






Biocarbón de biomasa residual agrícola y su influencia en la inmovilización de cadmio en el suelo

Biochar from agricultural residual biomass and its influence on the immobilization of cadmium in the soil

 **Christye Marjorie Silva Guerrero**
Universidad Nacional Agraria de la Selva
christye.silva@unas.edu.pe

 **Luis Eduardo Oré Cierro**
Universidad Nacional Agraria de la Selva
luisore21793@gmail.com

 **Wendy Caroline Loarte Aliaga**
Consultor Constructor & Auditor LEOC E.I.R.L.
wendy_loarte_aliaga@outlook.com.pe

RESUMEN

El cadmio es un metal pesado muy tóxico que por su concentración y distribución puede perjudicar la producción agrícola principalmente en el cultivo de *Theobroma cacao* L. Una estrategia para reducir los niveles de Cd en el suelo es el uso del biocarbón, que es un sólido carbonáceo obtenidos bajo proceso de pirólisis. La investigación consistió en preparar bolsas tipo maseta con suelo agrícola mezclado con biocarbón (cáscara de *Theobroma cacao* L., cascarilla de *Oryza sativa* y cascarilla de *Coffea arabica*) en proporciones de 6%, 8%, 10% y se sembraron plantas de *Theobroma cacao*. El diseño experimental adaptado fue un DCA con arreglo factorial de 3x3 con 5 repeticiones más un tratamiento sin biocarbón como testigo. El biocarbón obtenido de la cascarilla de *C. arabica* y *O. sativa* presentó efectos significativos en el número de hojas, diámetro de tallo y peso fresco de las plantas. El biocarbón disminuyó el contenido de Cd en las plantas, con efectos significativos en la cascarilla de *T. cacao* en proporciones de 6%, 8% y 10%. La mayor eficiencia de inmovilización de cadmio en el suelo se observó en la combinación del biocarbón de la cascarilla de *O. sativa* en una dosis de 8.0% con una inmovilización de 88,22%. Se concluye que la aplicación de biocarbón fue efectiva en la inmovilización Cd en el suelo, de manera de poder reducir la biodisponibilidad en las plantas de *T. cacao*.

Palabras clave: Biocarbón, eficiencia, inmovilización, cadmio disponible, cadmio total, suelo.

ABSTRACT

Cadmium is a very toxic heavy metal that, due to its concentration and distribution, can harm agricultural production, mainly in the cultivation of *Theobroma cacao* L. A strategy to reduce Cd levels in the soil is the use of biochar, which is a carbonaceous solid. obtained under a pyrolysis process. The research consisted of preparing pot-type bags with agricultural soil mixed with biochar (*Theobroma cacao* L. husk, *Oryza sativa* husk and *Coffea arabica* husk) in proportions of 6%, 8%, 10% and *Theobroma cacao* plants were sown. The adapted experimental design was a DCA with a factorial arrangement of 3x3 with 5 repetitions plus a treatment without biochar as a control. The biochar obtained from the husks of *C. arabica* and *O. sativa* showed significant effects on the number of leaves, stem diameter and fresh weight of the plants. The biochar decreased the Cd content in the plants, with significant effects on the *T. cacao* husk in proportions of 6%, 8% and 10%. The highest efficiency of cadmium immobilization in the soil was observed in the combination of the biochar from the *O. sativa* husk in a dose of 8,0% with an immobilization of 88,22%. It is concluded that the application of biochar was effective in immobilizing Cd in the soil, in order to reduce the bioavailability in *T. cacao* plants.

Keywords: Biochar, efficiency, immobilization, available cadmium, total cadmium, soil.

INTRODUCCIÓN

El cadmio es un metal pesado considerado como uno de los elementos más nocivos que pueden encontrarse en el suelo, ya sea de origen natural o antrópico, pero independientemente de ello, las plantas lo pueden absorber y acumular en sus distintas estructuras y proporciones. Además, su incorporación a la cadena alimentaria, tiene en la actualidad mucha preocupación, debido a que este elemento puede alterar el metabolismo humano. La presencia de metales pesados en altas concentraciones en los suelos puede causar riesgos para los ecosistemas a largo plazo, asociados con la transferencia al medio ambiente.

Uno de los problemas más graves en la provincia de Leoncio Prado es la presencia de cadmio en los suelos, con niveles que van de 0,8 a 10,6 ppm de Cd total en el suelo, que por su concentración y distribución puede perjudicar la producción agrícola principalmente en el cultivo de cacao. Por ello es necesario aplicar estrategias de remediación

diseñadas para reducir su biodisponibilidad. Una opción a considerar es la aplicación del biocarbón, que se puede producir a partir de diferentes residuos biomásicos agrícolas de gran cantidad y volumen en la región.

Al-Wabel et al. (2015) en su publicación "Conocarpus biocarbón as a soil amendment for reducing heavy metal availability and uptake by maize plants", concluyeron que la aplicación de biocarbón producido a partir de restos de *Conocarpus*, tuvo un efecto significativo en la disminución de los niveles de la concentración de metales pesados en brotes de la planta de maíz, en respuesta al aumento de las tasas de aplicación con una disminución máxima del 51.3% y 60.5% para Mn, 28% y 21.2% para Zn. 60% y 29.5% para Cu, 53.2% y 47.2% para Cd; sugiriendo que, el biocarbón se puede usar eficazmente como enmienda del suelo para la inmovilización de metales pesados y para reducir la fitotoxicidad.



Li et al. (2016) en su publicación “Biochar amendment immobilizes lead in rice paddy soils and reduces its phytoavailability”, concluyeron que la enmienda con 5% biocarbón producido a partir de paja de *O. sativa* resultó con una disminución del 54 y 94% de Pb soluble en ácido y extraíble en CaCl_2 , respectivamente, al aplicarlo a un suelo con cultivo de arroz en etapa de madurez. La aplicación del biocarbón al suelo produjo una disminución en la disponibilidad de Pb, además en muestras de las raíces del *O. Sativa* con aplicación de biocarbón, se encontraron Pb-pectina y Pb-cisteína que son complejos orgánicos que impiden la translocación de Pb de la raíz al brote, reduciendo la acumulación de Pb en el *O. sativa*.

Díaz (2017) en su publicación “Remediación de suelos alterados por actividad de minería del carbón a cielo abierto, mediante aplicación de biocarbón procedente de residuos biomásicos de la palma de aceite en la zona carbonífera del departamento del Cesar”, indica que la aplicación de biocarbón producido con residuos biomásicos del cultivo de *Elaeis guineensis* “palma de aceite”, guarda relación con el crecimiento de la planta de manera favorable. Los tratamientos en combinación de biocarbón, micorrizas y NPK, en mayoría aumentaron la biomasa radicular. El estudio concluyó que la adición de biocarbón en un suelo minero reduce el alto contenido de metales fitotóxicos (Cu, Zn, Al, Mn y Fe), además influye en la germinación y elongación de las raíces de las semillas de pasto *Brachiaria decumbens*.

Bajo este contexto se plantea como objetivo, evaluar el biocarbón de biomasa residual agrícola y su influencia en la inmovilización de cadmio en el suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características generales del área de estudio

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Tratamiento de la contaminación de suelos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, políticamente se encuentra ubicado en el distrito de Rupa-Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco. La coordenada de ubicación corresponde a $09^\circ 18' 53''$ latitud sur y $75^\circ 59' 44''$ longitud oeste, a una altura de 660 m.s.n.m.

Materiales y equipos

Material orgánico o biológico: Biocarbon a partir de la cáscara de *Theobroma cacao* L. “cacao”, cascarilla de *O. sativa* (arroz) y cascarilla de *C. arabica* (café), material edáfico con alto contenido en cadmio, semillas de *T. cacao* (Cacao).

