

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Impact of fertilizers and pesticides on soil and water quality

Impacto de fertilizantes y pesticidas en la calidad del suelo y el agua



Memoria de tesis doctoral presentada por:

Borja Muñoz Leoz

Para optar al grado de Doctor en:

Ingeniería Química

Bilbao, 2012



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Borja Muñoz Leoz

Presenta la siguiente memoria de tesis para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química por la Universidad del País Vasco (UPV-EHU):

Impact of fertilizers and pesticides on soil and water quality

Impacto de fertilizantes y pesticidas en la calidad del suelo y el agua

Directores:

Dra: **Estilita Ruiz Romera**

Investigadora en contaminación de recursos hídricos

Departamento de Ingeniería Química y del Medio ambiente (UPV-EHU)

Dr: **Carlos Garbisu Crespo**

Investigador en ecología microbiana

Departamento de Ecología y Recursos Naturales (Neiker-Tecnalia)

Universidad del País Vasco (UPV-EHU)
Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Bilbao
Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente

Imágenes de portada tomadas de:

[Naturalproductsonline](#)

[Humansarehealthy](#)

[Oscarazo.blogspot](#)

[Traxco](#)

[Versoscalados.blogspot](#)

A Marian, Luis, Clara y Marta, por estar ahí.

“No se lo que pareceré a los ojos del mundo, pero a los míos es como si hubiese sido un muchacho que juega en la orilla del mar y se divierte de tanto en tanto encontrando un guijarro más pulido o una concha más hermosa, mientras el inmenso océano de la verdad se extendía, inexplorado frente a mí”

Isaac Newton (1642-1727)

RESUMEN

La modernización e intensificación de la agricultura han permitido aumentar los rendimientos de producción al ritmo que demanda una población en constante crecimiento. Sin embargo, este hecho ha llevado asociado una serie de impactos adversos en el medio ambiente que pueden llegar a comprometer la sostenibilidad de la agricultura en el futuro. En este sentido, a la degradación de la calidad de las aguas asociada al uso/abuso de fertilizantes y pesticidas, hay que añadir los impactos que dichos compuestos pueden ocasionar en la calidad del suelo, la cual viene determinada en buena parte por el estado de las comunidades microbianas edáficas que regulan muchos de los procesos que tiene lugar en el ecosistema suelo.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar, a escala de laboratorio, los posibles impactos que algunos fertilizantes y pesticidas empleados en la Zona Vulnerable de Vitoria-Gasteiz tienen sobre la calidad del suelo y el agua en dicha zona.

Como se ha podido constatar, a pesar de la aprobación del código de buenas prácticas agrícolas, hoy en día siguen lixiviándose cantidades significativas de nitratos y pesticidas (*e.g.*, etofumesato y difenoconazol) a las aguas de la Zona Vulnerable, durante un cultivo característico de la zona de estudio como es el de remolacha azucarera (*Beta vulgaris L.*).

Adicionalmente, se ha comprobado que el alto contenido en nitratos de las aguas subterráneas en la Zona Vulnerable es mitigado, al menos en parte, por la acción de la actividad microbiana desnitrificante que alberga la zona riparia del humedal de Salburua. Dicho proceso, sin embargo, supone la emisión a la atmósfera de importantes cantidades de gases de efecto invernadero (CO_2 y N_2O), y puede verse afectado negativamente por la presencia de pesticidas (*e.g.*, deltametrina) en el medio.

Por otra parte, hemos observado que diversos pesticidas (deltametrina, etofumesato, difenoconazol) aplicados en concentraciones similares a las dosis de aplicación en campo inducen cambios, de carácter limitado y transitorio, en las comunidades microbianas edáficas, siendo más significativos en el caso del fungicida difenoconazol. El efecto de los pesticidas fue más acusado a medida que aumentaba su concentración en el medio.

Finalmente, encontramos que la aplicación de abonos orgánicos (avicompost), en lugar de los fertilizantes sintéticos tradicionales (NPK), además de mejorar la degradación de los pesticidas y disminuir el impacto de éstos sobre la calidad del suelo, podría ayudar a reducir las pérdidas de nitratos por lixiviación.

ABSTRACT

Modernization and intensification of agriculture have managed to increase crop yields at the rate demanded by a growing world population. Nevertheless, this fact has resulted in a variety of adverse impacts on the environment, which can put the future sustainability of agriculture at risk. In this respect, apart from the degradation of water quality due to the use/abuse of fertilizers and pesticides, the impact of these compounds on soil quality must be considered. Such impact depends, to a great extent, on the status of the soil microbial communities, since they are responsible for many of the processes that take place in the soil ecosystem.

The main objective of this work was to study, under laboratory conditions, the potential impact of some of the fertilizers and pesticides currently used in the Vulnerable Zone of Vitoria-Gasteiz on its soil and water quality.

During a study of a characteristic crop in such area (sugar beet, *Beta vulgaris* L.), we found that, despite the implementation of a Code of Good Agricultural Practices in the Vulnerable Zone, significant amounts of nitrates and pesticides (*e.g.*, ethofumesate and difenoconazole) are still being leached.

Additionally, we observed that the excess of nitrate present in groundwater from the Vulnerable Zone is mitigated, at least partially, by denitrifying microbial activity in the riparian zone of the Salburua wetland. This process, however, involves the emissions of great amounts of greenhouse gases (CO₂ and N₂O) and might be negatively affected by pesticide presence (*e.g.*, deltamethrin).

Furthermore, different pesticides (deltamethrin, ethofumesate, difenoconazole) applied to soil samples at field application rates led to changes, of limited and temporary character, on soil microbial communities, which were more pronounced for

the fungicide difenoconazole. Pesticide effects were more accused as their concentration in soil increased.

Finally, organic amendments (avicompost), as opposed to conventional synthetic fertilizers (NPK), enhanced pesticide degradation and mitigated their impact on soil quality. The application of organic amendments might help reduce nitrate losses by leaching.

RÉSUMÉ

La modernisation et l'intensification de l'agriculture a permis augmenter les rendements au rythme demandé par une population en constante croissance. Cependant, ce fait a été associé à une série d'impacts négatifs sur l'environnement qui peuvent compromettre la durabilité de l'agriculture dans l'avenir. À cet égard, à la dégradation de la qualité de l'eau associée à l'utilisation / l'abus d'engrais et de pesticides, il faut ajouter les impacts que ces composés peuvent avoir sur la qualité des sols, la-quelle est largement déterminée par l'état des communautés microbiennes du sol qui régulent de nombreux processus qui se déroulent dans l'écosystème souterrain.

L'objectif principal de ce travail était d'étudier en laboratoire les impacts potentiels que certains engrais et pesticides utilisés dans la Zone Vulnérable à Vitoria-Gasteiz ont sur la qualité des sols et de l'eau de cette région.

Nous avons constaté que, malgré l'adoption d'un code de bonnes pratiques agricoles, d'importantes quantités de nitrates et de pesticides (*e.g.* éthofumesate et difénoconazole) sont encore lixiviés dans les eaux de la Zone Vulnérable, au cours d'une culture caractéristique dans la zone d'étude, la betterave sucrière (*Beta vulgaris L.*).

En outre, nous avons vérifié que la forte teneur en nitrate des eaux souterraines de la Zone Vulnérable diminué, a cause de l'activité microbienne dénitrifiante qui abrite la zone riparienne de la zone humide de Salburua. Ce processus, cependant, provoque l'émission dans l'atmosphère de grandes quantités de gaz à effet de serre (CO₂ et N₂O), et peut être affecté par la présence de pesticides (*e.g.* la deltaméthrine) dans le milieu.

D'autre part, nous avons observé que divers pesticides (deltaméthrine, éthofumesate, difénoconazole) appliqués à des concentrations similaires à des taux d'application sur le terrain induisent des changements, d'un caractère limité et temporaire, dans les communautés microbiennes du sol, les plus importants étant observés avec le difénoconazole. L'effet des pesticides a été plus prononcé avec une concentration croissante dans le milieu.

Enfin, nous avons constaté que l'application d'un engrais organique (avicompost), au lieu des traditionnels engrais synthétiques (NPK), en plus d'améliorer la dégradation de pesticides et de réduire leur impact sur la qualité des sols, pourrait contribuer à réduire les pertes de nitrate par lessivage.

0

- 0.1. Index
- 0.2. List of figures
- 0.3. List of tables
- 0.4. List of abbreviations

Table of contents

*“El amor como principio, el orden como
base, el progreso como fin”*

Auguste Comte (1798-1857)

0.1. Index

0. TABLE OF CONTENTS	xi
0.1. Index	xiii
0.2. List of figures	xix
0.3. List of tables	xxii
0.3. List of abbreviations	xxiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La agricultura intensiva	3
1.1.1. Perspectiva histórica.....	3
1.1.2. Binomio agricultura-medio ambiente.....	4
1.1.3. Impactos de la agricultura en el medio ambiente.....	5
1.1.4. Impacto de la agricultura sobre la calidad de las aguas.....	8
1.1.5. Retos futuros.....	11
1.2. Fertilizantes agrícolas y medio ambiente	12
1.2.1. El nitrógeno en la agricultura.....	12
1.2.2. Fertilizantes nitrogenados.....	13
1.2.3. El nitrógeno en los agroecosistemas.....	14
1.2.3.1. Entradas de nitrógeno en los agroecosistemas.....	15
1.2.3.2. Transformaciones del nitrógeno en los agroecosistemas.....	16
1.2.3.3. Salidas del nitrógeno de los agroecosistemas.....	18
1.2.4. Problemas asociados a la contaminación por nitratos.....	21
1.2.4.1. Nitrato en las aguas para consumo humano.....	22
1.2.4.2. Eutrofización de masas de agua.....	23
1.3. Pesticidas agrícolas y medio ambiente	24
1.3.1. Los pesticidas en la agricultura.....	25
1.3.2. Tipos de pesticidas agrícolas.....	27
1.3.2.1. Herbicidas.....	27
1.3.2.2. Insecticidas.....	29
1.3.2.3. Fungicidas.....	30
1.3.3. Comportamiento de los pesticidas en los agroecosistemas.....	32
1.3.3.1. Interacción pesticida-suelo.....	33
1.3.3.2. Degradación de pesticidas en el suelo.....	34
1.3.3.3. Pérdidas de pesticidas en el suelo.....	37
1.3.4. Aditivos presentes en los pesticidas comerciales.....	38
1.3.5. Problemas de la contaminación por pesticidas.....	39
1.3.5.1. Resistencia o resurgencia.....	40
1.3.5.2. Toxicidad en el ser humano.....	41
1.3.5.3. Toxicidad en organismos-no-diana.....	42
1.4. La importancia del recurso suelo en la agricultura	43
1.4.1. El suelo: definición y funciones.....	43

1.4.2. Calidad del suelo.....	46
1.4.2.1. <i>Indicadores físicos</i>	48
1.4.2.2. <i>Indicadores químicos</i>	48
1.4.2.3. <i>Indicadores biológicos</i>	49
1.4.3. Impacto de la agricultura en la calidad del suelo.....	53
1.5. Las zonas húmedas frente a la contaminación agrícola	56
1.5.1. Definición.....	57
1.5.2. Funciones de los humedales.....	58
1.5.3. Capacidad depuradora de los humedales.....	60
1.5.3.1. <i>Factores hidrogeológicos</i>	60
1.5.3.2. <i>Factores físico-químicos</i>	61
1.5.3.3. <i>Factores biológicos</i>	61
1.5.4. Degradación de los humedales.....	62
1.6. Referencias	64
2. ZONA DE ESTUDIO	73
2.1. El acuífero cuaternario de Vitoria-Gasteiz	75
2.1.1. Descripción.....	76
2.1.2. Transformaciones antrópicas del acuífero.....	77
2.1.2.1. <i>Recarga del acuífero</i>	77
2.1.2.2. <i>Usos del suelo</i>	78
2.1.3. Impactos sobre la calidad de las aguas del acuífero.....	78
2.1.3.1. <i>Presencia de NO₃⁻</i>	78
2.1.3.2. <i>Presencia de pesticidas</i>	80
2.1.4. Declaración de Zona Vulnerable a la contaminación por nitratos.....	82
2.2. El humedal de Salburua	84
2.2.1. Antecedentes del humedal.....	86
2.2.2. Atenuación natural de nitratos.....	86
2.2.3. Atenuación natural de pesticidas.....	87
2.3. Referencias	87
3. OBJETIVOS	89
3.1. Objetivo general	91
3.2. Objetivos específicos	92
3. OBJECTIVES	94
3.1. General objective	94
3.2. Specific objectives	95
3. OBJECTIFS	97
3.1. Objectif général	97
3.2. Objectifs spécifiques	98
4. MATERIALES Y MÉTODOS	101
4.1. Descripción de los ensayos	103
4.1.1. Ensayo 1: Modelización del transporte de nitratos y pesticidas en una parcela agrícola de la Zona Vulnerable.....	103
4.1.2. Ensayo 2: Simulación a escala de laboratorio de la atenuación natural de nitratos en el suelo del humedal de Salburua.....	106

4.1.3. Ensayo 3: efecto de la deltametrina sobre la desnitrificación en Salburua.....	108
4.1.4. Ensayo 4: validación de parámetros microbianos con potencial bioindicador de la calidad del suelo.....	110
4.1.5. Ensayo 5: efecto de pesticidas y fertilizantes sobre la calidad del suelo.....	112
4.1.6. Ensayo 6: efecto de la concentración de los pesticidas sobre la calidad del suelo.....	113
4.2. Compuestos agroquímicos utilizados.....	113
4.2.1. Fertilizantes.....	113
4.2.1.1. Avicompost.....	113
4.2.1.2. NPK.....	114
4.2.2. Pesticidas.....	115
4.2.2.1. Difenoconazol.....	115
4.2.2.2. Deltametrina.....	116
4.2.2.3. Etofumesato.....	117
4.3. Métodos analíticos.....	118
4.3.1. Parámetros físico-químicos.....	118
4.3.2. Parámetros microbiológicos.....	119
4.3.2.1. Bioindicadores de carácter general.....	119
4.3.2.2. Bioindicadores de los principales ciclos de nutrientes.....	120
4.3.2.3. Bioindicadores específicos del ciclo del nitrógeno.....	121
4.3.2.4. Bioindicadores de biodiversidad funcional.....	123
4.3.3. Cuantificación analítica de los pesticidas.....	125
4.4. Modelo LEACHM.....	126
4.4.1. Descripción general.....	126
4.4.2. Datos de entrada al modelo.....	127
4.4.3. Limitaciones del modelo.....	128
4.5. Problemas experimentales.....	128
4.5.1. Lixiviación de fertilizantes y pesticidas en columnas de suelo.....	128
4.5.2. Medida del carbono de la biomasa microbiana.....	129
4.6. Referencias.....	130
5. MODELIZATION OF ENVIRONMENTAL FATE AND TRANSPORT OF NITRATES AND PESTICIDES IN AN AGRICULTURAL SOIL BY LEACHN AND LEACHP MODELS.....	133
5.1. Abstract.....	135
5.2. Introduction.....	136
5.3. Materials and methods.....	137
5.3.1. Study area.....	137
5.3.2. Experimental data.....	139
5.3.3. Chemical analyses.....	141
5.3.4. Model description.....	141
5.3.5. Model evaluation.....	144
5.4. Results and discussion.....	145
5.4.1. Model calibration.....	145

