71. Stevenson, F.J. and M.A. Cole. 1999. *Cycles of soils: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*. Second edition. John Wiley and Sons, Inc. USA.
72. Taghizadeh-Toosi, A., T. Clough, R. Sherlock and L. Condron. 2012. Biochar adsorbed ammonia is bioavailable. *Plant Soil*. 350:57-59.
73. Taiz L. and E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. 4^a ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Estados Unidos.
74. Tejeda-Sartorius, O. 2008. Inhibidores de germinación y crecimiento de maleza y hortalizas en residuos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Agrocienc.* 42:415-423.
75. Tian, Y., Y. Feng and L. Chao. 2007. Addition of activated charcoal to soil after clearing *Ageratina adenophora* stimulates growth of forbs and grasses in China. *Trop. Grasslands*. 41:285-291.
76. Tiquia, S.M. 2000. Evaluating phytotoxicity of pig manure from the pig – on – litter system. En: P.R. Warman y B.R. Taylor, Ed., *Proceedings of the International Composting Symposium*, CBA Press Inc. Truro, NS, p. 625-647.
77. Torres, L. 2012. Disminución de las pérdidas de nitrógeno desde un suelo Andisol mediante el uso de extractos vegetales. Tesis de grado. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.

78. USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1982. Seed germination/root elongation toxicity test. EG- 12. Office of Toxic Substances, Washington DC.
79. Weiske, A., G. Benckiser and J. Ottow. 2001. Effect of new nitrification inhibitor DMPP in comparison to DCD on nitrous oxide (N₂O) emissions and methane (CH₄) oxidation during 3 years of repeated applications in field experiments. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 60:57-64.
80. Weisser, F. 2014. Mecanismos de acción de extractos de plantas sobre procesos de nitrificación y evaluación biotecnológica para su uso. Memoria de título, Magister en Ciencias Agronómicas con mención en Suelos y Recursos Naturales. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
81. Woolf, D., J. E. Amonette, F. A. Strret-Perrott, J. Lehmann and S. Joseph. 2010. Sustainable biochar to mitigate global climate change. *Nat Commun.* 1:56
82. Williams, P.T., and A.R. Reed. 2006. Development of activated carbon pore structure via physical and chemical activation of biomass fibre waste. *Biomass Bioenergy* 30:144-152.
83. Zerulla, W., T. Barth, J. Dressel, K. Erhardt, K. Horchler von Locquenghien, G. Pasda, M. Radle and A. Wissemier. 2001. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) – a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biol. Fert. Soils.* 34:79–84.
84. Zhang, L.L., Z. Wu, Y.F. Shi, L.J. Chen, Y.C. Song and Y.H. Juan. 2010. Inhibitory effects of aromatic compounds on soil nitrification. *Pedosphere* 20 (3):326 – 333.
85. Zhu, D.Q., S. Kwon and J.J. Pignatello, 2005. Adsorption of single-ring organic compounds to wood charcoals prepared under different thermochemical conditions. *Environ. Sci. Technol.* 39: 3990-3998.
86. Zheng, Z., S. Zhang, T. Li, F. Zhao, Z. He, H. Zhao, X. Yang, H. Wang, J. Zhao and M.T. Rafiq. 2013. Sorption of ammonium and phosphate from aqueous solution by biochar derived from phytoremediation plants. *JZUSB.* 14(12):1152 -1161.