Material de campo: sacos de 50 kg, guantes de latex, botas de jebe, pala, pico, machete, wincha 50 m, bolsas impermeables.

Materiales e instrumentos de laboratorio: vaso de precipitación, matraces erlenmeyer 100 mL, probetas, buretas, embudos, piseta, pipeta de 10 mL, pinzas, crisoles, papel filtro, bolsa tipo masetta, regadora, regla, vernier digital y termómetro digital tipo k.

Reactivos: Ácido nítrico concentrado (HNO_3), Ácido perclórico concentrado (HClO_4), y solución extractante EDTA 0.05M.

Espectrofotómetro de emisión atómica ICP-OES HORIBA – Ultima Expert, pH-metro, multiparámetro, estufa, mufla, balanza analítica.

Metodología

Tratamiento del suelo con biocarbón

Recolección de suelo contaminado

El material edáfico procedió de una parcela en la zona de Picuruyacu, perteneciente al distrito de Castillo Grande, provincia de Leoncio Prado, región Huanuco, donde se extrajo suelo con alto contenido en cadmio para utilizarlo en la aplicación del tratamiento con biocarbón.

Muestreo de suelo. Se realizaron los procedimientos de la “Guía de muestreo de suelo”

según MINAN (2014) que indica que el muestreo aleatorio simple es recomendado para áreas homogéneas menores a 5 hectáreas con toma de muestras superficiales compuestas; es decir, submuestras (10 – 25 unidades) en un área y capa determinada para unir las submuestras individuales en una muestra compuesta. La profundidad para la toma de las muestras superficiales considerada para un suelo agrícola es de 0 a 30 cm (profundidad de aradura)

Tabla 01

Profundidad del muestreo de suelo

Uso de suelo	Profundidad de muestreo
Suelo agrícola	0 a 30 cm (*), 30 a 60 cm

Fuente: MINAM (2014). (*) Profundidad de aradura.

Se realizó un muestreo aleatorio simple, en el cual se tomó 10 puntos al azar, considerando una determinada distancia o número de pasos. Las submuestras se mezclaron homogéneamente hasta tener una cantidad considerable para ser sometida a partición y obtener la muestra representativa para

el análisis en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Análisis fisicoquímico preliminar del suelo. El análisis fisicoquímico de la muestra de suelo se realizó en el laboratorio de Análisis de suelos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, siguiendo diferentes métodos de análisis.

Tabla 02

Métodos empleados para el análisis fisicoquímico del suelo

	Parámetro	Método
Físicos	Clase Textural	Hidrómetro de Bouyoucus
	Densidad aparente	Relación masa/volumen
Químicos	pH	Potenciometría relación 1:1 (agua - suelo)
	Materia orgánica	Método de Walkley y Black
	Conductividad eléctrica	Conductimetría
	CIC	Método de Acetato de Amonio 1N pH 7 (Suelos con pH>5,5)
	Cadmio disponible	Extractante EDTA 0,05M Ph7 (Westerman, 1990)
	Cadmio total	Digestión ácido nítrico-perclórico

Fuente: Thomas (1996)

Preparación del sustrato suelo-biocarbón

La cantidad de sustrato suelo-biocarbón utilizado en cada bolsa tipo maseta fue de 1.8 kg aproximadamente y las cantidades de biocarbón a aplicarse son de acuerdo al porcentaje en peso de

6%, 8% y 10% (108g, 144g, 180g respectivamente) para cada tipo de biocarbón, para posteriormente ser mezclados. El sustrato se acondicionó en bolsas tipo maseta, considerando el testigo con contenido unicamente de suelo.



Pre germando y transplante

Se recolectaron semillas de *T. cacao*. (Cacao) de variedad CCN-51 que fueron oreadas y seleccionadas por tamaño. Luego fueron sembrados en aserrín considerando un cierto nivel de humedad. Al cabo de cuatro a cinco días se observaron las radículas de las semillas, encontrándose aptas para ser transplantadas a las bolsas tipo masetta a una profundidad del doble del diámetro de las semillas. El experimento se llevó a cabo en una cámara de crecimiento de plantas (24 ± 3 °C y 12 h de luz) durante un período de 8 semanas (60 días).

Evaluación del desarrollo de la planta de *Theobroma cacao* L. (cacao)

Altura de planta. La evaluación de esta característica se realizó al finalizar el experimento (60 días después del transplante). Para la medición de la altura de la planta se empleó una regla graduada en cm, desde la superficie del suelo hasta el ápice del brote inicial mayor del tallo principal.

Diámetro del tallo. La evaluación de esta característica se realizó al finalizar el experimento, las mediciones se realizaron utilizando un vernier digital.

Longitud radicular. La evaluación de esta característica se determinó al finalizar el experimento, se realizó la medición con el uso de una regla graduada en cm, desde la inserción con el esqueje hasta la parte terminal de las raíces de la planta.

Número de hojas. La evaluación de esta característica se determinó realizando un conteo de las hojas al finalizar el experimento, en cada uno de los tratamientos.

Peso fresco y seco. La evaluación de esta característica se determinó al finalizar el

experimento. Se tomó en cuenta todas las partes de la planta (tallo, hoja y raíz), las cuales fueron pesadas para determinar el peso fresco (g) y se llevaron las muestras a la estufa a 105°C durante 48 horas para posteriormente ser pesadas para obtener el peso seco (g).

Determinación de los niveles de cadmio

Cadmio disponible. El análisis de cadmio disponible en el suelo se realizó con el procedimiento efectuado por Westerman (1990) mediante la utilización de un extractante EDTA 0,05M pH 7.

El procedimiento consiste en secar el suelo y tamizarlo con malla de 2mm, para luego pesar 5 g de suelo y colocarlo en un vaso agregando 20 ml de solución Extractante (EDTA 0,05M; pH 7), luego se colocó en el Agitador por 60 a 45 minutos y se filtró con papel filtro whatman N° 40, finalmente se realizó las lecturas de las muestras en el espectrometro de emisión óptica ICP OES para el análisis del elemento de interés (Barrueta, 2013).

Cadmio total. El análisis de cadmio total en el suelo y planta se utilizó el método de digestión por vía húmeda, mediante ataque de ácido nítrico/perclórico.

El procedimiento consistió en secar el suelo y tamizarlo con malla de 2 mm, luego se peso 0,5 g de muestra y se colocó en un matraz adicionándole 10 ml de solución ácido nítrico/perclórico 1:4 y se cubrió con un embudo de cristal dejando reposar por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se calentó la parrilla a 150 °C y se dejó hasta que la muestra se aclare y se seque casi por completo (aprox. 0,5 ml). Las soluciones restantes se transfirieron a matraces para enrasar a una medida cuantitativa de 25 ml. Finalmente se realizó las lecturas de las muestras en el espectrómetro de

emisión óptica ICP OES para el análisis del elemento de interés (Barrueta, 2013).

Eficiencia de inmovilización de cadmio

Se determinó el porcentaje de inmovilización de cadmio en el suelo con los resultados del análisis de la concentración de cadmio disponible en el suelo en cada tratamiento después de la aplicación de diferentes tipos y dosis de biocarbón. La eficiencia de inmovilización se calculó a través de la siguiente ecuación (De La Cruz, 2018):

$$\% E = \frac{C_o - C_f}{C_o} \times 100$$

Donde:

- % E = es la eficiencia de inmovilización de cadmio en el suelo.
- C_o = concentración inicial de cadmio en el suelo (mg/kg).
- C_f = concentraciones final de cadmio en el suelo (mg/kg).