5.4.2. NO ₃ ⁻ dynamic simulation.....	145
5.4.3. Drainage simulation.....	148
5.4.4. LEACHN evaluation.....	149
5.4.5. Pesticide dynamic simulation.....	149
5.4.5.1. <i>Herbicides</i>	149
5.4.5.2. <i>Insecticides</i>	154
5.4.5.3. <i>Fungicides</i>	155
5.4.6. LEACHP evaluation.....	157
5.5. Conclusions	158
5.6. References	159
6. NITROGEN TRANSFORMATIONS AND GREENHOUSE GAS EMISSIONS FROM A RIPARIAN WETLAND SOIL: AN UNDISTURBED SOIL COLUMN STUDY	163
6.1. Abstract	165
6.2. Introduction	166
6.3. Materials and methods	168
6.3.1. Study site.....	168
6.3.2. Undisturbed soil column design.....	169
6.3.3. Leachates analysis.....	171
6.3.4. CO ₂ and N ₂ O emissions.....	172
6.3.5. Statistical analysis.....	172
6.4. Results and discussion	172
6.4.1. Nitrate removal.....	172
6.4.2. Effect of temperature and C _{org} on denitrification.....	178
6.4.3. Application to Salburua wetland.....	180
6.5. Conclusions	181
6.6. References	182
7. DELTAMETHRIN DEGRADATION AND SOIL MICROBIAL ACTIVITY IN A RIPARIAN WETLAND SOIL	187
7.1. Abstract	189
7.2. Introduction	190
7.3. Materials and methods	192
7.3.1. Soil characterization and experimental design.....	192
7.3.2. Soil microbial parameters.....	194
7.3.3. Statistical analysis.....	196
7.4. Results and discussion	196
7.4.1. Deltamethrin degradation.....	196
7.4.2. Microbial basal respiration.....	200
7.4.3. Denitrification.....	204
7.4.4. Methanogenesis.....	206
7.5. Conclusions	208
7.6. References	209
8. TEBUCONAZOLE APPLICATION DECREASES SOIL MICROBIAL BIOMASS AND ACTIVITY	215
8.1. Abstract	217

8.2. Introduction	218
8.3. Materials and methods	219
8.3.1. Soil characterization.....	219
8.3.2. Experimental design.....	220
8.3.3. Soil microbial parameters.....	220
8.3.4. Tebuconazole concentration.....	222
8.3.5. Statistical analysis.....	222
8.4. Results	223
8.4.1. Tebuconazole degradation.....	223
8.4.2. Tebuconazole impact on soil microbial biomass and activity.....	224
8.4.3. Tebuconazole impact on soil microbial diversity.....	230
8.4.4. Relevant relationships between parameters.....	231
8.5. Discussion	233
8.6. Conclusions	237
8.7. References	237
9. FERTILIZATION CAN MODIFY THE NON-TARGET EFFECTS OF PESTICIDES ON SOIL MICROBIAL COMMUNITIES	241
9.1. Abstract	243
9.2. Introduction	244
9.3. Materials and methods	245
9.3.1. Experimental design.....	245
9.3.2. Soil microbial properties and pesticide concentration.....	247
9.3.3. Data analyses.....	249
9.4. Results	250
9.4.1. Pesticide degradation in soil.....	250
9.4.2. Effects of pesticides and fertilizers on soil microbial activity.....	251
9.4.3. Effects of pesticides and fertilizers on potentially mineralizable nitrogen.....	252
9.4.4. Effects of pesticides and fertilizers on soil inorganic nitrogen.....	255
9.4.5. Effects of pesticides and fertilizers on denitrification potential.....	257
9.4.6. Effects of pesticides and fertilizers on soil quality.....	257
9.4.7. Relevant correlations between parameters.....	258
9.5. Discussion	261
9.6. Conclusions	267
9.7. References	267
10. NON-TARGET EFFECTS OF THREE PESTICIDES ON MICROBIALLY-MEDIATED PROCESSES IN A CLAY-LOAM SOIL	273
10.1. Abstract	275
10.2. Introduction	276
10.3. Materials and methods	277
10.3.1. Soil characterization.....	277
10.3.2. Pesticide application.....	278
10.3.3. Experimental design.....	278
10.3.4. Soil microbial parameters.....	279
10.3.5. Diversity of microbial communities.....	280

10.3.6. Pesticide concentration.....	281
10.3.7. Data analyses.....	281
10.4. Results.....	282
10.4.1. Pesticide dissipation in soil.....	282
10.4.2. Pesticide impact on soil microbial parameters.....	284
10.4.3. Relationships between soil microbial parameters.....	291
10.5. Discussion.....	293
10.6. Conclusions.....	297
10.7. References.....	298
11. SÍNTESIS FINAL.....	305
11.1. Síntesis final.....	307
11.2. Recomendaciones.....	315
11.3. Referencias.....	318
12. CONCLUSIONES.....	321
12. CONCLUSIONS.....	326
12. CONCLUSIONS.....	329
13. APPENDIX.....	333
13.1. Articles.....	335
13.2. Contributions to congresses.....	336
14. AGRADECIMIENTOS.....	339

0.2. List of figures

Figura 1.1.	Evolución de la población mundial y de la producción de cereal.....	4
Figura 1.2.	Utilización mundial del agua por sectores. Por utilización de los embalses se entiende la evaporación presente en ellos.....	9
Figura 1.3.	Jerarquía de la complejidad de los problemas relacionados con contaminantes difusos de origen agrícola.....	10
Figura 1.4.	Evolución del consumo mundial de fertilizantes en el periodo 1960-2001.....	14
Figura 1.5.	Ciclo del nitrógeno y su influencia en los recursos hídricos.....	15
Figura 1.6.	Distribución mundial de las aguas con altos contenidos en NO_3^-	22
Figura 1.7.	Ecosistema acuático con evidentes síntomas de eutrofización.....	23
Figura 1.8.	La amapola, ejemplo de mala hierba en el cultivo de trigo.....	28
Figura 1.9.	El taladro, un ejemplo de insecto dañino para el cultivo de maíz.....	29
Figura 1.10.	Presencia del hongo Mildiu en cultivo de vid.....	30
Figura 1.11.	Procesos que determinan la persistencia de los pesticidas en el medio.....	32
Figura 1.12.	Principales núcleos de población afectada por pesticidas de origen agrícola.....	41
Figura 1.13.	Formación y composición de un suelo natural.....	44
Figura 1.14.	Importancia del reciclaje de nutrientes en la cadena trófica.....	46
Figura 1.15.	Distribución de los suelos degradados en el mundo.....	54
Figura 1.16.	Relación entre calidad del suelo y agricultura.....	56
Figura 1.17.	Zonas húmedas de bosques de ribera bordeando zonas agrícolas.....	57
Figura 1.18.	Diagrama de las principales funciones de un humedal.....	59
Figura 1.19.	Humedal drenado con fines agrícolas.....	63
Figura 2.1.	Localización geográfica del Acuífero Cuaternario y de la Zona Vulnerable.....	76
Figura 2.2.	Evolución temporal del contenido en nitratos (mg L^{-1}) en un pozo del sector oriental del acuífero (Pozo Arkaute) y a la salida del río alegría desde 1990 hasta 2005.....	79
Figura 2.3.	Distribución de los puntos de muestreo de la Red de Control de Plaguicidas del Gobierno Vasco.....	81
Figura 2.4.	Localización de las Balsas de Zurbano (Arkaute + Larregana) y Betoño.....	85
Figura 4.1.	Localización de la parcela de Gauna y el humedal de Salburua en la Zona Vulnerable.....	104
Figura 4.2.	Localización de la parcela experimental en el municipio de Gauna.....	105

Figura 4.3.	Localización, extracción y montaje final de las columnas inalteradas de lixiviación.....	106
Figura 4.4.	Esquema de montaje de las columnas de lixiviación.....	108
Figura 4.5.	Proceso de toma de muestras de suelo y su posterior tratamiento.....	109
Figura 4.6.	Incubación de las muestras de suelo en bandejas.....	111
Figura 4.7.	Pesticidas y fertilizantes usados en los presentes ensayos.....	114
Figura 4.8.	Estructura molecular del difenoconazol.....	115
Figura 4.9.	Estructura molecular de la deltametrina.....	116
Figura 4.10.	Estructura molecular del etofumesato.....	117
Figure 5.1.	Evolution of daily NO_3^- content in groundwater simulated by LEACHN at 90 cm against NO_3^- content in groundwater measured in GAU-1.....	146
Figure 5.2.	Evolution of daily drainage events simulated by LEACHN at 90 cm against hourly measured piezometric level.....	148
Figure 5.3.	Evolution of daily chloridazone, ethofumesate and phenmedipham concentration in upper 1 cm of soil simulated by LEACHP.....	150
Figure 5.4.	Evolution of daily desmedipham and metamitron content in upper 1 cm of soil simulated by LEACHP.....	151
Figure 5.5.	Evolution of daily ethofumesate concentration in groundwater simulated by LEACHP at 90 cm against ethofumesate concentration in groundwater measured in GAU-1.....	153
Figure 5.6.	Evolution of daily deltamethrin and pirimicarb concentration in upper 1 cm of soil simulated by LEACHP.....	155
Figure 5.7.	Evolution of daily difenoconazole and epoxiconazole concentration in upper 1 cm of soil simulated by LEACHP.....	156
Figure 6.1.	Design of leaching assay with undisturbed soil columns.....	171
Figure 6.2.	Evolution of NO_3^- removal rate, and leaching rates of NH_4^+ and DOC in the horizon leachates throughout the assay.....	174
Figure 6.3.	Cumulative production of CO_2 and N_2O throughout the leaching assay.....	176
Figure 6.4.	Effect of soil horizon on average rates of NO_3^- removal and CO_2 and N_2O emission rates.....	178
Figure 7.1.	Deltamethrin degradation curves: (A) aerobic without nitrate; (B) aerobic with nitrate; (C) anaerobic without nitrate; and (D) anaerobic with nitrate.....	197
Figure 8.1.	Dynamics of tebuconazole degradation in soil (tebuconazole concentration at a given sampling time is expressed as % of initial tebuconazole concentration).....	223
Figure 8.2.	Effect of tebuconazole on soil microbial biomass C, basal respiration, and substrate-induced respiration.....	225
Figure 8.3.	Effect of tebuconazole on metabolic ($q\text{CO}_2$) and respiratory (Q_R) quotients.....	227
Figure 8.4.	Effect of tebuconazole on soil N-NH_4^+ and N-NO_3^- concentration.....	228

Figure 9.1.	Pesticide (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) concentration in non-fertilized (NF), NPK-fertilized (NPK) and compost-fertilized (Compost) soils.....	251
Figure 9.2.	Values of (A) dehydrogenase activity and (B) the respiratory quotient (Q_R) in pesticide-free (control) and pesticide-treated soils under different fertilization treatments.....	253
Figure 9.3.	Values of (A) potentially mineralizable nitrogen (N_{min}) and (B) N-NH ₄ ⁺ concentration in pesticide-free (control) and pesticide-treated soils under different fertilization treatments.....	254
Figure 9.4.	Values of (A) N-NO ₃ ⁻ concentration and (B) denitrification potential in pesticide-free (control) and pesticide-treated soils under different fertilization treatments.....	256
Figure 9.5.	Principal component analysis based on correlations between soil microbial parameters and PC1 and PC2, at each incubation time (7, 30, 60 and 90 days).....	261
Figure 10.1.	Pesticide (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) concentration in soil throughout the experiment.....	283
Figure 10.2.	Effect of pesticides (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) at 5, 50 and 500 mg kg ⁻¹ DW soil on (A) dehydrogenase activity and (B) the respiratory quotient.....	286
Figure 10.3.	Effect of pesticides (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) at 5, 50 and 500 mg kg ⁻¹ DW soil on potentially mineralizable nitrogen (N_{min}) (A) and soil N-NH ₄ ⁺ concentration (B).....	288
Figure 10.4.	Effect of pesticides (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) at 5, 50 and 500 mg kg ⁻¹ DW soil on soil N-NO ₃ ⁻ concentration (A) and denitrification potential (B).....	289
Figure 10.5.	Effect of pesticides (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) at 5, 50 and 500 mg kg ⁻¹ DW soil on Shannon's index of ammonium-oxidizing bacteria diversity (H').....	290
Figure 10.6.	Principal component analysis based on correlations between soil microbial properties and PC2 and PC3, at the three pesticide concentrations studied here (5, 50 and 500 mg kg ⁻¹ DW soil).....	293

0.3. List of tables

Tabla 1.1.	Principales gases de efecto invernadero generados por la agricultura.....	8
Tabla 1.2.	Distribución del mercado mundial de pesticidas con respecto a la demanda geográfica y la cuota de mercado de cada pesticida.....	26
Tabla 2.1.	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) de los pesticidas encontrados en las aguas subterráneas de la Zona Vulnerable.....	82
Tabla 4.1.	Composición físico-química del compost.....	114
Table 5.1.	Main characteristics of the soils at Gauna.....	139
Table 5.2.	Pesticide application rates during sugar beet growing season.....	140
Table 5.3.	Common input parameter for LEACHN and LEACHP models.....	143
Table 5.4.	Specific input parameters for LEACHN model.....	143
Table 5.5.	Physical-chemical properties of pesticides simulated with LEACHP model.....	144
Table 5.6.	Nitrate content in soil profiles simulated by LEACHN and measured at two sampling times.....	147
Table 5.7.	Pesticide content in soil profiles simulated by LEACHP and measured at two sampling times.....	152
Table 6.1.	Physical-chemical properties of the soil.....	170
Table 6.2.	Increase (positive value) or decrease (negative value) in soil chemical properties at the end of the leaching assay.....	175
Table 6.3.	Linear correlation coefficients (r) between rates of NO_3^- removal, and CO_2 and N_2O emission.....	177
Table 7.1.	Physicochemical properties of the soil.....	193
Table 7.2.	Pesticide active ingredients analysed in the soil.....	194
Table 7.3.	Kinetic parameters of deltamethrin degradation, in the absence and presence of nitrate, under both aerobic and anaerobic conditions.....	198
Table 7.4.	Effect of deltamethrin concentration on the rates of soil microbial basal respiration (units: $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$) under aerobic conditions, in the absence and presence of nitrate.....	201
Table 7.5.	Effect of deltamethrin concentration on the rates of soil microbial basal respiration (units: $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$) under anaerobic conditions, in the absence and presence of nitrate.....	202
Table 7.6.	Effect of deltamethrin concentration on the rates of denitrification (units: $\text{mg N}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$) under anaerobic conditions, in the absence and presence of nitrate.....	204