RESULTADOS

Efecto del biocarbón en el desarrollo de las plantas de *Theobroma cacao* L.

Altura de las plantas

El uso de diferentes tipos de biomasa presentó efectos estadísticos significativos sobre la altura total de plantas; en caso de los demás factores y la interacción no se encontró diferencias estadísticas; además, no se diferenciaron efectos entre los factores vs el testigo.

Los datos obtenidos para la altura presentaron comportamientos favorables por encontrarse dentro del intervalo considerado para experimentos.

Tabla 03

ANVA para la altura en plantas de *T. cacao* sometidas al tipo de biomasa y concentración de biocarbón.

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fc	Valor P
Entre grupos	153,101	9	17,011	1,902	0,0797 ^{ns}
Tipo de biomasa (A)	77,152	2	38,576	4,3129	0,0201*
Porcentaje de biocarbón (B)	21,142	2	10,571	1,1818	0,3172 ^{ns}
Interacción A x B	41,836	4	10,459	1,1693	0,3388 ^{ns}
Factores vs testigo	12,971	1	12,971	1,250	0,2690 ^{ns}
Error experimental	357,776	40	8,944		
Total	510,877	49			

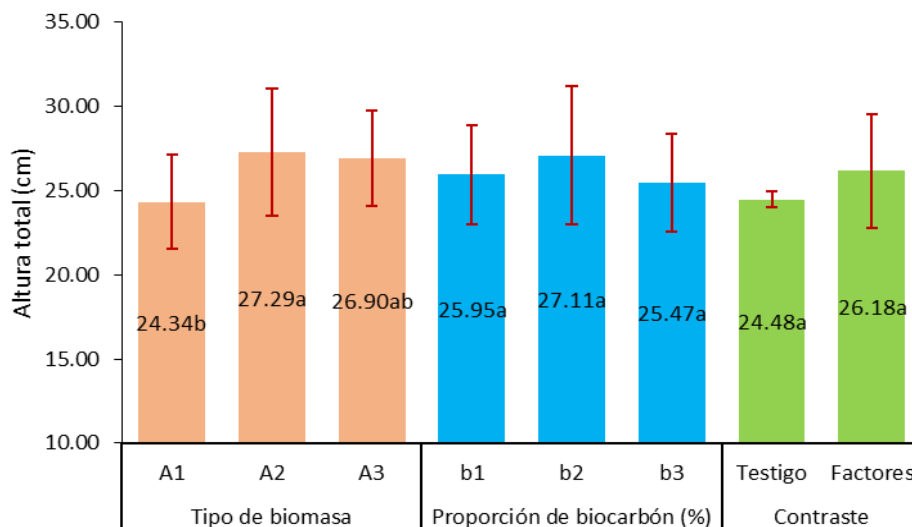
CV: 11,50%; ns: no significativo; *: significativo.

La prueba de comparación de medias de Tukey para los factores en estudio registró efectos principales en la altura al utilizar los tipos de biomasa, siendo mucho mayor los efectos en la cascarilla del *C. arabica* (a₂) con una media de 27,29 cm, y con menores alturas al emplear la cáscara de *T. cacao* (a₁) con una media de 24,34 cm. En caso de la proporción de biocarbón, no se

reportó diferencias estadísticas, pero el mayor promedio se observó al utilizar 8,0% de biocarbón (b₂), aunque la variabilidad fue mayor; en lo que respecta al contraste de los factores con el testigo, no se logró demostrar diferencias estadísticas significativas, siendo numéricamente superior la media de los factores en estudio.

Figura 01

Efecto principal del tipo de biomasa, concentración de biocarbón y el contraste con el testigo para la altura en plantas de *T. cacao*.



Número de hojas por planta

El uso de diferentes tipos de biomasa presentó efectos estadísticos significativos sobre la variable número de hojas por plantas; el porcentaje de biocarbón aplicado no presentó significancia estadística, mientras que en caso de la interacción entre los niveles de ambos factores en estudio se

observó significancia estadística; además, hubo diferencias estadísticas de los efectos entre los factores vs el testigo. Los datos obtenidos para el número de hojas presentaron comportamientos favorables por encontrarse dentro del intervalo considerado para experimentos.

Tabla 04

ANVA para el número de hojas en plantas de *T. cacao* sometidas al tipo de biomasa y concentración de biocarbón.

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fc	Valor P
Entre grupos	16,800	9	1,867	2,963	0,0085**
Tipo de biomasa (A)	5,911	2	2,956	4,6914	0,0148*
Porcentaje de biocarbón (B)	0,178	2	0,089	0,1411	0,8688 ^{ns}
Interacción A x B	7,156	4	1,789	2,8395	0,0366*
Factores vs testigo	3,556	1	3,556	4,439	0,0404*
Error experimental	25,200	40	0,630		
Total	42,000	49			

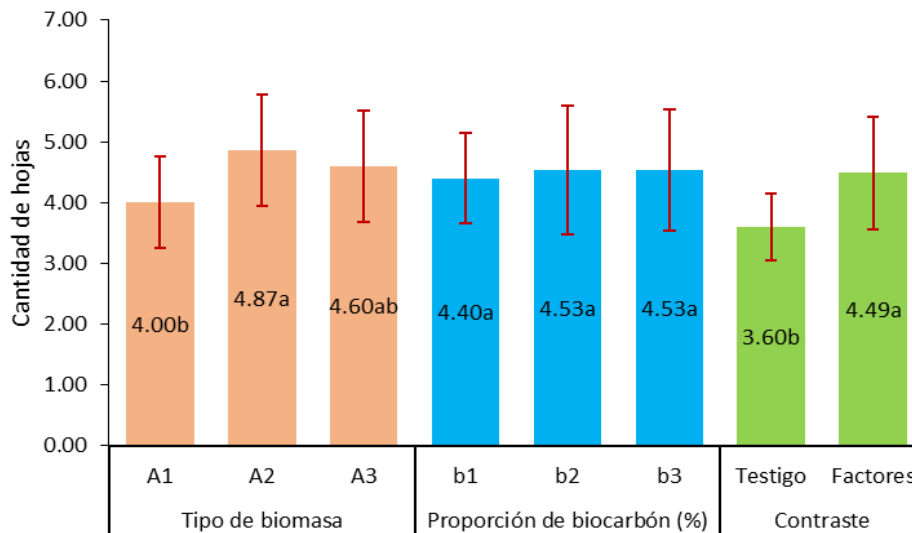
CV: 18,04%; ns: no significativo; *: significativo; **: altamente significativo.

En consideración a la prueba de Tukey para los factores en estudio, se registró efectos principales del tipo de biomasa sobre la cantidad de hojas por planta, siendo mucho mayor el efecto en la cascarilla del *C. arabica* (a₂) con una media de 4,87 hojas, mientras que el promedio menor se observó

al emplear la cáscara de *T. cacao* L. (a₁) con un valor de 1,0 hojas. La proporción de biocarbón alcanzó mayor promedio (4,53 hojas) al utilizar 8,0% y 10,0% de biocarbón (b₂ y b₃) y de la misma manera, respecto al contraste de los factores con el testigo, hubo diferencias estadísticas significativas.

Figura 02

Efecto principal de los factores en estudio y el contraste con el testigo del número de hojas en plantas de *T. cacao*.



Al analizar el efecto de los niveles del factor A en B, se observa que utilizar cáscara de *T. cacao* L. (a₁) en diferentes concentraciones de biocarbón y el testigo no generan diferencias estadísticas significativas sobre la cantidad de hojas en las plantas de *T. cacao*, en caso de la cascarilla de *C. arabica* el mayor efecto se observa al utilizar 10,0% de biocarbón donde la media fue 5,60 hojas/planta y en caso de la cascarilla de *O. sativa*

sobresalió la aplicación de 6,0% de biocarbón con una media de 4,40 hojas/planta. Analizando los niveles del factor B en el factor A, solo se registró diferencias de efectos en el nivel b₃ (10,0% de concentración de biocarbón). El mejor efecto se observó en la combinación cascarilla de *C. arabica* al 10,0% de concentración (a₂b₃) con una media de 5,60 hojas/planta.

Tabla 05

Efecto simple para la cantidad de hojas en *T. cacao* sometidas al tipo de biomasa y concentración de biocarbón.

Factores	Concentración de biocarbón			Testigo	Valor P
	6,00%	8,00%	10,00%		
Tipo de biomasa	<i>T. cacao</i> L.	4,20 ^{a/a}	4,00 ^{a/a}	3,80 ^{a/b}	0,621 ^{ns}
	<i>C. arabica</i>	4,60 ^{ab/a}	4,40 ^{ab/a}	5,60^{a/a}	0,006 ^{**}
	<i>O. sativa</i>	4,40 ^{ab/a}	5,20 ^{a/a}	4,20 ^{ab/b}	0,040 [*]
Testigo	3,60 ^{-/a}	3,60 ^{-/a}	3,60 ^{-/b}		
Valor P	0,192 ^{ns}	0,072 ^{ns}	<0,001 ^{**}		

ns: no significativo; *: significativo; **: altamente significativo. Letras diferentes demuestran significancia estadística.

Diámetro del tallo

El uso de diferentes tipos de biomasa presentó efectos estadísticos significativos sobre el diámetro del tallo en las plantas de *T. cacao*; en caso del porcentaje de biocarbón y la interacción de ambos factores no se encontró diferencias estadísticas

significativas; de manera contraria, se reporta efectos significativos entre los factores vs el testigo. Los datos obtenidos para el diámetro del tallo presentaron comportamientos favorables por encontrarse dentro del intervalo considerado para experimentos.

Tabla 06

ANVA para el diámetro del tallo en *T. cacao* sometidas al tipo de biomasa y concentración de biocarbón

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fc	Valor P
Entre grupos	1,472	9	0,164	2,198	0,0427*
Tipo de biomasa (A)	0,815	2	0,407	5,4769	0,0079**
Porcentaje de biocarbón (B)	0,103	2	0,051	0,6902	0,5073 ^{ns}
Interacción A x B	0,149	4	0,037	0,4997	0,7361 ^{ns}
Factores vs testigo	0,406	1	0,406	4,817	0,0330*
Error experimental	2,975	40	0,074		
Total	4,447	49			

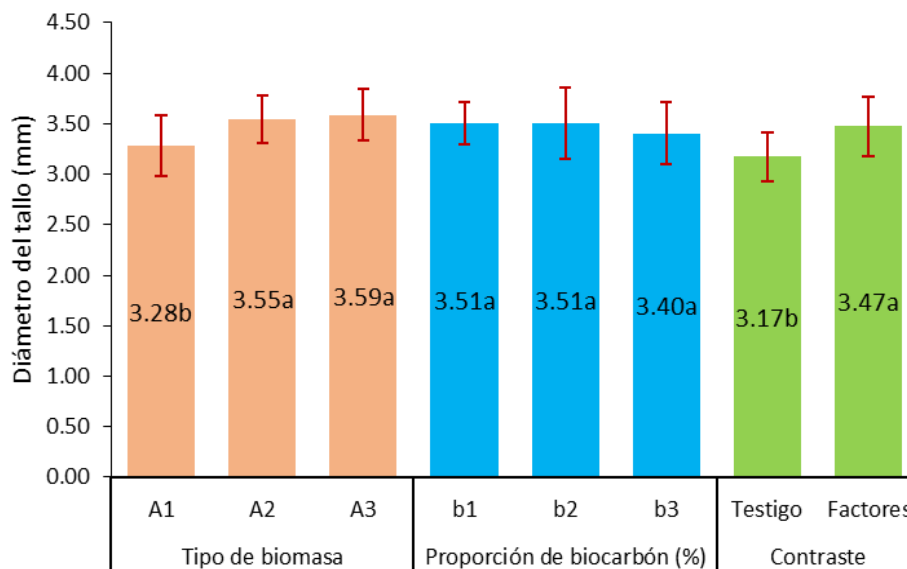
CV: 7,92%; ns: no significativo; *: significativo; **: altamente significativo.

Con la prueba de Tukey para los factores en estudio, se registró efectos principales en el diámetro del tallo al utilizar los tipos de biomasa, siendo mayor los efectos en la cascarilla del *C. arabica* (a₂) y *O. sativa* (a₃) con medias de 3,55 y 3,59 mm respectivamente; mientras que, en la proporción de biocarbón, no se reportó diferencias

estadísticas significativas, pero el mayor promedio se observa al utilizar 8,0% de biocarbón (b₂). Respecto al contraste de los factores con el testigo, se observó la existencia de diferencias estadísticas significativas con el cual se demuestra una mayor la media en los factores considerados en el estudio.

Figura 03

Efecto principal de los factores en estudio y el contraste con el testigo para el diámetro del tallo en *T. cacao*



Longitud radicular

El uso de diferentes tipos de biomasa presentó efectos estadísticos significativos sobre la longitud radicular en las plantas de *T. cacao* L.; para el caso del porcentaje de biocarbón y la interacción entre ambos factores, no se encontró diferencias

estadísticas significativas; además, no se diferenció efectos entre los factores en estudio vs el testigo. Los datos obtenidos correspondientes a la longitud del sistema radicular fueron favorables debido a que estuvieron enmarcados dentro del intervalo considerado para estudios experimentales.

Tabla 07

ANVA para la longitud radicular en *Theobroma cacao* L. sometidas al tipo de biomasa y concentración de biocarbón.

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fc	Valor P
Entre grupos	327,591	9	36,399	4,143	0,0008**
Tipo de biomasa (A)	252,355	2	126,178	14,3632	<0,0001**
Porcentaje de biocarbón (B)	31,934	2	15,967	1,8176	0,1756 ^{ns}
Interacción A x B	43,242	4	10,811	1,2306	0,3133 ^{ns}
Factores vs testigo	0,060	1	0,060	0,004	0,9483 ^{ns}
Error experimental	351,392	40	8,785		
Total	678,983	49			

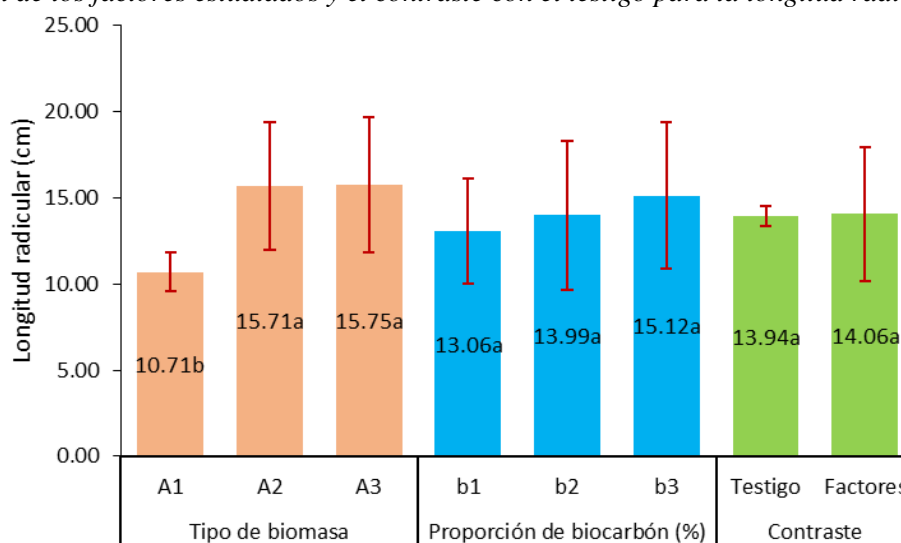
CV: 21,10%; **: altamente significativo.