Table 7.7.	Effect of deltamethrin concentration on the rates of methanogenesis (units: mg CH ₄ kg ⁻¹ DW soil day ⁻¹) under anaerobic conditions, in the absence of nitrate.....	207
Table 8.1.	Kinetic parameters of tebuconazole degradation in soil at three different initial concentrations: 5, 50 and 500 mg tebuconazole kg ⁻¹ DW soil (T5, T50 and T500, respectively).....	224
Table 8.2.	Two-way ANOVA for soil microbial properties as affected by tebuconazole concentration (C), incubation time (T) and their interaction (Conc x Time).....	226
Table 8.3.	Effect of tebuconazole on soil enzyme activities at three different initial concentrations: 5, 50 and 500 mg tebuconazole kg ⁻¹ DW soil (T5, T50 and T500, respectively).....	229
Table 8.4.	Effect of tebuconazole on soil community-level physiological profiles from Biolog Ecoplates TM absorbance measurements at an incubation time of 48 h, following incubation for 7, 30, 60 or 90 days at three different initial concentrations: 5, 50 and 500 mg tebuconazole kg ⁻¹ DW soil (T5, T50 and T500, respectively).....	230
Table 8.5.	Correlations among soil microbial properties. Marked correlations are significant at 0.05 (*) and 0.01 (**) level of probability.....	232
Table 8.6.	Varimax rotated factors for all variables considered in the PCA.....	233
Table 9.1.	Kinetic parameters of pesticide degradation in non-fertilized (NF), NPK-fertilized (NPK) and compost-fertilized (Compost) soils.....	250
Table 9.2.	Effect of pesticides on values of the treated-soil quality index in non-fertilized (NF), NPK-fertilized (NPK) and compost-fertilized (Compost) soils at day 7 and 90 of incubation.....	258
Table 9.3.	Analysis of variance for soil microbial properties as affected by type of fertilizer (F), type of pesticide (P), incubation time (T) and their interactions.....	259
Table 9.4.	Correlations among soil microbial properties.....	260
Table 10.1.	Kinetic parameters of pesticide dissipation in soil for difenoconazole, deltamethrin and ethofumesate at the three initial concentrations studied.....	284
Table 10.2.	Analysis of variance for soil microbial parameters as affected by type of pesticide (P), pesticide concentration (C), incubation time (T) and their corresponding interactions.....	285
Table 10.3.	Effect of difenoconazole, deltamethrin and ethofumesate on the treated-soil quality index (T-SQI) at 7, 30, 60 and 90 days of incubation in the presence of 5, 50 and 500 mg pesticide kg ⁻¹ DW soil.....	291
Table 10.4.	Correlations among soil microbial parameters. Marked correlations are significant at 0.05 (*) and 0.01 (**) level of probability.....	292

0.4. List of abbreviations

ANOVA:	Analysis of variance
APHA:	American Public Health Association
ARYL:	Arylsulfatase activity
AWCD:	Average Well Colour Development
CDE:	Convection-dispersion equation
CEA:	Centro de Estudios Ambientales
CLPP:	Community level physiological profiles
C_{mic} :	Microbial biomass C
C_{org} :	Soil organic carbon
CV:	Cumulative variance
DEH:	Dehydrogenase activity
DEN:	Denitrification potential
DGGE:	Denaturing gradient gel electrophoresis
DOC:	Dissolved organic carbon
DW:	Dry weight
EF:	Model efficiency
FW:	Fresh weight
GAU-1:	Piezómetro situado en el flujo de salida de las aguas subterráneas en la parcela agrícola de Gauna
GAU-2:	Piezómetro situado en el flujo de entrada de las aguas subterráneas en la parcela agrícola de Gauna
GC-MS:	Gas chromatography–mass spectrometry
GLU:	β -glucosidase activity
H':	Shannon's diversity index
H-A:	Horizonte superficial del suelo de Salburua
H-Bg:	Horizonte sub-superficial intermedio del suelo de Salburua
H-B2g:	Horizonte sub-superficial más profundo del suelo de Salburua
IGME:	Instituto geológico y minero de España
INT:	Iodonitrotetrazolio
K_{oc} :	Constante de adsorción de un pesticida

K_{foc} :	Constante de adsorción de Freundlich de un pesticida
MAC:	Maximum allowable concentration
ME:	Mean error
M.O.:	Materia orgánica
MUB:	Tampón modificado universal
NPK:	Fertilizante inorgánico rico en nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K)
NF:	Non-fertilized
N_{min} :	Potentially mineralizable nitrogen
OM:	Organic matter
PCR:	Polymerase chain reaction
qCO_2 :	Microbial metabolic quotient
Q_R :	Respiratory quotient
PCA:	Pincipal component analysis
PLSD:	Protected least significant difference
PHO:	Alkaline phosphatase activity
R_B :	Basal respiration
RMSE:	Root mean square error
r.p.m:	Revoluciones por minuto
S:	Riqueza en especies microbianas
S.D.:	Standard deviation
S.E.:	Standard error
s.s.:	Suelo seco
SIR:	Substrate-induced respiration
$t_{1/2}$:	Half-life or time required for a 50% dissipation
TAE:	Tris acetate EDTA
THAM:	Tris hidroximetil aminometano
T-SQI:	Treated-Soil Quality Index
URA:	Agencia Vasca del Agua
UNEP:	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
URE:	Urease activity
VE:	Variance explained
WHC:	Water holding capacity

1

- 1.1. La agricultura intensiva
- 1.2. Fertilizantes agrícolas y medio ambiente
- 1.3. Pesticidas agrícolas y medio ambiente
- 1.4. La importancia del recurso suelo en la agricultura
- 1.5. Las zonas húmedas frente a la contaminación agrícola

Introducción

“Es más hermoso saber algo de todo que saber todo de una cosa”

Blaise Pascal (1623-1662)

1. Introducción

1.1. La agricultura intensiva

1.1.1. Perspectiva histórica

Desde su desarrollo hace más de 10.000 años hasta comienzos del siglo XX, la agricultura se caracterizó por adaptarse a las condiciones climatológicas locales, usando de una manera integral todos los recursos disponibles y respetando los procesos y equilibrios propios de la naturaleza. Se trataba de una agricultura de carácter extensivo, asociada estrechamente a la ganadería y destinada fundamentalmente a satisfacer las demandas nutricionales de las poblaciones próximas, siendo limitados sus impactos en el medio ambiente.

A partir del siglo XX, sin embargo, el crecimiento demográfico mundial aumentó a un ritmo excepcional, y con él, la demanda de alimentos. Si bien, la evolución de la población y el crecimiento poblacional fueron consecuencia de varios factores interrelacionados como las mejoras en sanidad y el desarrollo tecnológico, solo un cambio radical de la agricultura (“Revolución verde”) hizo posible que este

fenómeno fuera viable y se mantuviera en el tiempo. Dicho cambio se basó en la intensificación de la agricultura, es decir, aumento de la producción por medio de la mejora en los rendimientos de los cultivos.

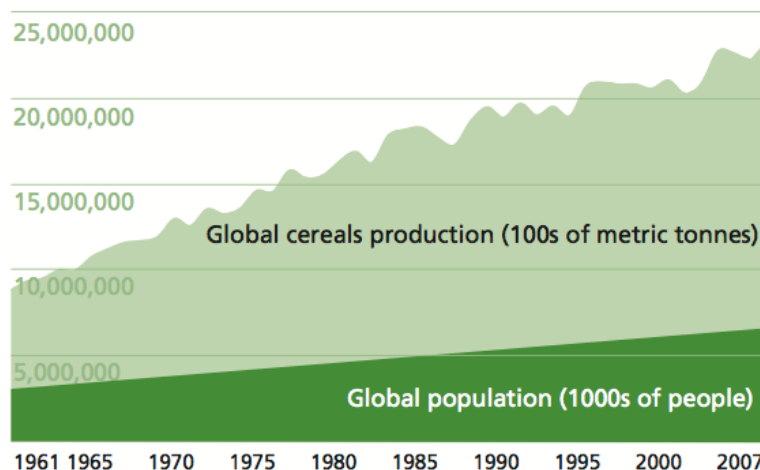


Figura 1.1. Evolución de la población mundial y de la producción de cereal.
Fuente: FAO.

Esta nueva concepción de la agricultura se caracterizó por la mecanización de los medios de producción, la selección de aquellos cultivos que ofrecieran mayores rendimientos (monocultivo), la implantación de sistemas de regadío, y el uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos. No obstante, la aceleración de los ciclos de producción y la ruptura con los equilibrios propios de la naturaleza tuvo inevitablemente un impacto negativo sobre el medio ambiente.

1.1.2. Binomio agricultura-medio ambiente

Actualmente la dependencia de las actividades agrícolas con el binomio naturaleza-tecnología resulta en un pseudo-ecosistema económico-ecológico caracterizado según la OCDE (1997) por cuatro factores:

- i. La viabilidad económica de la agricultura está fuertemente influenciada por el medio ambiente. La productividad depende de factores tales como el clima, la fertilidad del suelo y el suministro de agua.

- ii. Las actividades agrícolas afectan al medio ambiente. Los cultivos forman parte de un agroecosistema del cual utilizan recursos naturales para crecer. Los beneficios ambientales tales como el mantenimiento de los paisajes tradicionales o el arraigo de la población rural pueden ser compensados por otros perjuicios tales como el deterioro de la calidad del suelo, del agua y del aire o la pérdida de hábitats de alto valor ecológico.
- iii. La relación entre medio ambiente y agricultura es compleja y característica de la propia zona de estudio. Depende de los atributos físicos, químicos y biológicos del medio ambiente local, de la gestión integral de las prácticas agrícolas y de las tecnologías productivas adoptadas.
- iv. Las influencias culturales y políticas condicionan los impactos de la agricultura en el medio ambiente. La mayoría de los países desarrollados mantienen la producción agrícola por medio de subsidios públicos y la intervención gubernamental. Dichas medidas inevitablemente afectan al nivel de producción, su localización y gestión, y por consiguiente, condicionan sus impactos posteriores.

1.1.3. Impactos de la agricultura en el medio ambiente

Efectivamente, aunque la agricultura en su original concepción, además de satisfacer la demanda de alimentos del ser humano podía tener un efecto positivo sobre el medio ambiente (*e.g.*, maximización de los procesos de reciclado de residuos, fijación de dióxido de carbono, producción de oxígeno, conservación de biodiversidad), la moderna agricultura intensiva está asociada con una serie de impactos medioambientales que incluyen actividades contaminantes para el agua, aire, suelo y biosfera (Doran y Parkin, 1994), entre los que destacan:

- i. Pérdida de suelo.** Las dos principales causas de la pérdida de suelo fértil son la compactación y la erosión. El primero es resultado de la utilización continuada de maquinaria pesada, que altera las propiedades hídricas del suelo y por lo tanto el desarrollo vegetal que puede albergar (Materechera, 2009). El segundo es resultado del mal uso de la tierra (*e.g.*, cultivos en laderas muy

pronunciadas, ausencia de cubierta vegetal protectora, riego por inundación) resultando en el fenómeno físico del arranque, transporte y deposición de partículas del suelo por acción del agua o del viento (García-Ruiz, 2010). Se calcula que la pérdida de suelo fértil en todo el mundo puede llegar a ser de entre cinco y siete millones de hectáreas de tierra cultivable cada año (FAO, 1996).

ii. Salinización y anegamiento de suelos. Consiste en la acumulación de sales solubles de sodio, calcio y magnesio en los suelos, lo que provoca una importante pérdida de fertilidad (UNEP, 1997). Cuando los suelos regados no tienen un drenaje suficientemente bueno, se encharcan con el agua y al vaporarse ésta, las sales que contiene se concentran en la superficie del suelo. Según datos de la FAO casi la mitad de las tierras de regadío del mundo han bajado su productividad por este motivo y alrededor de 1,5 millones de hectáreas se pierden cada año (FAO, 1996).

iii. Contaminación de aguas y suelos. A diferencia de la contaminación local generada por otras actividades humanas tales como la minería o la industria, la contaminación agrícola es de carácter difuso y está asociada al uso (o abuso) de fertilizantes y pesticidas. La contaminación de importantes masas de agua, tanto subterráneas como superficiales, por nitratos (NO_3^-) y pesticidas de origen agrícola no solo limita los posteriores usos que el ser humano pueda hacer de ellas, sino que además provoca importantes daños en el medio ambiente (*e.g.*, eutrofización) (Li y Zhang, 1999). Especialmente complejo es el problema de la contaminación de las aguas por pesticidas debido su alta persistencia en el medio y a las bajas concentraciones a partir de las cuales pueden presentar efectos nocivos (van der Werf, 1996).

iv. Agotamiento de acuíferos. La generalización de los sistemas de regadío en zonas de condiciones climatológicas favorables ha permitido obtener importantes rendimientos agrícolas. Cuando no se dispone del agua necesaria en cauces superficiales naturales o bien de canalización, se recurre a las masas de aguas subterráneas. La explotación de los acuíferos subterráneos, no obstante, se produce generalmente a un ritmo superior al necesario para su recarga natural. Dicha sobreexplotación provoca un descenso significativo del nivel freático con

importantes impactos económico-ambientales para la zona, tales como la desaparición de humedales y manantiales naturales, o la intrusión de agua salada en el subsuelo si el acuífero está próximo al mar, salinizándolo hasta hacerlo inútil para sus usos agrícolas o para el consumo humano, e incluso afectando a la fertilidad del suelo (FAO, 2003).

v. Pérdida de biodiversidad genética. En la agricultura extensiva tradicional las especies cultivadas se seleccionaban de tal forma que estuvieran perfectamente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, lo cual se traducía en el mantenimiento de la biodiversidad. La actual agricultura intensiva, por el contrario, se caracteriza por la implantación en extensas áreas de monocultivo de unas pocas especies que ofrecen los mayores rendimientos posibles. La generalización del monocultivo se traduce en una gran vulnerabilidad ante posibles plagas y supone la pérdida de una importantísima reserva genética ante eventuales cambios ecológicos (Henle et al., 2008).

vi. Deforestación. La agricultura intensiva propia de los países industrializados no es la principal responsable de la deforestación, porque el aumento de la productividad se consiguió por medio de la mejora en los rendimientos agrícolas, más que a través del aumento de la superficie agrícola. Actualmente, la principal causa de destrucción del bosque es la agricultura de subsistencia que se desarrolla en muchos países tropicales.

vii. Efecto invernadero. En Europa, la agricultura es un sector responsable del 10% de las emisiones de gases de efecto invernadero de origen antropogénico (Neftel et al., 2006). Para dos de dichos gases, el metano (CH_4) y el óxido nitroso (N_2O), la agricultura es la principal fuente, suponiendo prácticamente el 50% de las emisiones de origen humano. Dichos gases son originados mayoritariamente por la actividad fermentadora de los microorganismos anaerobios propios de terrenos anegados (CH_4), así como por la reducción anaerobia de los NO_3^- procedentes de los fertilizantes llevada a cabo por microorganismos desnitrificantes (N_2O). La agricultura también es responsable de la emisión de grandes cantidades de dióxido de carbono (CO_2) procedente de la mineralización de la materia orgánica (M.O.) del suelo por parte de

microorganismos aerobios (Neftel et al., 2006). Asimismo, la agricultura moderna requiere del consumo de grandes cantidad de combustibles fósiles debido a la mecanización y el transporte de los productos agrícolas a grandes distancias de sus centros de producción.

Tabla 1.1. Principales gases de efecto invernadero generados por la agricultura.

Compuesto gaseoso	Concentración típica	Permanencia en la atmósfera	% emisiones agrícolas con respecto al total
CO ₂	380 ppm	5-200 años	10-30%
CH ₄	1.7 ppm	12 años	25-40%
N ₂ O	320 ppb	114 años	40%
NH ₃	2 ppb	1-3 días	80%
NO	1 ppb	1-10 horas	10%

Fuente: UNEP

1.1.4. Impacto de la agricultura sobre la calidad de las aguas

El acceso a alimentos es la segunda prioridad para el ser humano, solo por detrás del acceso al agua potable. Es por ello que la agricultura ha desempeñado y desempeña un papel determinante dentro de la economía mundial pasada, presente y futura. Al mismo tiempo, la agricultura juega un papel fundamental en el medio ambiente, ya que siendo el sector que mayor cantidad de agua dulce demanda (70% del consumo mundial), es a su vez, la principal causa de degradación de los recursos hídricos. Una agricultura de calidad requiere de un agua de calidad, pero a su vez un agua de calidad necesita de una agricultura de calidad, y cuando la segunda afirmación no se cumple, es cuando el agua y la agricultura entran en conflicto.

Excepto el agua perdida por evapotranspiración y la absorbida por los propios cultivos, la mayor parte del agua utilizada con fines agrícolas continúa discurriendo por los ecosistemas terrestres y acuáticos a través de masas de agua superficiales y subterráneas, de forma que sus impactos posteriores así como los usos que puedan hacerse de ella vendrán determinados por las prácticas agrícolas a las que se vea sometida y los contaminantes que reciba.

Según el diccionario de la Real Academia de la Lengua, el término “contaminar” se define como “alterar nocivamente la pureza o las condiciones normales de una cosa o

un medio por agentes químicos o físicos”; sin embargo, dicha definición no incluye todos los matices que engloba el complejo fenómeno de la contaminación. La definición de la Enciclopedia Británica es más correcta desde el punto de vista de la contaminación agrícola: “la contaminación es la modificación nociva del estado natural de un medio como consecuencia de la introducción de un agente totalmente ajeno a éste (contaminante), o bien de una sustancia natural en una concentración superior a la normal, causando inestabilidad, desorden, daño o malestar en un ecosistema, en el medio físico o en un ser vivo”.

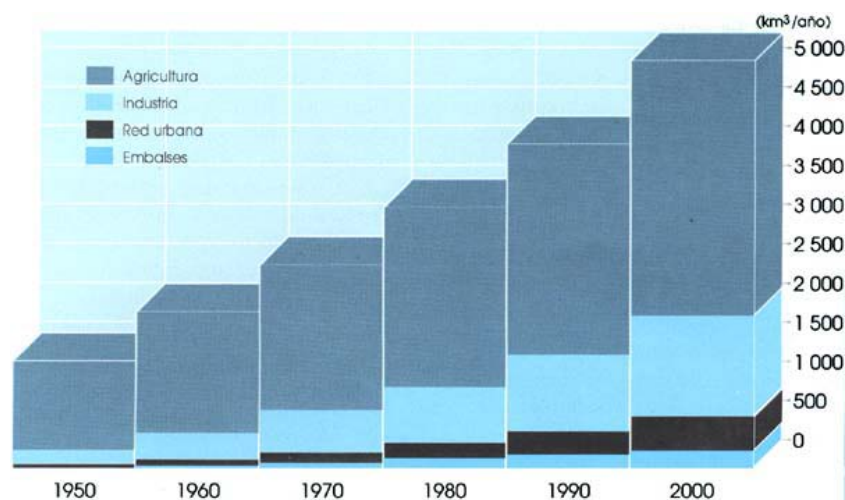


Figura 1.2. Utilización mundial del agua por sectores. Por utilización de los embalses se entiende la evaporación presente en ellos. Fuente: Shiklomanov, 1990.

De hecho, el problema de la contaminación de masas de agua superficiales y subterráneas por parte de la agricultura engloba tanto compuestos presentes en el medio de forma natural, pero cuya concentración ha sido artificialmente alterada por encima de valores que el medio no es capaz de asimilar (nutrientes inorgánicos y orgánicos), así como compuestos de origen sintético no presentes hasta ahora en el medio (pesticidas).

Otro de los aspectos que caracterizan a la contaminación agrícola de los recursos hídricos es su carácter difuso. La contaminación difusa de masas de agua abarca un amplio espectro de actividades humanas en las que los contaminantes no tienen un único punto de entrada en los cursos de agua a los que afectan. La contaminación de carácter puntual es producida por un foco emisor determinado, afectando a una zona concreta; por ello, su detección y su control son más sencillos. En el caso de la contaminación difusa, por el contrario, su origen no está claramente definido, afectando

a amplias zonas en las que pueden coexistir múltiples focos de emisión, y pueden producirse interacciones entre distintos contaminantes que dificultan su estudio y su control individual. La contaminación difusa de origen agrícola se caracteriza adicionalmente por su dependencia con los factores hidrogeológicos de la zona en la que impacta, así como por las prácticas agrícolas que se llevan a cabo.

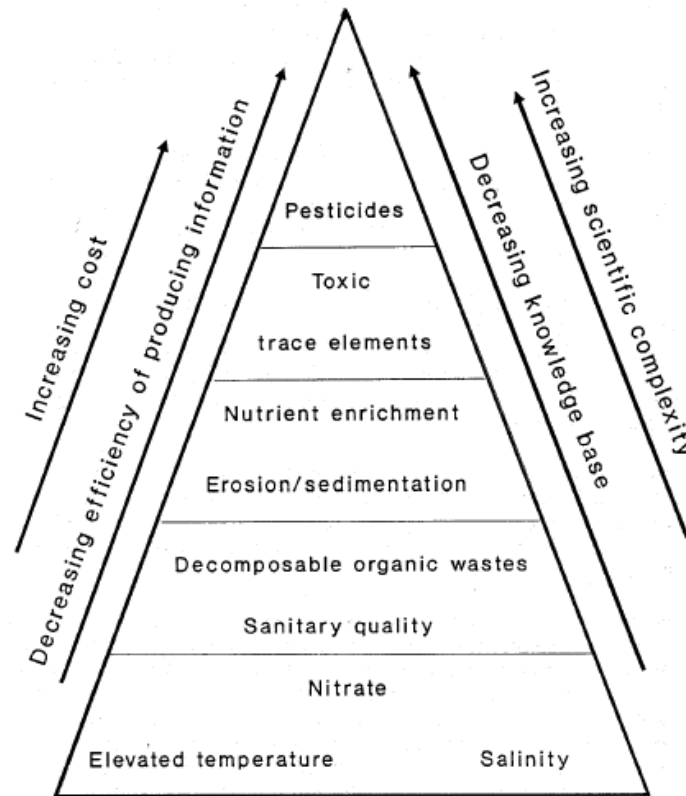


Figura 1.3. Jerarquía de la complejidad de los problemas relacionados con contaminantes difusos de origen agrícola. Fuente: Rickert, 1993.

Aunque la agricultura no es la única actividad humana generadora de contaminación difusa, destaca de entre todas las demás por la extensión del área que afecta y la variedad de contaminantes que implica. Dichos contaminantes pueden ser transportados por la superficie del suelo o bien a través de él por la acción del agua de lluvia o nieve, llegando hasta los ríos, lagos, humedales o acuíferos subterráneos, donde sus impactos pueden ser muy diversos, desde una simple molestia temporal hasta efectos tóxicos recurrentes sobre la vida vegetal y animal, incluido el ser humano. La Figura 1.3. ilustra la variedad de contaminantes de carácter difuso procedentes de las actividades agrícolas, así como la complejidad de su estudio.

1.1.5. Retos futuros

Aunque la mayoría de los países industrializados se han centrado en intentar atajar el problema de la contaminación de masas de agua por parte de fuentes puntuales, hoy en día se observa una tendencia cada vez más acusada en relación con la necesidad de re-direccionar recursos económicos hacia la lucha contra la contaminación de origen difuso (agrícola). No obstante, antes de poder formular posibles soluciones al problema de la contaminación difusa agrícola, es necesario comprender los mecanismos que rigen las dinámicas de los contaminantes implicados. En este sentido, las principales vías que se han propuesto son (OCDE, 1997):

- i. Acciones gubernamentales a través de cambios en la legislación, fomento de la investigación, implementación de programas de información y cambios en los subsidios a la agricultura.
- ii. Respuesta del sector agrícola en favor de la adopción voluntaria de nuevos estándares de calidad tales como la producción integrada.
- iii. Cambio de la actitud de los agricultores, incluyendo cambios en el uso de compuestos agroquímicos en las prácticas agrícolas.
- iv. Reacción del consumidor mediante el cambio de patrones de consumo.

En cualquier caso, la gestión de los problemas derivados de la contaminación se puede orientar a partir de dos enfoques diferentes, ciertamente no excluyentes: se puede intentar resolver el problema actuando contra los propios compuestos contaminantes (*e.g.*, tratamiento de aguas contaminadas), o bien se puede intentar prevenir el problema actuando sobre las causas que lo generan (*e.g.*, cambio en las prácticas agrícolas). En ambos casos, las acciones que deben tomarse son de carácter técnico, y su posible adopción o no, dependerá de si existe el adecuado conocimiento, las regulaciones legales y los incentivos económicos necesarios (Conway y Pretty, 1991).

1.2. Fertilizantes agrícolas y medio ambiente

Los altos rendimientos característicos de la agricultura intensiva solo son posibles, entre otras razones, gracias al desarrollo de los fertilizantes sintéticos. De entre los principales nutrientes involucrados en el metabolismo vegetal que son aportados por los fertilizantes sintéticos, el nitrógeno no solo presenta una mayor correlación con la tasa de producción vegetal, sino que también es el que más rápido se pierde mediante, por ejemplo, lixiviación.

En paralelo con el aumento en la producción agrícola, durante los últimos 50 años ha venido produciéndose un aumento en la concentración de NO_3^- en ríos, lagos y acuíferos subterráneos, fenómeno que evidencia la relación entre agricultura y contaminación. Adicionalmente, esta pérdida de nitrógeno en forma de lixiviados con altas concentraciones de NO_3^- , y en menor medida en forma de compuestos gaseosos o sólidos vía desnitrificación o erosión, respectivamente, conlleva pérdidas económicas, dado que el nitrógeno aplicado no está siendo usado en su totalidad por los cultivos.

1.2.1. El nitrógeno en la agricultura

El nitrógeno es un constituyente fundamental de los ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas, y por lo tanto, indispensable para la reproducción y el crecimiento de todos los organismos. En este sentido, Jenkinson (1990) estimó que el total de la población humana contiene 10 millones de toneladas de nitrógeno. Aunque es una cantidad pequeña en comparación con la cantidad de nitrógeno de la atmósfera (3.9×10^9 millones de toneladas), de la materia orgánica del suelo (1.5×10^5 millones de toneladas) o las plantas (1.5×10^4 millones de toneladas), el crecimiento de la población humana está inextricablemente unido a la agricultura, y por tanto, al ciclo del nitrógeno.

El nitrógeno se encuentra de forma natural en el suelo, estrechamente asociado a la M.O.. Sin embargo, solamente sus formas iónicas, amonio (NH_4^+) y NO_3^- , son fácilmente asimilables por las plantas (Whitehead, 2000). De los elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, el nitrógeno es el que se requiere en mayores cantidades, exceptuando aquellas especies vegetales que forman almacenamientos de

nutrientes subterráneos tales como la patata, las cuales requieren adicionalmente de mayores cantidades de fósforo y potasio.

Mientras la aplicación progresiva de pequeñas cantidades de NH_4^+ y NO_3^- al suelo evita los problemas de falta de nitrógeno, se necesitan aportes muy importantes de nitrógeno mineral para aumentar significativamente los rendimientos en los cultivos. El aporte abundante de nitrógeno se traduce en dos efectos positivos para la planta: aumento de la superficie foliar, lo cual implica mayor cantidad de radiación solar interceptada y por tanto mayor eficiencia fotosintética; y una mayor duración del cultivo, ya que una reserva abundante de nitrógeno en el suelo permite a la planta no tener que utilizar el nitrógeno de las hojas más viejas para destinarlas a las más recientes.

No obstante, no siempre el efecto es positivo. Por ejemplo en la remolacha azucarera, un exceso de aporte de nitrógeno puede traducirse en un menor contenido en azúcar de la raíz. Asimismo, el aporte de nitrógeno puede hacer que los tallos sean más largos, pero mecánicamente menos resistentes, de forma que ante la acción del viento o de la lluvia se puede producir el fenómeno conocido como “encamado”.

1.2.2. Fertilizantes nitrogenados

La agricultura tradicional dependía de la continua fijación biológica del nitrógeno atmosférico para reponer el nitrógeno perdido por el suelo durante el anterior cultivo. La fabricación de fertilizantes nitrogenados sintéticos a partir de 1920 gracias a la fijación industrial de nitrógeno por medio del proceso Haber, eliminó la barrera natural que limitaba hasta entonces la entrada de nitrógeno a los agroecosistemas.

La demanda de fertilizantes inorgánicos ha crecido vertiginosamente desde 1950 hasta la actualidad, con tasas de fertilización en los países con mayor intensificación agrícola de 120-550 kg nitrógeno (N) por hectárea (ha^{-1}). La fertilización nitrogenada ha tenido un impacto fundamental en el aumento de la productividad agrícola, aunque es difícil de cuantificar su importancia con respecto al resto de mejoras tecnológicas que se han implementado.