Basándose en la prueba de comparación de medias de Tukey para los factores en estudio, se registró efectos principales en la longitud radicular al emplear los tipos de biomasa, siendo mucho mayor los efectos en la cascarilla del *C. arabica* (a₂) y *O. sativa* (a₃) con medias aritméticas de 15,71 y 15,75 cm respectivamente. En caso de la proporción de

biocarbón, no se reportó diferencias estadísticas significativas, de manera similar, en el contraste de los factores con el testigo hubo ausencia de diferencias estadísticas respecto a la variable mencionada, siendo numéricamente superior la media de los factores estudiados.

Figura 04

Efecto principal de los factores estudiados y el contraste con el testigo para la longitud radicular en *T. cacao*



Peso fresco por planta

Mediante el análisis de la varianza, se determinó que, utilizar diferentes tipos de biomasa presentaron efectos estadísticos significativos sobre el peso fresco en las plantas de *T. cacao*; en caso del factor denominado porcentaje de biocarbón así como la interacción de ambos

factores considerados en el estudio no se encontraron diferencias estadísticas significativas; de manera contraria, se evidenció diferencias estadísticas significativas al contrastar a los factores estudiados vs el testigo adicional. Los resultados para la variable peso fresco de las plantas del cacao presentaron comportamientos

muy favorables por enmarcarse el coeficiente de variación en el intervalo considerado para experimentos.

Tabla 08

ANVA para el peso fresco en *T. cacao* sometidas al tipo de biomasa y concentración de biocarbón

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fc	Valor P
Entre grupos	26,538	9	2,949	2,883	0,0101*
Tipo de biomasa (A)	16,196	2	8,098	7,9172	0,0013**
Porcentaje de biocarbón (B)	1,783	2	0,891	0,8716	0,4261 ^{ns}
Interacción A x B	3,097	4	0,774	0,7569	0,5595 ^{ns}
Factores vs testigo	5,463	1	5,463	4,230	0,0452*
Error experimental	40,914	40	1,023		
Total	67,452	49			

CV: 17,32%; ns: no significativo; *: significativo; **: altamente significativo.

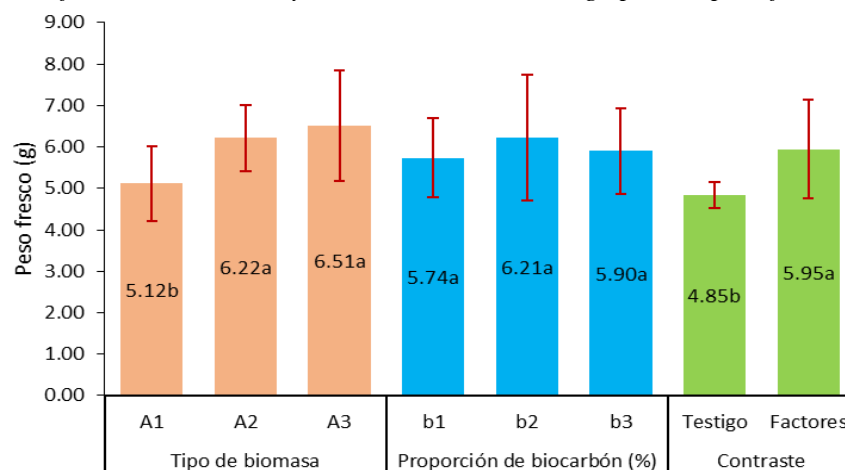
Se observó efectos principales sobre el peso fresco al utilizar los tipos de biomasa como la cascarilla del *C. arabica* (a₂) y *O. sativa* (a₃) con promedios de 6,22 y 6,51 g respectivamente; en caso de la proporción de biocarbón, no se registró diferencias estadísticas, pero es notorio que, el mayor

promedio se observó al utilizar 8,0% de biocarbón (b₂).

Respecto al contraste entre los factores en estudio con el testigo, hubo diferencias estadísticas, siendo mayor el promedio para los factores en estudio con 5,95 g por planta, mientras que en caso del testigo solamente se observó una media de 4,85 g.

Figura 05

Efecto principal de los factores en estudio y el contraste con el testigo para el peso fresco de *T. cacao*



Peso seco por planta

De acuerdo al análisis de la varianza, se demostró que los factores estudiados como el uso de diferentes tipos de biomasa no presentaron efectos estadísticos significativos sobre el peso seco en las plantas de *T. cacao*, de manera similar se comportó el uso del factor porcentaje de biocarbón al no

evidenciar diferencias estadísticas; además, no se encontró interacción estadística significativa entre los niveles de ambos factores estudiados; por otra parte, al contrastar los efectos de los factores vs el testigo no hubo significancia estadística significativa. De acuerdo al valor registrado del coeficiente de variación (15,58%), los datos

obtenidos para la variable peso seco estuvieron enmarcados dentro del intervalo considerado para investigaciones experimentales.

Tabla 09

ANVA para el peso seco en *T. cacao* sometidas al tipo de biomasa y concentración de biocarbón.

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fc	Valor P
Entre grupos	0,391	9	0,043	1,048	0,4204 ^{ns}
Tipo de biomasa (A)	0,159	2	0,079	1,9143	0,1607 ^{ns}
Porcentaje de biocarbón (B)	0,170	2	0,085	2,0514	0,1419 ^{ns}
Interacción A x B	0,055	4	0,014	0,3291	0,8568 ^{ns}
Factores vs testigo	0,008	1	0,008	0,184	0,6700 ^{ns}
Error experimental	1,657	40	0,041		
Total	2,049	49			

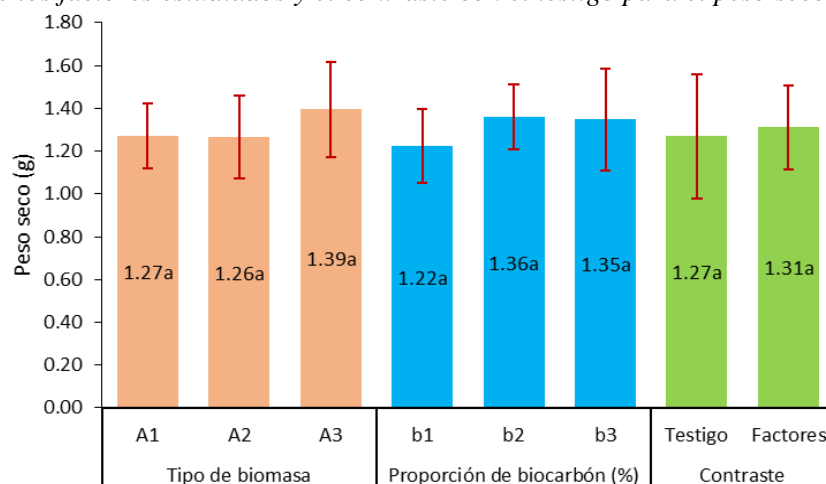
CV: 15,58%; ns: no significativo.