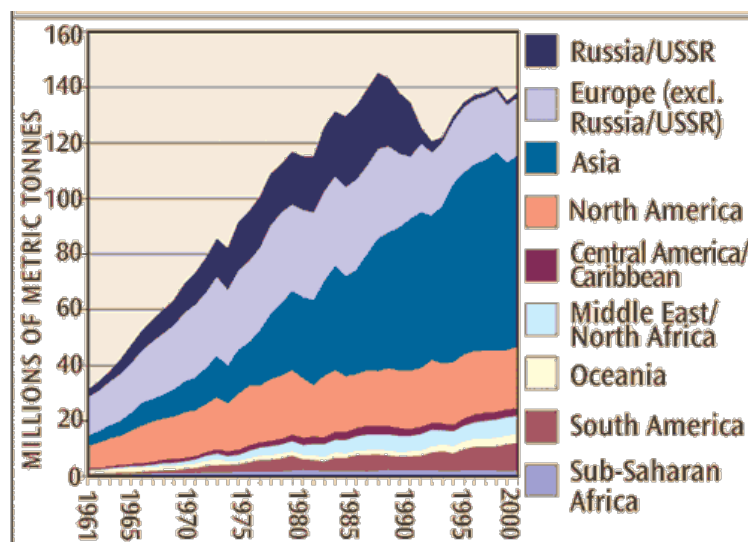


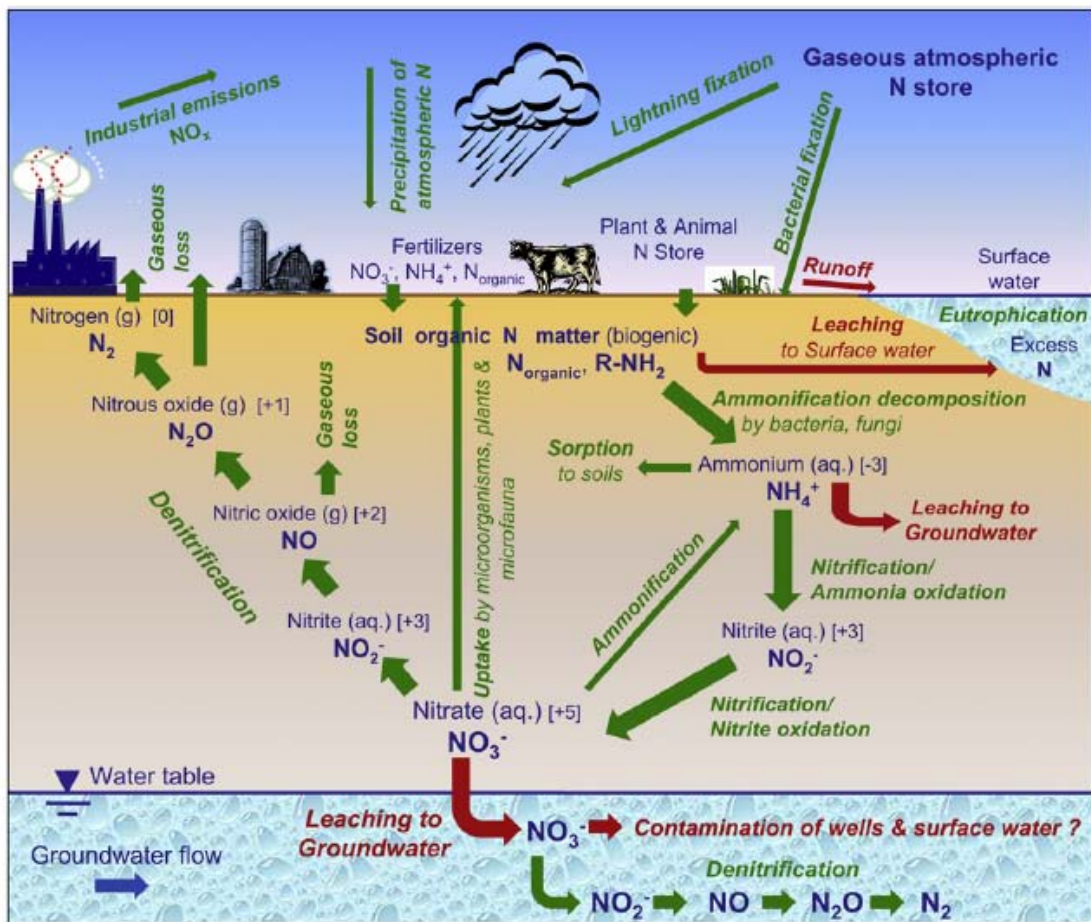
Figura 1.4. Evolución del consumo mundial de fertilizantes en el periodo 1960-2001.
Fuente: World Resources Institute.

La disponibilidad de fertilizantes nitrogenados no solo ha aumentado la productividad agrícola sino que también ha variado la tipología de los cultivos. Se ha pasado de cultivos mixtos con ciclos de reciclaje del nitrógeno relativamente cerrados y mantenidos en el tiempo, a monocultivos intensivos con grandes entradas de nitrógeno en forma de fertilizantes sintéticos (Rosswall y Paustian, 1984).

No obstante, con el aumento de las tasas de fertilización y los consiguientes cambios en los patrones globales de cultivos, cada vez se está prestando mayor atención a la pérdida de nitrógeno de los agroecosistemas, de forma que se están realizando grandes esfuerzos en optimizar la dosificación de nitrógeno a los cultivos tanto en cantidad como en periodicidad.

1.2.3. El nitrógeno en los agroecosistemas

El nitrógeno es un nutriente transitorio y la cantidad de dicho elemento disponible en el suelo en un momento determinado es el resultado de una compleja secuencia de transformaciones físicas, químicas y biológicas que componen el ciclo del nitrógeno.



*Figura 1.5. Ciclo del nitrógeno y su influencia en los recursos hídricos.
Fuente: Rivett et al., 2008.*

1.2.3.1. Entradas de nitrógeno en los agroecosistemas

Los suelos agrícolas reciben cantidades significativas de nitrógeno vía **deposición atmosférica** de óxidos de nitrógeno y amoníaco (NH_3) (Peters et al., 2002). La mayor fuente de producción de óxidos de nitrógeno es la combustión de hidrocarburos fósiles, mientras que el amoníaco atmosférico proviene de diversas fuentes que incluyen emisiones industriales, la combustión de carbón y los desechos ganaderos y agrícolas (Schlesinger, 1997).

Dado que la mayor parte de los compuestos nitrogenados atmosféricos son solubles en agua, la deposición puede darse tanto por vía seca como húmeda. Se estima que del nitrógeno depositado en los campos de cereales, el 30% es inmovilizado en el suelo, el 12% se pierde vía desnitrificación, el 5% se pierde vía lixiviación y el resto

pasa a formar parte de los cultivos (Goulding et al., 1998). Desde el punto de vista agrícola, puede representar un aporte útil de nitrógeno, pero puede resultar perjudicial en sistemas naturales en los que los nutrientes se mantienen en un estrecho equilibrio.

Algunas especies de bacterias y algas son capaces de llevar a cabo la **fijación de nitrógeno atmosférico** (N_2) en el suelo mediante la reducción de N_2 a NH_3 (Haynes et al., 1993). El ejemplo más importante desde el punto de vista agrícola son las bacterias del género *Rhizobia*, las cuales constituyen una estrecha relación simbiótica con las leguminosas tales como guisantes, alubias o tréboles. Los cultivos de leguminosas, tras su cosecha, generalmente dejan grandes cantidades de residuos vegetales con gran contenido en proteína, aumentando el contenido en nitrógeno orgánico del suelo. Dicho nitrógeno será susceptible de ser posteriormente mineralizado y puesto a disposición de los cultivos futuros. De hecho, algunas leguminosas son específicamente cultivadas para su incorporación al suelo como enmiendas naturales (Parsons, 1984).

La fijación industrial de N_2 es un proceso análogo a la fijación biológica ya que ambos consisten en la reducción de N_2 a NH_3 . La fijación industrial del N_2 se produce a altas temperaturas (300-500°C) y altas presiones (400-1000 atmósferas) en presencia de catalizadores. El NH_3 podría ser utilizado directamente como fertilizante, pero comúnmente es transformado en otros compuestos tales como el nitrato amónico o la urea, o bien mono o di fosfato de amonio, utilizado en la síntesis de los fertilizantes NPK. Este aporte de nitrógeno en forma de NH_4^+ y NO_3^- puede ser absorbido por la planta mucho más rápidamente que si se realiza en forma de nitrógeno orgánico; sin embargo, también es mayor su susceptibilidad a ser lixiviado.

1.2.3.2. Transformaciones del nitrógeno en los agroecosistemas

Los suelos contienen nitrógeno en forma orgánica e inorgánica. Dependiendo de la historia del suelo y las condiciones climatológicas, la suma de ambas fracciones equivale normalmente a 2000-6000 kg N ha⁻¹, de los cuales la mayoría estará en forma orgánica, y por lo tanto, no disponible directamente para la planta (Powlson, 1993). El nitrógeno orgánico del suelo es colonizado por una gran variedad de bacterias heterotróficas, las cuales obtienen la energía de la descomposición de las moléculas orgánicas. Durante la descomposición, abundantes nutrientes elementales son

transformados de su forma orgánica a inorgánica. Este proceso se conoce como **mineralización** y tiene lugar siempre y cuando el suelo mantenga unas condiciones de humedad y temperatura suficientes como para mantener la actividad microbiológica, siendo especialmente intenso en primavera y en otoño (alta precipitación y temperaturas suaves).

La mineralización del nitrógeno orgánico implica la degradación de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y otros compuestos nitrogenados a NH_4^+ . Una vez que el NH_4^+ es formado, éste es susceptible de experimentar una serie de transformaciones (inmovilización, nitrificación o adsorción/fijación) así como de desaparecer del suelo debido a la absorción por parte de las plantas o bien por su volatilización. La mineralización es el proceso clave que controla la disponibilidad de nitrógeno por parte de las plantas y su lixiviación en los sistemas naturales (Goulding, 2000).

La **inmovilización** del nitrógeno se define como la transformación del nitrógeno inorgánico (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) en nitrógeno orgánico (Jansson y Persson, 1982). Este proceso tiene lugar cuando en el medio hay una fuente de carbono abundante y fácilmente asimilable, como por ejemplo, el procedente de los restos de cultivos, y bajos contenidos en nitrógeno orgánico. A medida que los microorganismos atacan y descomponen los materiales orgánicos ricos en carbono, éstos absorben NH_4^+ del suelo y rápidamente lo utilizan en sintetizar biomasa microbiana. Posteriormente, cuando dichos microorganismos mueran, el nitrógeno orgánico de sus estructuras celulares será susceptible de volver a ser mineralizado, de forma que vuelva a ser transformado en NH_4^+ .

Cuando el crecimiento de las poblaciones microbianas del suelo está limitado por la disponibilidad de carbono (la mayoría de los suelos naturales), gran parte del NH_4^+ mineralizado es rápidamente oxidado a NO_3^- vía **nitrificación**. Es un proceso que tiene lugar en dos fases llevadas a cabo por 2 importantes grupos de bacterias: *Nitrosomonas* que oxida el NH_4^+ a NO_2^- , y *Nitrobacter* que oxida el NO_2^- a NO_3^- . Dado que la oxidación del NO_2^- es un proceso más rápido que la del NH_4^+ , el contenido en NO_2^- del suelo suele ser muy bajo (niveles traza) (Powlson, 2000).

El NH_4^+ puede ser inmovilizado por **adsorción** a la superficie de las partículas de arcilla y M.O. del suelo, donde puede ser posteriormente intercambiado por otros

cationes del suelo. La molécula de NH_4^+ tiene aproximadamente el mismo tamaño que el potasio catiónico (K^+) y rápidamente puede introducirse en los huecos intersticiales de los minerales arcillosos (*e.g.*, vermiculita). El colapso de dichos huecos, por ejemplo durante el secado de las arcillas, fija muy eficazmente el NH_4^+ , reduciendo muy significativamente su liberación al medio (Jalami y Moharrami, 2007).

1.2.3.3. Salidas del nitrógeno de los agroecosistemas

El nitrógeno puede perderse de los suelos agrícolas por numerosas vías. La más deseable desde el punto de vista económico y medioambiental es vía **absorción** vegetal y su posterior eliminación del agroecosistemas tras la cosecha. La proporción del nitrógeno aplicado que es recuperado a través del cultivo puede llegar a ser del 10-70% en función del tipo de cultivo, las prácticas agrícolas que se lleven a cabo y las condiciones climatológicas (para el fósforo es del 15% y para el potasio del 50-60%) (Isherwood, 2000).

De todas las formas de nitrógeno inorgánico presente en el medio, el NO_3^- es generalmente la más abundante en suelos bien drenados y aireados. Gran parte de este NO_3^- es resultado de la nitrificación del NH_4^+ , el cual a su vez puede proceder de la mineralización del nitrógeno orgánico del suelo, de los fertilizantes aplicados o incluso de la deposición atmosférica.

Cuando los cultivos están en su fase de máximo crecimiento, la absorción de NO_3^- del suelo es máxima, y por lo tanto, la susceptibilidad del NO_3^- a ser lixiviado es menor. Sin embargo, una vez que la planta ha alcanzado su estado vegetativo más maduro, la absorción de NO_3^- se ralentiza y por lo tanto es más vulnerable a perderse del medio por **lixiviación**.

El NO_3^- es un compuesto aniónico muy soluble, y a diferencia del NH_4^+ , no es rápidamente adsorbido por el suelo o la M.O. Así, el NO_3^- es transportado a través del suelo en disolución, predominantemente en sentido descendente, siguiendo los gradientes hidráulicos generados por acción de la gravedad y la transpiración de las plantas (Tisdale et al., 1993).

Los suelos agrícolas son susceptibles de perder cantidades significativas de nitrógeno en forma de NO_3^- a través del agua de drenaje y es frecuentemente citado como la causa más importante de pérdida de nitrógeno de los suelos (Lord y Anthony, 2000; Pretty et al., 2003; Rivett et al., 2007). Las mayores pérdidas de NO_3^- por lixiviación se producen cuando se dan dos condiciones:

- i. Cuando el agua de entrada al suelo (por lluvia o riego) supera ampliamente la evapotranspiración de las plantas, y se generan grandes flujos de agua de drenaje. Está fuertemente influenciado por la estructura y la textura del suelo, factores que condicionan la conductividad hidráulica y la capacidad para retener agua del suelo. La lixiviación de NO_3^- generalmente es mayor en suelos arenosos poco estructurados que en suelos estructurados con altos contenidos en arcillas.
- ii. Cuando el contenido en NO_3^- del suelo es alto debido a la mineralización del nitrógeno orgánico o la presencia de fertilizantes aplicados en exceso. La proporción de NO_3^- lixiviado dependerá de las condiciones ambientales, la tasa y el momento de fertilización, y las prácticas agrícolas llevadas a cabo.

Las lluvias estacionales y la evapotranspiración condicionan en gran manera la lixiviación de NO_3^- y, por lo tanto, la cantidad de NO_3^- remanente en el suelo disponible para los cultivos. Por ejemplo, en verano, cuando la evapotranspiración supera con creces la precipitación, la lixiviación de NO_3^- suele ser mínima, excepto si la aplicación de fertilizantes se realiza próxima a episodios de lluvia o riego. En veranos particularmente calurosos y secos, la sequedad del suelo puede limitar la absorción de NO_3^- por parte del cultivo, por lo que quedará un remanente significativo en el suelo susceptible de ser lixiviado con las precipitaciones de otoño y la ausencia de cultivos tras su cosecha. Las aplicaciones de fertilizante en otoño y sobre todo en invierno son susceptibles de generar importantes pérdidas de NO_3^- por lixiviación a medida que la cantidad de agua procedente de las precipitaciones supera a la cantidad de agua evapotranspirada. Por último, los fertilizantes aplicados en primavera son susceptibles de ser lixiviados si su aplicación coincide con fuertes precipitaciones o los NO_3^- no son rápidamente eliminados del suelo por absorción vegetal.

Adicionalmente, los sistemas agrícolas intensivos son intrínsecamente susceptibles a la pérdida de nitrógeno vía lixiviación de NO_3^- ya que (Richards et al., 1999; Chambers et al., 2000):

- i. Incluyen periodos en los que carecen de cualquier tipo de cubierta vegetal, siendo más vulnerables a la lixiviación de NO_3^- ante eventos de lluvia.
- ii. La ausencia de periodos de barbecho estimula la mineralización de nitrógeno, incrementando la cantidad de NO_3^- susceptible de ser lixiviado.
- iii. La repetida aplicación de fertilizantes nitrogenados incrementa el nitrógeno potencialmente mineralizable en el suelo y, por tanto, la cantidad de NO_3^- presente en el medio.
- iv. Existe el riesgo de pérdida directa de NO_3^- por la excesiva aplicación de fertilizantes o bien programas de fertilización mal planificados.

La lixiviación de nitrógeno orgánico soluble aunque puede llegar a ser del mismo orden de magnitud que la lixiviación de NO_3^- , no genera un impacto tan acusado en la calidad de las aguas ya que, gracias a su interacción con las arcillas del suelo y su rápida mineralización, no sufre unas fluctuaciones tan variables como en el caso de los NO_3^- (Chen et al., 2005). La lixiviación de nitrógeno orgánico solo representa un problema medioambiental en el caso de acumulaciones puntuales importantes de purines de origen animal.

Otra de las rutas por las que se pueden perder importantes cantidades de nitrógeno de los agroecosistemas es vía emisión de óxido nítrico (NO), N_2O y N_2 atmosférico. Dichos gases provienen de la anteriormente comentada nitrificación, y sobre todo de la **desnitrificación** (Wrage et al., 2004).

La desnitrificación es el proceso mayoritario por el que el nitrógeno en estado oxidado vuelve de nuevo a la atmósfera en estado reducido. Este proceso implica la reducción disimilativa de NO_3^- , y requiere de suelos bajo condiciones anóxicas en donde el NO_3^- sustituye al oxígeno (O_2) como aceptor final de electrones en la respiración microbiana. Las condiciones que favorecen la desnitrificación son: altos niveles de NO_3^- , una fuente de carbono fácilmente asimilable, temperaturas de suelo moderadas, presencia de microorganismos desnitrificantes, y suelos húmedos y poco

estructurados (condiciones que favorecen las condiciones anóxicas del suelo) (Averill y Tiedje, 1982; Fowler et al., 1996).

La desnitrificación representa una pérdida significativa de nitrógeno en suelos agrícolas, especialmente en zonas templadas y húmedas, pero su cuantificación resulta muy complicada debido a su variabilidad espacio-temporal y la complejidad de la medida de las emisiones de N_2O y N_2 (Arah et al., 1991).

Además de representar una importante pérdida económica para los agricultores al reducir la disponibilidad de nitrógeno para el cultivo, las emisiones de NO y, sobre todo, de N_2O conllevan un impacto negativo al medio ambiente, al ser ambos gases promotores del “smog” fotoquímico y del efecto invernadero, respectivamente (Sillman, 2003; Luo et al., 2010).

La lixiviación de NH_4^+ no representa normalmente un riesgo significativo debido a su retención en el suelo por intercambio iónico; es más habitual su pérdida por **volatilización** en forma de NH_3 gaseoso. Ésta puede llegar a suponer el 50% del nitrógeno aplicado (Sommer et al., 2004) en suelos agrícolas tratados con fertilizantes orgánicos de origen animal (purines). En suelos arados, las mayores pérdidas se producen cuando los fertilizantes ricos en urea son aplicados en suelos alcalinos, donde se favorece la ruptura de la urea en NH_4^+ y su pérdida en forma de NH_3 . También afecta negativamente la aplicación de urea a altas temperaturas y sobre suelos secos.

Se estima que el 60% de las emisiones de NH_3 mundiales son de origen antropogénico, y en el caso de Europa, la agricultura es la principal fuente de contaminación atmosférica por NH_3 , aunque los océanos y la combustión de la biomasa también contribuyen (Fowler et al., 1996).

1.2.4. Problemas asociados a la contaminación por nitratos

Hay fundamentalmente dos problemas relacionados con la contaminación de los recursos hídricos por NO_3^- : la calidad del agua para consumo humano y la eutrofización de masas de agua superficiales. Hay una preocupación creciente en relación a los niveles cada vez mayores de NO_3^- en los alimentos, aunque éste no es un problema

estrictamente relacionado con la contaminación de recursos hídricos, por lo que queda fuera de nuestro ámbito de estudio.

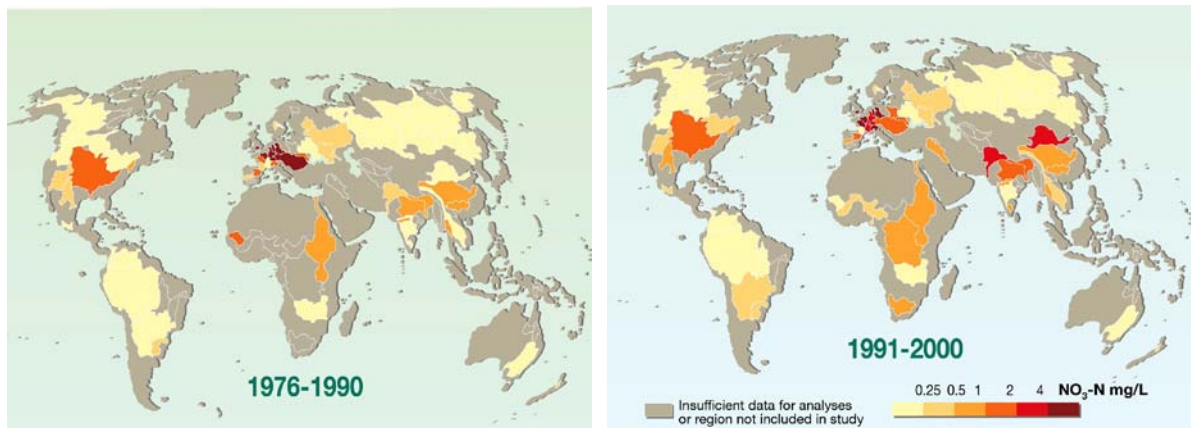


Figura 1.6. Distribución mundial de las aguas con altos contenidos en NO_3^- .
Fuente: UNEP.

1.2.4.1. Nitrato en las aguas para consumo humano

La mayor parte del agua potable en Europa proviene de ríos y acuíferos subterráneos. Sin embargo, la lixiviación generalizada de NO_3^- de origen agrícola hacia dichos recursos hídricos, ha provocado que en muchas zonas agrícolas la concentración de nitratos en las aguas destinadas a consumo humano exceda el máximo permitido por la directiva europea para aguas potables (2006/118/CE), léase 50 mg NO_3^- por litro (L^{-1}).

El agua potable en algunas regiones de Europa puede llegar a suponer aproximadamente el 30% de la ingesta diaria de NO_3^- , proviniendo el otro 70% de la fruta, vegetales y productos cárnicos (Isherwood, 2000). Sin embargo, la ingesta de grandes cantidades de NO_3^- en el agua potable puede ser perjudicial para el ser humano, dado que, aunque los NO_3^- son compuestos relativamente no-tóxicos y rápidamente excretados del cuerpo, pueden ser reducidos a nitrito (NO_2^-), compuesto potencialmente tóxico en la boca y el estómago.

Se conoce desde la década de los 40 que el contenido excesivo en el agua potable puede presentar un riesgo para la salud de los niños menores de 6 meses. El NO_2^- procedente de la reducción bacteriana del NO_3^- ingerido puede ser absorbido por la sangre donde se combina con la hemoglobina formando metahemoglobina que no

puede transportar oxígeno. Globalmente ha habido 3.000 casos de metahemoglobinemia, comúnmente conocida como “el síndrome del bebe azul” (Conway y Pretty, 1991).

Bajo ciertas condiciones, los NO_3^- reaccionan con diferentes aminas para formar nitrosaminas y otros compuestos nitrogenados, la mayoría de los cuales son compuestos fuertemente cancerígenos para los animales (Magee, 1982). Uno de los emplazamientos en los que podrían darse las condiciones necesarias para dicha reacción es el estómago humano, por lo que se ha sugerido que un incremento en la ingesta de NO_3^- puede suponer un mayor riesgo de padecer cáncer de estómago, aunque dicha hipótesis no ha sido demostrada. Incluso se ha llegado a afirmar que la presencia de NO_3^- en pequeñas concentraciones puede llegar a tener un efecto beneficioso al reducir la presencia de patógenos en el intestino humano (Leifert et al., 1999).

1.2.4.2. Eutrofización de masas de agua

Muchas masas de agua superficiales, como por ejemplo ríos, lagos y humedales, tienen de forma natural un aporte limitado de nitrógeno y fósforo, siendo por ello ambientes oligotróficos (bajo contenido en nutrientes y baja productividad biológica). Sin embargo, el exceso de abonado con fines agrícolas y su posterior pérdida, bien por lixiviación o arrastre superficial, puede producir un aporte de nutrientes a dichas masas de agua transformándolas en eutróficas (ricas en nutrientes y gran productividad biológica).



Figura 1.7. Ecosistema acuático con evidentes síntomas de eutrofización.
Fuente: Sociedade Galega de Historia Natural.

Los principales problemas relacionados con la eutrofización de las aguas son los siguientes:

- i. Los cambios en la disponibilidad de nutrientes puede afectar a la composición de las poblaciones de algas, con efectos indirectos en el resto de animales y la cadena trófica.
- ii. La descomposición de las algas y demás plantas puede provocar la falta de oxígeno en las aguas causando la muerte de la vida acuática.
- iii. El crecimiento descontrolado de algas produce la contaminación de las aguas potables, requiriendo un proceso de filtración adicional antes de su consumo y, por lo tanto, mayores costes de tratamiento.
- iv. Algunas especies de algas producen toxinas que pueden llegar a ser perjudiciales para el ser humano.
- v. La presencia de algas en la superficie de las aguas las hace menos atractivas para su uso con fines lúdicos y recreativos.

1.3. Pesticidas agrícolas y medio ambiente

Se entiende por pesticida o plaguicida a todo aquel compuesto de origen natural o sintético que sea utilizado para controlar o matar poblaciones de organismos considerados indeseados. Dentro de los pesticidas de uso agrícola se encuentran los herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas y rodenticidas.

El uso de pesticidas es junto al de fertilizantes el principal responsable del aumento de la producción agrícola registrado desde 1950, convirtiéndose en una parte fundamental de la agricultura intensiva moderna. A medida que el valor añadido del cultivo aumenta, también lo hace el número de aplicaciones de pesticidas, pudiéndose realizar hasta 10-15 aplicaciones por cultivo, con más de un compuesto activo adicionado en cada aplicación. Dichos compuestos biocidas están diseñados para actuar contra organismos que resultan perjudiciales para los cultivos (organismos-diana).

Las plagas, enfermedades o “malas hierbas” causan al año unas pérdidas del 20-40% de la producción agrícola mundial, pudiéndose manifestar en todas las fases del cultivo y de la cadena de distribución. No obstante, aunque los pesticidas contribuyen a aumentar los rendimientos de la producción agrícola, tanto en cantidad como en calidad, su utilización no resulta inocua para el medio ambiente.

1.3.1. Los pesticidas en la agricultura

El papel que los pesticidas desempeñan en la agricultura intensiva es crucial debido a la mayor vulnerabilidad de los monocultivos al ataque de plagas. En este sentido, una gran variedad de compuestos con poder biocida se utiliza como herramienta para el control de plagas y demás poblaciones de organismos no deseados.

Los primeros pesticidas comenzaron a utilizarse en la época de la antigua Grecia, pero no fue hasta mediados del siglo XX cuando su uso se generalizó. Los primeros pesticidas fueron mayoritariamente compuestos inorgánicos como por ejemplo el azufre elemental, usado como fungicida, o sales simples de arsénico, cobre, mercurio y hierro, usadas como fungicidas, insecticidas y raticidas. Los primeros pesticidas orgánicos consistían en destilados y extractos de plantas como por ejemplo las raíces de derris, la nicotina o el pirethrum extraído de los crisantemos. Sin embargo, pocos de ellos eran utilizados para una única plaga y la mayoría eran tóxicos y peligrosos.

Fue durante la 2ª Guerra Mundial cuando el número y la complejidad de los pesticidas utilizados con fines agrícolas comenzaron a crecer. Insecticidas como el DDT o el HCH, herbicidas hormonales como el 2,4-D o el MCPA, fueron utilizados por primera vez en 1940, y le siguieron el dieldrin y el aldrin en 1950 (Hassal, 1990).

La fabricación de pesticidas representa una parte importante del sector químico mundial con unos ingresos que superan los 45.000 millones de euros al año (CPA, 2000). De entre los diferentes tipos de pesticidas destacan los herbicidas y los insecticidas como los compuestos biocidas más ampliamente utilizados. Más del 60% de los pesticidas son utilizados para el cultivo de vegetales, cereales, maíz y arroz (CPA, 2000), y prácticamente el 55% del consumo mundial de pesticidas está

concentrado en Norte América y Europa Occidental, aunque en los últimos años la demanda procedente del este de Asia ha crecido enormemente.