No se registró efectos principales en el peso seco al utilizar los tipos de biomasa, con el cual se determina que, numéricamente resultó ser mucho mayor el promedio con el uso de cascarilla del *O. sativa* (a₃) con un valor de 1,39 g por planta; en caso de la proporción de biocarbón utilizado, el mayor promedio se observa al utilizar 8,0% de biocarbón (b₂) con una media aritmética de 136 g

en peso seco; respecto al contraste realizado entre los factores con el testigo considerado, no se logró demostrar diferencias estadísticas significativas respecto a la variable peso seco de las plantas del cacao, siendo numéricamente superior el promedio de los dos factores considerados en el estudio con un valor de 1,31 g por planta.

Figura 06

Efecto principal de los factores estudiados y el contraste con el testigo para el peso seco en *T. cacao*



Efecto del biocarbón sobre los niveles de cadmio en la planta de *Theobroma cacao*

De acuerdo al análisis de la varianza, utilizar diferentes tipos de biomasa presentan efectos estadísticos significativos sobre el contenido de

cadmio en las plantas de *T. cacao*; para el caso del factor en estudio porcentaje de biocarbón, se evidenció diferencias estadísticas significativas sobre la variable ya indicada; además, se reporta interacción estadística entre los niveles de ambos

factores en estudio y en caso del contraste entre los factores vs el testigo también hubo diferencias estadísticas significativas. De acuerdo al valor del

coeficiente de variación, los datos obtenidos para la variable analizada se encuentran en el rango considerado para los estudios experimentales.

Tabla 10

ANVA para los niveles de cadmio en *T. cacao* sometidas al tipo de biomasa y concentración de biocarbón.

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fc	Valor P
Entre grupos	4,839	9	0,538	48,817	<0,0001**
Tipo de biomasa (A)	0,670	2	0,335	30,4068	<0,0001**
Porcentaje de biocarbón (B)	0,185	2	0,092	8,3963	0,0009**
Interacción A x B	0,135	4	0,034	3,0650	0,0271*
Factores vs testigo	3,850	1	3,850	129,173	<0,0001**
Error experimental	0,441	40	0,011		
Total	5,280	49			

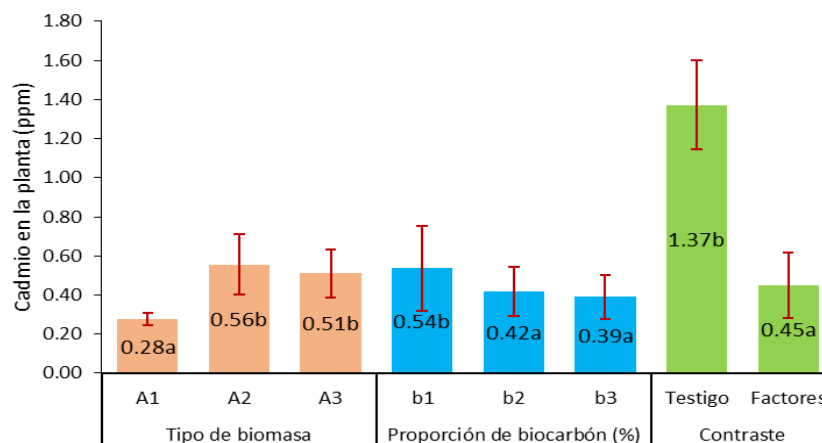
CV: 19,41%; *: significativo; **: altamente significativo.

Basándose en la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para los factores en estudio, se registró efectos principales sobre el contenido de cadmio entre los tejidos de las plantas de *T. cacao*, siendo mayor dichos efectos estadísticos en la cáscara de *T. cacao* (a₁) con una media de 0,28 ppm; en caso de la proporción de biocarbón, el mejor promedio se observa al utilizar solamente 8,0% y 10,0% de biocarbón (b₂ y b₃) con promedios

aritméticos de 0,42 y 0,39 ppm respectivamente; respecto al contraste de los factores estudiados con el testigo, se observa superior valor de la media en los factores con un valor de 0,45 ppm en comparación a las plantas de cacao que no fueron tratados con biocarbón al presentar una media de 1,37 ppm, siendo estadísticamente diferentes dichos valores.

Figura 07

Efecto principal de los factores estudiados y el contraste con el testigo para el contenido de cadmio en *T. cacao*.



Analizando el efecto de los niveles del factor A en el factor B, se observa que al utilizar cáscara de *T. cacao* (a₁) en diferentes concentraciones de biocarbón generan efectos estadísticos significativos muy superiores en comparación al

testigo para el contenido de cadmio en las plantas de *T. cacao*; en caso de la cascarrilla de *C. Arabica*, el mayor efecto estadístico se observa al utilizar 8,0% y 10,0% de biocarbón (b₃) con promedios aritméticos de 0,45 y 0,47 ppm respectivamente, y

para la cascarilla de *O. sativa* sobresalieron también la aplicación de 8,0% y 10,0% de biocarbón. Analizando los niveles del factor B en el factor A, se registró diferencias de efectos en el nivel b₁ y b₂ (6,0% y 8,0% de concentración). Los

mejores efectos se observaron en las combinaciones generadas por cáscara de *T. cacao* en todo sus concentraciones de biocarbón: a₁b₁, a₁b₂ y a₁b₃.

Tabla 11

Efecto simple para el nivel de cadmio en T. cacao sometidas al tipo de biomasa y proporción de biocarbón.

Tipo de biomasa	Factores	Concentración de biocarbón			Testigo	Valor P
		6,00%	8,00%	10,00%		
Tipo de biomasa	<i>T. cacao</i> L.	0,29 ^{a/a}	0,28 ^{a/a}	0,26 ^{a/a}	1,37 ^{b/-}	<0,001**
	<i>C. arabica</i>	0,75 ^{b/b}	0,45 ^{a/bc}	0,47 ^{a/a}	1,37 ^{c/-}	<0,001**
	<i>O. sativa</i>	0,57 ^{a/b}	0,52 ^{a/b}	0,44 ^{a/a}	1,37 ^{b/-}	<0,001**
	Testigo	1,37 ^{-c}	1,37 ^{-c}	1,37 ^{-b}		
	Valor P	<0,001**	<0,001**	<0,001**		

** : altamente significativo. Letras diferentes demuestran significancia estadística.

Eficiencia de inmovilización de cadmio en el suelo

La aplicación de diferentes tipos de biomasa agrícola no presentó efectos estadísticos significativos sobre la eficiencia de inmovilización del cadmio en el suelo; en caso del porcentaje de biocarbón se registró diferencias estadísticas significativas en la variable analizada y también se encontró interacción estadística significativa entre

los factores estudiados; para el caso del contraste entre los factores vs el testigo se encontró diferencias estadísticas. Al observar el coeficiente de variación del 1,16%, se determina que los datos obtenidos respecto a la eficiencia de inmovilización fueron favorables al encontrarse dentro del intervalo de los estudios pertenecientes a los experimentos.

Tabla 12

ANVA para la eficiencia de inmovilización de cadmio en suelos sometidos al tipo de biomasa y proporción de biocarbón

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fc	Valor P
Entre grupos	8912,895	9	990,322	1076,900	<0,0001**
Tipo de biomasa (A)	1,497	2	0,749	0,8141	0,4502 ^{ns}
Porcentaje de biocarbón (B)	14,683	2	7,342	7,9835	0,0012**
Interacción A x B	25,182	4	6,295	6,8459	0,0003**
Factores vs testigo	8871,533	1	8871,533	5449,143	<0,0001**
Error experimental	36,784	40	0,920		
Total	8949,680	49			

CV: 1,16%; ns: no significativo; **: altamente significativo.