Tabla 1.2. *Distribución del mercado mundial de pesticidas con respecto a la demanda geográfica y la cuota de mercado de cada pesticida.*

Zona geográfica	Demanda %	Tipo de pesticida	Utilización %
Norte América	29.4	Herbicida	49.6
Este de Asia	25.3	Insecticida	26.2
Europa Occidental	22.4	Fungicida	19.5
Latinoamérica	15.3	Otros	4.7
Europa del Este	2.9		
Resto del mundo	4.7		

Fuente: CPA, 2000

En la Europa Occidental hay aproximadamente 80 millones de hectáreas de cultivo, de las cuales el 50% están destinadas al cultivo de cereales. En prácticamente toda la superficie destinada al cultivo del cereal se utilizan herbicidas, en el 60-80% se utilizan fungicidas y en el 15-98% se usan insecticidas (Bigler et al., 1992). Holanda es el país europeo en el que mayores tasas de aplicación de pesticidas se han registrado, con un promedio de 20 kg de compuestos activos utilizados por hectárea en 1987 (Hurst et al., 1992), si bien dichos valores se han ido reduciendo a un ritmo del 5% al año desde 1991 fruto de una activa política en la reducción de su uso (Eurostat, 1998).

Aunque la cantidad de pesticidas aplicadas con fines agrícolas varía mucho de un año a otro en función de las condiciones climatológicas que condicionan la propagación de plagas y enfermedades en los cultivos, se observa una tendencia global decreciente en el uso de pesticidas. Además del desarrollo de formulaciones cada vez más potentes que permiten reducir sus tasas de aplicación, hay una política en favor de limitar el uso de estos compuestos agroquímicos hasta el mínimo necesario para el control efectivo de las plagas y enfermedades, con el fin de proteger la salud humana y el medio ambiente.

Las formulaciones comerciales de los pesticidas que se usan en campo están compuestas por una serie de constituyentes entre los que se encuentran el ingrediente activo con poder biocida, así como numerosos aditivos (*e.g.*, disolventes, surfactantes,

adyuvantes, antioxidantes, protectores) con el fin de optimizar y prolongar la acción del pesticida, facilitar su aplicación o proteger a los cultivos del propio pesticida. Los pesticidas pueden ser comercializados en forma de concentrados acuosos, concentrados emulsionables, suspensiones concentradas, polvo soluble en agua, polvo humectable, gránulos, etc.

La aplicación de pesticidas puede realizarse en forma de spray (disolución o emulsión de partículas), o dispersados como gránulos, polvo o fumigantes. Generalmente, se aplican disueltos o suspendidos en agua como un fino spray mediante sistemas acoplados a tractores o remolques aspersores. El spray suele aplicarse directamente en la base de los cultivos, excepto en parcelas donde el spray es dirigido hacia arriba a grandes presiones para llegar a los frutos más altos de los árboles.

1.3.2. Tipos de pesticidas agrícolas

La mayoría de los pesticidas usados en la agricultura hoy en día son compuestos químicos orgánicos obtenidos sintéticamente, cuyo fin es acabar con el organismo-diana al cual están dirigidos interfiriendo en sus procesos metabólicos vitales. Dichos procesos metabólicos suelen ser la fotosíntesis (herbicidas), la generación y transferencia de energía (herbicidas y fungicidas), los impulsos nerviosos (insecticidas), el crecimiento y división celular (herbicidas y fungicidas) y la biosíntesis (fungicidas).

1.3.2.1. Herbicidas

Son los pesticidas más ampliamente utilizados, y son aplicados directamente al suelo con el fin de acabar con plantas no deseadas que podrían competir con el cultivo por la luz, el agua y los nutrientes, reduciendo su crecimiento y obteniendo peores rendimientos. Aunque algunos herbicidas son no-selectivos y se utilizan para eliminar toda la vegetación del suelo antes de la siembra, la mayoría necesitan ser selectivos ya que se utilizan durante el cultivo y no pueden perjudicarlo. La selectividad de los herbicidas se puede conseguir además de eligiendo una variedad u otra de herbicida, mediante la tasa y el momento de su aplicación y las diferencias entre ciclos vegetativos

de las especies diana y no diana. Entre las familias de herbicidas, las más utilizadas son las triazinas, los ácidos fenoxiacéticos y los carbamatos.



*Figura 1.8. La amapola, ejemplo de planta no deseada en el cultivo de trigo.
Fuente: Infoagro*

Las **triazinas** incluyen la atrazina, simacina y cyanicina. Son aplicadas como herbicidas de pre-emergencia en forma de spray directamente al suelo y actúan bloqueando uno de los sistemas bioquímicos de transporte más importantes en la fotosíntesis y reduciendo la efectividad de las membranas cloroplásticas. Los típicos efectos de las triazinas son la clorosis y la desecación de las hojas. La atrazina es uno de los pocos herbicidas que pueden representar un riesgo potencial para los mamíferos, pero solo cuando es transformada en el estómago en una forma más cancerígena (Conway y Pretty, 1991).

A diferencia de las triazinas, los **ácidos fenoxiacéticos** son aplicados como herbicidas de post-emergencia directamente sobre el cultivo. Son utilizados para el control de dicotiledóneas ya que son absorbidos en los lípidos de las hojas alterando el normal desarrollo de la planta e interfiriendo en la transcripción del material genético. Algunos de los efectos característicos son la deformación del tallo y las hojas (débil y retorcido crecimiento) y la marchitez de brotes y hojas. Estos compuestos generalmente se degradan rápidamente en contacto con el suelo y no presentan toxicidad para el ser humano.

Los **carbamatos** son utilizados generalmente para el control de herbáceos en el cultivo de cereal. Barban, un carbamato muy común, actúa como retardante del crecimiento de la avena salvaje (*Avena fatua* y *Avena ludoviciana*), aunque es crucial el momento de su aplicación para asegurar la eliminación de las especies no deseadas. La

acción de este herbicida se cree que es vía interferencia en la síntesis y formación de proteínas (Hassall, 1990).

1.3.2.2. Insecticidas

Hay cientos de compuestos diferentes con acción insecticida, pero los más importantes se pueden clasificar en tres grupos: organofosfatos, carbamatos y piretrinas sintéticas, que engloban al 75%. La mayoría de los insecticidas actúan dañando el sistema nervioso de los insectos, afectando directamente a las neuronas, o bien a la transmisión de impulsos nerviosos entre neuronas.

Los insecticidas **organofosforados** son ampliamente utilizados en la agricultura como sustitutos de los persistentes insecticidas organoclorados. Los organofosfatos afectan a los insectos inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa, responsable de la hidrólisis de la acetilcolina, sustancia involucrada en la transmisión de impulsos nerviosos. Uno de los problemas relacionados con el uso de insecticidas organofosforados es que, a pesar de ser degradados relativamente rápido del medio ambiente, son extremadamente tóxicos para los mamíferos mientras permanecen activos.



Figura 1.9. El taladro, un ejemplo de insecto dañino para el cultivo de maíz.

Fuente: Monsanto.

Los **carbamatos** son insecticidas usados para el control de insectos (mosca blanca, cochinilla, cucaracha) que no responden rápidamente a los organofosfatos. Los

carbamatos tienden a tener un efecto relativamente amplio y actúan inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa. Igual que los organofosfatos, los carbamatos muestran una pequeña tendencia a la persistencia medioambiental, pero pueden ser significativamente tóxicos para los mamíferos.

Las **piretrinas** pueden ser naturales o sintéticas. Las piretrinas naturales se extraen de la flor del *Crisantemum cinerariaefolium* y aun están en uso, pero el inconsistente suministro de dichas flores hacía que su precio fuese muy elevado, y por ello, que se estimulara en 1970 la búsqueda de un proceso para la elaboración de piretrinas sintéticas. Las piretrinas se caracterizan por tener un rápido efecto de “knock down” en la mayoría de los insectos atacando el sistema nervioso central y periférico. Tienen muy baja toxicidad en mamíferos y una persistencia en el medio ambiente muy limitada, dado que los compuestos activos, ésteres de ácidos y alcoholes asimétricos, son rápidamente hidrolizados en agua y degradados por la luz.

1.3.2.3. Fungicidas

El uso de fungicidas para controlar las enfermedades propias de los cultivos presenta diferencias significativas con respecto al de insecticidas o herbicidas. Hay básicamente cuatro tipos diferentes de fungicidas: inorgánicos, fenilaminas, carboxamidas y triazoles. En general se sabe muy poco de su modo de acción para con las poblaciones fúngicas.



Figura 1.10. Presencia del hongo Mildiu en cultivo de vid. Fuente: Infojardín.

Los hongos tienen la habilidad de regenerarse y propagarse a partir de una pequeña población inicial en un periodo relativamente corto de tiempo. La aplicación de

un fungicida a un cultivo infectado tiene poco efecto, pues los daños al cultivo ya se han producido y rara vez son reversibles. Es por esta razón que resulta crucial aplicar el fungicida al cultivo antes de la llegada de la infección, o en los primeros estadios de ésta. La aplicación de fungicidas sistémicos o de contacto puede llevarse a cabo empapando el suelo, con revestimientos de tallos y raíces o sprays foliares.

Los **fungicidas inorgánicos** han sido tradicionalmente utilizados para prevenir enfermedades fúngicas en cultivos de uva, frutales, lúpulo, patatas, cebollas y del género de las brásicas. Dentro de este grupo, se encuentran muchos compuestos complejos de metales de transición, como las mezclas de Burdeos, el cloruro de mercurio y la trifeniltina. La mezcla de Burdeos es una combinación de sulfato de cobre y cal apagada que forma un precipitado gelatinoso que puede usarse contra una gran variedad de enfermedades fúngicas, tanto en forma de polvo, o mezclado con agua y aplicado mediante spray. En contacto con los hongos, el cobre del precipitado es solubilizado y acomplejado por los exudados de las esporas de los hongos, y al entrar en contacto con éstas, sus efectos tóxicos empiezan a manifestarse.

Dentro de las **fenilaminas** se pueden encontrar conocidos fungicidas como el metalaxil, el ofurade y el oxadixil. Son utilizados intensivamente en el control de ciertos grupos de hongos conocidos como oomicetos, que son sistémicos con la planta huésped. Estos microorganismos producen esporas móviles que requieren de agua para su transporte hasta el organismo huésped e infectarlo. El metalaxil es un fungicida especialmente efectivo contra esta familia de hongos como el mildiu de la patata causado por *Phytophthora infestans*. Su modo de acción se basa en la interferencia con las enzimas que controlan la regeneración y esporulación fúngicas, inicialmente deteniendo su crecimiento y posteriormente matando al microorganismo.

Las **carboxamidas**, u oxatinas, son usados ampliamente contra la *Fusariosis* y la *Septoriosis* en el cultivo del cereal. La carboxina, uno de las carboxamidas más utilizadas, inhibe las enzimas implicadas en el metabolismo y respiración fúngica en poblaciones responsables del tizón o caries del cereal (*Ustilago nuda*). Como muchos otros fungicidas y herbicidas, las carboxamidas tienen limitada toxicidad en mamíferos.

La familia de los **triazoles** es de reciente desarrollo e incluye fungicidas muy utilizados como el epoxinocazol, tebuconazol o el fluconazol. Estos fungicidas actúan

como inhibidores de una enzima específica, la C14-dimetilasa, que juega un papel fundamental en la producción de esteroides como el ergosterol, necesarios para mantener el funcionamiento y la estructura de la membrana celular fúngica. Por ello, los triazoles inducen el anormal desarrollo de las estructuras celulares en hongos y su posterior muerte. Su modo de acción es sistémico, preventivo y en ocasiones curativo. Resultan altamente efectivos contra numerosas enfermedades fúngicas provocadas por hongos pertenecientes a los ascomycetes, basidiomycetes y deuteromycetes, no solo de forma preventiva sino también curativa. Son utilizados en muchos tipos de cultivo diferentes como árboles frutales, frutos secos, hortalizas e incluso en el césped.

1.3.3. Comportamiento de los pesticidas en los agroecosistemas

El comportamiento de los pesticidas en el suelo está condicionado por una gran variedad de factores físicos, químicos y biológicos, incluyendo, la adsorción-desorción, solubilización, volatilización, degradación química y biológica, absorción por las plantas, lixiviación y escorrentía. Estos procesos controlan directamente el transporte de los pesticidas en el suelo y posteriormente al agua, aire y los alimentos, así como su impacto en organismos-no-diana. La relativa importancia de cada uno de estos factores varía con la naturaleza del pesticida y las propiedades del suelo, pero de entre ellos dos son los procesos clave: la adsorción y la degradación (Linn et al., 1993).

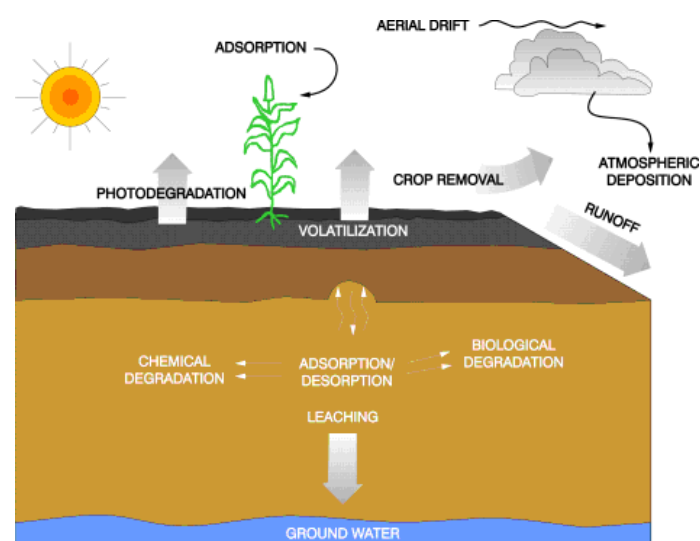


Figura 1.11. Procesos que determinan la persistencia de los pesticidas en el medio.
Fuente: Gobierno de Alberta.

1.3.3.1. Interacción pesticida-suelo

Muchos pesticidas tienen carácter no iónico, no polar y fuertemente hidrofóbico, y al interactuar con la gran variedad de compuestos que constituyen la M.O. del suelo (*e.g.*, hidroxilos, carboxilos, fenoles, aminas) muestran una gran tendencia a quedar adsorbidos a ésta (Spark y Swift, 2002; Coquet, 2003).

La **adsorción** es un proceso por el cual un soluto, en este caso un pesticida, transportado en fase acuosa o gaseosa es retenido en un sólido poroso tras entrar en contacto con éste. En el caso de la adsorción pesticida-suelo, ésta suele tener lugar mayoritariamente en fase líquida, ya que el pesticida es transportado normalmente disuelto en agua hasta la superficie de las partículas de suelo, las cuales a su vez están recubiertas por una fina capa de agua.

De la misma forma que queda retenido, puede darse el proceso contrario, la **desorción**, y el pesticida retenido en el suelo puede pasar de nuevo a la fase acuosa o gaseosa. En función del equilibrio entre ambos procesos se hablará de adsorción reversible o irreversible (Monkiedje y Espiteller, 2002).