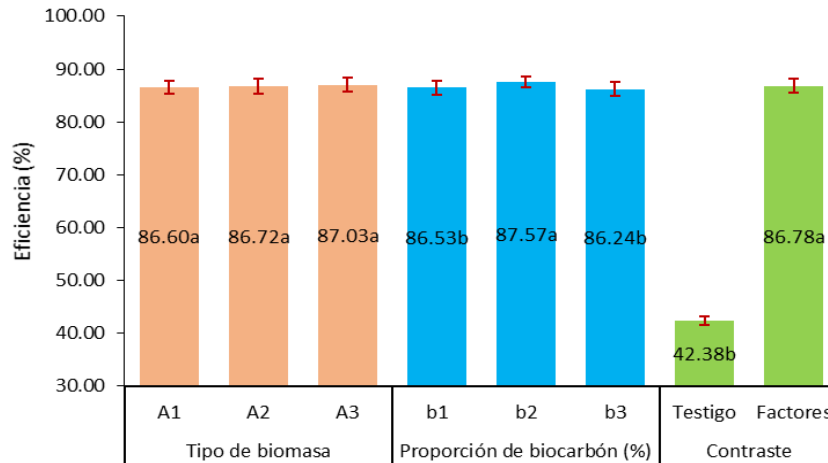
Utilizar diferentes tipos de biomasa no presenta efectos diferentes en la eficiencia de inmovilización del cadmio, mientras que al considerar la proporción de biocarbón, se reporta mejores efectos estadísticos al utilizar 8,0% de biocarbón (b₂) con una media de 87,75%. Respecto

al contraste realizado entre los factores considerados con el testigo establecido, se logró demostrar diferencias estadísticas significativas, siendo marcadamente superior la media de los factores con un valor de 86,78% respecto al

42,38% encontrado por el testigo lo cual ratifica la superioridad numérica y estadística

Figura 08

Efecto principal de los factores estudiados y el contraste con el testigo para la eficiencia de inmovilización de cadmio en el suelo



Al analizar el efecto de los niveles del factor A en el factor B, se observa que utilizar cáscara de *T. cacao*. (a₁) en concentraciones de biocarbón del 10,0% generan mayor diferencias estadísticas sobre la eficiencia de inmovilización; para el caso de la cascarilla de *C. arabica*, sobresalieron todas las concentraciones de biocarbón respecto al testigo. Analizando los niveles del factor B en el

factor A, se reporta que al utilizar el biocarbón a 6,0% y 8,0% sobresale la eficiencia de la cascarilla de *O. sativa*, mientras que al 10,0% tiene mejor expresión la cáscara de *T. cacao* L. La mayor eficiencia se observó en la combinación cascarilla de *O. sativa* al 8,0% de concentración (a₃b₂) con una media de 88,22%.

Tabla 13

Efecto simple para la eficiencia de inmovilización de cadmio en suelos sometidos al tipo de biomasa y proporción de biocarbón

Factores	Concentración de biocarbón			Testigo	Valor P
	6,00%	8,00%	10,00%		
Tipo de biomasa					
<i>T. cacao</i> L.	85,52 ^{b/b}	86,78 ^{ab/b}	87,50 ^{a/a}	42,38 ^{c/-}	<0,001**
<i>C. arabica</i>	86,63 ^{a/ab}	87,72 ^{a/ab}	85,79 ^{a/b}	42,38 ^{b/-}	<0,001**
<i>O. sativa</i>	87,44 ^{a/a}	88,22^{a/a}	85,44 ^{b/b}	42,38 ^{c/-}	<0,001**
Testigo	42,38 ^{-/c}	42,38 ^{-/c}	42,38 ^{-/c}		
Valor P	<0,001**	<0,001**	<0,001**		

** : altamente significativo. Letras diferentes demuestran significancia estadística.

DISCUSIÓN

La aplicación del biocarbón ha demostrado muchos beneficios ambientales, así como un aumento significativo de crecimiento de la planta (Kookana

et al., 2011 y Powlson et al., 2011). El efecto de la aplicación del biocarbón implica un estímulo en el desarrollo de la zona del meristemo (Lehmann et al., 2011), responsable del crecimiento de la planta.

Según los resultados registrados, sí se presentaron efectos al utilizar el biocarbón de diferentes tipos de biomasa, siendo mucho mayor con el biocarbón de cascarilla de *C. arabica*.

Al evaluar el número de hojas en las plántulas de *T. cacao* L. con aplicación de biocarbón se presentaron efectos significativos respecto al contraste de los factores con el T₀ o testigo. Carter et al. (2013) encontraron diferencias significativas en el uso de biocarbón de cascarilla de *O. sativa* en el número de hojas en plantas de lechugas (*Lactuca sativa*) y repollo (*Brassica chinensis*) especialmente cuando se pueden incorporar otras enmiendas orgánicas al suelo junto con el biocarbón.

La aplicación de biocarbón presentó efectos significativos en el diámetro del tallo alcanzado por las plántulas de *T. cacao* L. respecto al contraste de los factores con el T₀ o testigo. Tamayo y Muñoz (2020) aplicaron biocarbón de *T. cacao* en un cultivo de *Phaseolus vulgaris* (frijol), y observaron que la proporción de 2% biocarbón, presentó plantas con mejor calidad y con un índice de esbeltez mayor, con respecto a la proporción de 4 % y al tratamiento control, que indican plantas con un índice de esbeltez menor.

Avenza (2012) y Herrera et al. (2018) describen que el aporte de los distintos tipos de biocarbón no ha tenido como consecuencia un mayor desarrollo del sistema radicular en plantas de *Hordeum vulgare* (cebada) y *Capparis scabrida* (zapote) respectivamente. En el presente estudio la aplicación de biocarbón registró efectos principales en los diferentes tipos de biomasa, pero no se encontró efectos significativos en el contraste de los factores con el T₀ o testigo, encontrando

similitudes al tratamiento control en cuanto a la longitud radicular de la planta de *T. cacao*.

La aplicación de biocarbón solo registró efectos estadísticos significativos en la variable peso fresco de la planta y no en el peso seco. Resultados similares fueron descritos por Herrera et al. (2018) y Olmo (2016), al encontrar efectos en el incremento de masa fresca pero no en el incremento de masa seca del *Capparis scabrida* (zapote), además se logró determinar diferencias significativas respecto a la dosis del biocarbón, encontrándose que el tratamiento con una dosis de 15% de biocarbón fue mejor que el testigo y que los tratamientos que contenían 30% de biocarbón. La concentración de cadmio en plantas de *T. cacao* demuestra que existe diferencia significativa en el uso de diferentes tipos de biomasa, siendo mayor los efectos en el biocarbón de la cascara de *T. cacao*. Al respecto estos efectos se relacionan con las características físicas y químicas del biocarbón, que dependen principalmente de las condiciones en las que son obtenidos y del tipo de materia prima; que son determinantes en la adsorción y retención de iones (Balta, 2019).

Park et al. (2011) y Romero (2017) demostraron que el biocarbón derivado de residuos verdes es eficaz para inmovilizar Cd a mayor dosis de aplicación, obteniendo un 67,2 % de reducción en la acumulación de Cd una dosis del 15% de biocarbón en brotes de *Brassica juncea* (mostaza india). Estos resultados son similares a al presente estudio, al presentarse diferencias significativas en el contenido de Cd en plantas de *T. cacao* en cuanto a mayores dosis de aplicación de biocarbón.

Puga et al. (2015) demuestran que el biocarbón provocó una reducción lineal de los metales pesados disponibles en suelo, que correspondió una

disminución del 54% en Cd a dosis de 5%, debido a la retención de metales en la superficie del biocarbón.

Cui et al. (2011) en su estudio de aplicación de biocarbón a partir de paja de trigo en suelos con altas concentraciones de Cd, observó una reducción del 40% de este elemento. En el presente estudio la aplicación de biocarbón no presentó efectos diferentes en la inmovilización de cadmio con respecto a los diferentes tipos de biomasa, pero hubo efectos significativos para la proporción de 8% de biocarbón, obteniendo una eficiencia de inmovilización de 88,22%.

CONCLUSIONES

La aplicación de biocarbón influye favorablemente en el número de hojas, diámetro de tallo y peso fresco, el biocarbón de la cascarilla de *C. arabica* y *O. sativa*, que independientemente de la proporción agregada obtuvo un mejor desarrollo de la planta de *T. cacao*.

La aplicación de biocarbón al suelo disminuyó el contenido de Cd en las plantas de *T. cacao*, siendo el biocarbón derivado de la cascarilla de *T. cacao* en proporciones de 6%, 8% y 10% significativos en la disminución del contenido de Cd en la planta.

El biocarbón tiene el potencial de afectar significativamente el comportamiento del Cd en el suelo. La mayor eficiencia de inmovilización de cadmio en el suelo fue de 88.22 % en la combinación del biocarbón de la cascarilla de *O. sativa* a una dosis de 8,0%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Al-Wabel, M., Usman, A., El-Naggar, A., Aly, A., Ibrahim, H., Elmagrahraby, S., Al-Omran, A. (2015). Conocarpus biocarbón as a soil amendment for reducing heavy metal availability and uptake by maize plants. Saudi J Biol Sci, Arabia Saudita, 22(4), 503-511.
- [2] ASTM. (1984). Standard D1762-84; Standard Test Method for Chemical Analysis of Wood Charcoal.
<https://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/D176284R95E.1.htm>
- [3] Avenza, D. (2012). Evaluación de efectos de varios tipos de biochar en suelo y planta. Lic. Ciencias ambientales. Universidad de Barcelona.
- [4] Balta, R. (2019). El carbón activado y el biocarbón en la asimilación del cadmio por el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo el invernadero. Tesis MSc Suelos. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 123 p.
- [5] Barrueta, S. (2013). Guía de métodos de detección y análisis de cadmio en cacao *Theobroma cacao* L.: SlideShare.
<https://es.slideshare.net/RIICCHPeru/guia-de-metodos-de-deteccion-y-analisis-de-cadmio-en-cacao>
- [6] Belalcazar, S. (2013). Evaluación del biocarbón derivado de cascarilla de *O. sativa* como potenciador del establecimiento y proliferación de bacterias en suelos no perturbados. [Tesis Biología. Santiago de Cali, Colombia. Universidad ICESI]. 59 p.
- [7] Calzada, J. (1970). Métodos estadísticos para la investigación. Lima, Perú. 643 p.

- [8] Carter, S., Shackley, S., Sohi, S., Suy, T.B., Haefele, S. (2013). The Impact of Biochar Application on Soil Properties and Plant Growth of Pot Grown Lettuce (*Lactuca sativa*) and Cabbage (*Brassica chinensis*). *Agron J.*, Switzerland, 3(2), 404-418.
- [9] Condeña, E. (2017). Recuperación de suelos contaminados con plomo mediante el uso de biocarbón de bagazo de caña de azúcar en el parque Chota del AA.HH Ramón Castilla – Callao 2017. [Tesis Ing. Ambiental. Lima, Peru. Universidad Cesar Vallejo]. 90 p.
- [10] Cui, H. J., Wang, M.K., Fu, M. L., Ci, E. (2011). Enhancing phosphorus availability in phosphorus-fertilized zones by reducing phosphate adsorbed on ferrihydrite using rice strawderived biochar. *J. Soils Sediments*, Germany, 11(7), 1135–1141.
- [11] De La Cruz, L. (2018). Eficiencia del biocarbón a partir de residuos de poda para inmovilizar plomo en el suelo a nivel laboratorio UCV, 2018. [Tesis Ing. Ambiental. Lima, Perú. Universidad Cesar Vallejo].
- [12] Diaz, L. (2017). Remediación de suelos alterados por actividad de minería del carbón a cielo abierto, mediante aplicación de biocarbón procedente de residuos biomásicos de la palma de aceite en la zona carbonifera del departamento del Cesar. [Tesis Doc. Ingeniería énfasis ambiental. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia].
- [13] Herrera, E., Feijoo, C., Alfaro, R., Solis, J., Gomez, M., Keiski, R., Cruz, G. (2018). Producción de biocarbón a partir de biomasa residual y su uso en la germinación y crecimiento en vivero de *Capparis scabrida* (Sapote). *Sci. Agropecu.*, Trujillo, 9(4), 569-577.
- [14] Holdridge, L. (1978). *Ecología basada en zonas de vida*. San José, Costa Rica, IICA. 216 p.
- [15] IBI (International Biochar Initiative). (2013). Standardized Product Definition and Product Testing Guidelines for Biochar That Is Used in Soil. IBI. <https://biochar-international.org/characterizationstandard>
- [16] Kookana, R.S., Sarmah, A.K., Van Zwieten, L., Krull, E., Singh B. (2011). Biochar application to soil: Agronomic and environmental benefits and unintended consequences. *Adv. Agron.*, San Diego, CA, 112, 103-143.
- [17] Lehmann, J., Joseph, S. (2009). *Biochar for Environmental Management: science and technology*. Eartscan.
- [18] Lehmann J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D. (2011). Biochar effects on soil biota- a review". *Soil Biol. Biochem*, United Kingdom, 43, 1812-1836.
- [19] Li, H., Liu, Y., Chen, Y., Wang, S., Wang, M., Xie, T., Wang, G. (2016). Biochar amendment immobilizes lead in rice paddy soils and reduces its phytoavailability: NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27530495>
- [20] MINAM (Ministerio del Ambiente). (2014). Guía para el muestreo de suelo. MINAM, http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/04/GUIA-MUESTREO-SUELO_MINAM1.pdf
- [21] Olmo, M. (2016). Efectos del biochar sobre el suelo, las características de la raíz y la

- producción vegetal. [Tesis Dr. Córdoba, España. Universidad de Cordoba].
- [22] Park, J.H., Choppala, G.K., Bolan, N.S. & Chung, J.W. (2011). Biochar reduces the bioavailability and phytotoxicity of heavy metals. *Plant Soil, Netherlands*, 348(1), 439-451.
- [23] Powlson, D.S., Gregory, P.J., Whalley, W.R., Quinton, J.N., Hopkins, D.W., Whitmore, A.P., Hirsch, P.R., Goulding, K.W. (2011). Soil management in relation to sustainable agriculture and ecosystem services. *Food Policy*, 36(1), S72-S87.
- [24] Puga, A. P., Abreu, C. A., Melo, L. C., Beesley, L. (2015). Biochar application to a contaminated soil reduces the availability and plant uptake of zinc, lead and cadmium. *J. Environ. Manage, United States*, 159(1), 86-93.
- [25] Rodriguez, A. (2005). Metodología de la investigación. Scribd, <https://es.scribd.com/document/311168172/METODOLOGÍA-DE-LAINVESTIGACION-ERNESTO-A-RODRIGUEZ-MOGUEL-pdf>
- [26] Romero, J. (2017). Eficiencia en la Inmovilización de Plomo en el Suelo Mediante la Aplicación de Cantidades de Biocarbón en el Distrito San Mateo, Lima. [Tesis Ing. Ambiental, Universidad Cesar Vallejo].
- [27] Tamayo, C., Muñoz, M. (2020). Estudio de biochar obtenido a partir de cáscara de cacao, como mejorador del suelo en un cultivo de frejol (*Phaseolus vulgaris*) [Tesis Ing. Química, Universidad Central de Ecuador].
- [28] Thomas, G. (1996). *Methods of soil analysis; Chemical Methods*. United States of América, Madison, Wis.