El grado de adsorción de un pesticida al suelo viene determinada por un parámetro físico-químico del propio pesticida: la constante de adsorción (K_{oc}), que representa el cociente entre la concentración del pesticida en el suelo (C_s) al quedar adsorbido a éste (fundamentalmente a la fracción orgánica) y la concentración del pesticida en el agua que está en equilibrio con dicho suelo (C_e):

$$K_{oc} = \frac{C_s}{C_e} \quad (1.1)$$

Sin embargo, la mayoría de autores afirman que los modelos basados en las isothermas de Freundlich describen más correctamente los procesos de adsorción de pesticidas. Dichos modelos se caracterizan por contemplar diferentes valores de adsorción del pesticida al suelo en función de su concentración inicial (Beltran et al., 1995). La ecuación correspondiente a la isoterma de Freundlich es:

$$C_s = K_f \cdot C_e^n \quad (1.2)$$

donde C_s es la concentración del pesticida adsorbido al suelo, C_e es la concentración del pesticida en la disolución acuosa en equilibrio con el suelo, K_f es la constante de adsorción de Freundlich, y n es un coeficiente que indica el grado de adsorción.

El contenido en arcilla del suelo también puede desempeñar un papel importante en el comportamiento de los pesticidas. Las partículas de arcillas ($<2 \mu\text{m}$), en particular los aluminosilicatos, tienen una gran área superficial ($700\text{-}800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y pueden poseer carga negativa permanentemente, de forma que pueden interaccionar con los pesticidas iónicos o ionizables. Muchas de las atrazinas, por ejemplo, son bases débiles en medio ácido y uno de los grupos amino que poseen puede protonarse favoreciendo su adsorción a las arcillas a pH bajos (Arias-Estévez et al., 2008).

Los procesos de adsorción-desorción tienen una gran importancia ya que no solo determinan la cantidad de pesticida presente en la fase acuosa del suelo, sino que también afectan al resto de procesos que pueden experimentar los pesticidas en el medio (Fernandes, 2004) como por ejemplo:

- i. La adsorción del pesticida puede inactivarlo y hacerlo más susceptible a la biodegradación, o bien, reducir su biodisponibilidad, y por tanto, su degradación por parte de los microorganismos del suelo (Barriuso et al., 1997).
- ii. Al quedar adsorbido a las partículas de suelo se reduce su movilidad y por tanto su susceptibilidad a ser lixiviado (Cox et al., 2000). Sin embargo, aumenta la posibilidad de ser arrastrado por escorrentía y erosión del suelo (Cox et al., 2000).
- iii. Su adsorción al suelo puede reducir sus pérdidas por fotodegradación (Sukul y Spiteller, 2001) y volatilización (Chester et al., 1989).

1.3.3.2. Degradación de pesticidas en el suelo

La degradación es el proceso más importante responsable de la eliminación de los pesticidas presentes en el medio (Guo et al., 2000). Este proceso puede tener lugar a través de mecanismos tanto abióticos (fotodegradación y degradación química) como bióticos (biodegradación). Es el resultado de una serie de complejas transformaciones que dependen de las características tanto del propio pesticida como del medio (Topp et

al., 1997): estabilidad química del pesticida, tipo de cultivo, adsorción al suelo, radiación solar, propiedades físico-químicas del suelo, estado de las poblaciones microbianas edáficas, etc.

La **degradación química** es llevada a cabo a través de reacciones de hidrólisis y oxidación de los pesticidas sobre las superficies de arcillas, óxidos metálicos, iones metálicos, sustancias húmicas y materiales orgánicos diversos presentes en el suelo que actúan a modo de catalizadores (Fernandes, 2004). El pH suele desempeñar un papel clave en dichas reacciones (Bending et al., 2006)

La **fotodegradación** consiste en la degradación del pesticida como consecuencia de la acción directa de la radiación solar sobre la molécula. Debido a su dependencia con la luz procedente del sol, esta reacción solo es posible en los primeros centímetros del suelo, en la superficie de las plantas y en los cursos de agua superficial (Fernandes, 2004).

Sin embargo, de entre los diferentes mecanismos de degradación de pesticidas posibles, la mediada por los microorganismos o **biodegradación** es considerada como la principal vía de eliminación de pesticidas del suelo (Aislabie and Lloyd-Jones, 1995; Bending et al., 2006). La susceptibilidad de un pesticida sintético a ser degradado por los microorganismos del suelo está condicionada por el grado de similitud de la estructura molecular sintética con los sustratos orgánicos naturales que usualmente metabolizan las poblaciones microbianas del suelo (Merrington et al., 2002). Grandes moléculas orgánicas en forma de anillo o cadenas largas son degradadas mucho más lentamente que las cadenas cortas y simples. Adicionalmente, la presencia de cloro aumenta su toxicidad y su persistencia en el suelo. En algunos casos, la exposición a un pesticida persistente durante un periodo de tiempo prolongado, ha inducido al desarrollo de ciertas poblaciones microbianas capaces de degradar dichas estructuras; este fenómeno puede ocasionar una reducción significativa en la eficacia de los pesticidas, sobre todo en el caso de herbicidas y fungicidas.

Cuando la degradación de los pesticidas está llevada a cabo por los microorganismos presentes en el suelo, suele describir un descenso exponencial siguiendo una cinética de primer orden (Kovárová-Kovar y Egli, 1998), en la cual se asume que la cantidad de pesticida degradado por unidad de tiempo es directamente

proporcional a la cantidad de pesticida presente en el suelo, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$C_s = C_o \cdot e^{-kt} \quad (1.3)$$

siendo C_s la concentración de pesticida en el suelo a tiempo t , C_o la concentración inicial de pesticida en el suelo y k la constante cinética de degradación microbiana. No obstante, recientemente se está comprobando como las expresiones bi-exponenciales responden mejor al comportamiento bifásico que presentan numerosos pesticidas, con una primera fase de rápida degradación seguida por un prolongado periodo en el que la concentración del pesticida disminuye lentamente (Leake et al., 1995; Lee et al., 2004):

$$C_s = A \cdot e^{-k_1t} + B \cdot e^{-k_2t} \quad (1.4)$$

siendo C_s la concentración de pesticida en el suelo a tiempo t , A y B constantes relacionadas con la concentración inicial de pesticida en el suelo, y k_1 y k_2 las constantes cinéticas de degradación microbiana. En cualquier caso, la biodegradación de un pesticida viene caracterizada por su tiempo de vida medio en el suelo ($t_{1/2}$), esto es, el tiempo necesario para que su concentración se reduzca a la mitad del valor inicial.

La M.O. del suelo juega un papel fundamental en la degradación de los pesticidas. Como se ha comentado anteriormente, los pesticidas que impactan en el suelo tienden a quedar adsorbidos a los compuestos orgánicos presentes en él, reduciendo no solo su lixiviación, sino también su biodisponibilidad y por tanto su biodegradación (Barriuso et al., 1997). Sin embargo, al mismo tiempo, las poblaciones microbianas obtienen los nutrientes necesarios para su desarrollo de la M.O. presente en el suelo. Sin embargo, la M.O. no está uniformemente distribuida en suelo, sino que muestra un gradiente decreciente a medida que la profundidad del suelo aumenta. Por ello, una vez que los pesticidas atraviesan la capa superficial del suelo, más activa biológicamente, sus tasas de biodegradación disminuyen considerablemente, encontrándose valores de degradación 5-20 veces menor que en los primeros centímetros de suelo (Rodríguez-Cruz et al., 2006).

1.3.3.3. Pérdidas de pesticidas en el suelo

Una de las vías más comunes de dispersión de pesticidas en el medio es a través del agua, mediante lavado de superficies foliares, escorrentía superficial o lixiviación. Mientras la escorrentía incide en la calidad de las aguas superficiales, la lixiviación está vinculada a las aguas subterráneas.

El agua de **escorrentía** se define como aquella que fluye libremente por la superficie del suelo (o cualquier otra superficie) sin infiltrarse en el terreno tras un episodio de precipitación o riego. Mientras el agua de escorrentía fluye a través de una parcela agrícola, ésta puede incorporar pesticidas tanto directamente por disolución como por arrastre de partículas de suelo a las que se encuentran adsorbidos (van der Werf, 1996).

Aunque tradicionalmente se han estudiado por separado los procesos de contaminación de aguas superficiales y subterráneas, las conexiones existentes entre ellas a través del ciclo hidrológico del agua, hacen necesario un enfoque mucho más amplio a la hora de estudiar el movimiento de contaminantes persistentes, como es el caso de los pesticidas.

Al igual que ocurría en el caso de los NO_3^- , las pérdidas de pesticidas por **lixiviación** tienen lugar cuando los aportes de agua exceden a las pérdidas por evapotranspiración y el contenido en agua del suelo excede la capacidad de campo. Llegado a este punto, el agua de drenaje comienza a descender a través del perfil del suelo arrastrando con ella a todos los compuestos que sean susceptibles de disolverse en fase acuosa. La susceptibilidad de un pesticida a ser lixiviado depende por ello de las características físico-químicas del propio pesticida (coeficiente de adsorción y solubilidad), de las propiedades del suelo y del tiempo que permanezca dicho pesticida en el medio.

Cualquier factor que modifique la actividad microbiológica (*e.g.*, disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, variaciones de temperatura y humedad) incidirá en la capacidad biodegradadora del suelo y, por lo tanto, alterará el tiempo que estará presente el pesticida y su tendencia a ser lixiviado (Webb y Aylmore, 2002).

En muchos suelos la presencia de macroporos (fracturas, galerías de gusanos, canales radiculares) aumenta la lixiviación de pesticidas al medio subterráneo, ya que

no solo aumenta la velocidad de drenaje del agua, sino que los pesticidas disminuyen su contacto con el suelo, evitando los mecanismos naturales de eliminación (Cullum, 2009).

Además de en fase acuosa, los pesticidas pueden desaparecer del medio en fase gaseosa mediante su **volatilización**, ya sea desde el suelo o desde la superficie de las hojas. No solo influye la volatilidad del propio pesticida sino que también influyen el método de aplicación o las condiciones ambientales en el momento de su utilización, las cuales pueden llegar a provocar pérdidas de hasta un 90% (Bedos et al., 2002). La volatilización de pesticidas persistentes y su posterior deposición-precipitación a escala planetaria son mecanismos que explican su presencia en cursos de agua a grandes distancias de sus puntos de aplicación e incluso en lugares remotos como la nieve del ártico (Siebers et al., 1994; Cleeman et al., 1995)

La **absorción por parte de las plantas** es otra de las vías por las que los pesticidas desaparecen del suelo, aunque en este caso, no se reduce su peligrosidad, ya que implica su introducción en la cadena trófica. Este proceso depende de muchos factores relacionados con el metabolismo y naturaleza de las plantas así como de la bioaccesibilidad del pesticida (Juraskie et al., 2009). La absorción por el sistema radicular de las plantas tiene lugar si el pesticida es relativamente soluble en agua y muestra cierto grado de lipofilicidad. La absorción de pesticidas volatilizados a través de las hojas de las plantas también puede tener lugar y, en algunos casos, puede hasta ser más importante que la absorción radicular (Topp et al., 1986).

1.3.4. Aditivos presentes en los pesticidas comerciales

Los pesticidas no son aplicados en campo como productos puros, sino que las formulaciones comerciales, además del compuesto activo con poder biocida, contienen una serie de elementos que modifican ciertas propiedades del pesticida (Makepeace, 1996). Hay una gran variedad de aditivos tanto de origen sintético (permeabilizantes no iónicos) como de origen natural (aceite de colza emulsionado) cuyas funciones son: aumentar la persistencia de los pesticidas en el suelo, insolubilizarlos para evitar su lavado de las superficies foliares, aumentar su absorción por parte de plantas no

deseadas, aumentar la actividad del compuesto activo, facilitar su aspersión, etc. (Krogh et al., 2003).

Estos compuestos modifican el comportamiento de los pesticidas en el suelo con el fin de aumentar su efectividad y prolongar su poder biocida. Es por ello que los potenciales efectos adversos en el medio ambiente causados por las formulaciones comerciales de los pesticidas pueden variar sustancialmente de las estimadas para los pesticidas químicamente puros (Krogh et al., 2003).

1.3.5. Problemas de la contaminación por pesticidas

Los impactos medioambientales de los pesticidas están ligados tanto al tipo de pesticida, como al método, lugar y momento de su aplicación (Miller et al., 1991). Esta problemática no fue objeto de estudio hasta que Rachel Carson puso de manifiesto los impactos derivados del uso de DDT a través de su famoso libro Primavera Silenciosa (Carson, 1985).

Un pesticida ideal sería selectivo (afectando únicamente a su organismo-diana), y no persistente (no teniendo efectos negativos en el medio ambiente). Sin embargo, la mayoría de los pesticidas no cumplen con estas 2 características. Estos compuestos xenobióticos inducen efectos adversos en otros organismos-no-diana y tienden a acumularse en los ecosistemas. Los pesticidas pueden provocar contaminación puntual o difusa por diferentes medios:

- i. Contaminación directa de las aguas subterráneas y superficiales.
- ii. Contaminación del suelo y posteriormente de las aguas superficiales y subterráneas por lixiviación o arrastre superficial con agua de lluvia o erosión del suelo.
- iii. Efectos tóxicos directos en organismos-no-diana.
- iv. Efectos tóxicos indirectos en organismos-no-diana por bioacumulación.

La contaminación puntual es generalmente causada por malas prácticas agrícolas que incluyen su inadecuado almacenamiento, equipamiento defectuoso o anticuado, lavado de áreas de manipulación de pesticidas en los que se han producido vertidos

accidentales, o eliminación ilegal de restos de envases contenedores de pesticidas (Miller, 1991). La contaminación difusa, la más generalizada, puede tener lugar a pesar de la adopción de buenas prácticas agrícolas, ya que una parte significativa de los pesticidas aplicados inevitablemente no acaba en su organismo-diana. Pimentel (1995) estimó que apenas el 0,1% de los pesticidas aplicados consigue llegar a sus organismos-diana.

1.3.5.1. Resistencia o resurgencia

Cuando los organismos-diana son expuestos regularmente a una gran gama de pesticidas, generalmente acaban desarrollando cierta resistencia a éste, fruto de un continuo proceso de selección inducida. Los insectos pueden desarrollar resistencia a los pesticidas mediante cutículas menos permeables, reteniéndolas en las partes grasas, o mediante cambios en sus sistemas metabólicos que les pueden llegar a permitir su eliminación (van Emden, 1992). Los individuos (insectos, hongos y plantas) resistentes a los pesticidas no son habituales en el medio, y por ello inicialmente dichos compuestos resultan muy efectivos. Sin embargo, su uso continuado favorece la selección de los individuos más resistentes, de forma que la eficacia del pesticida se reduce con la propagación de los organismos resistentes (Merrington et al., 2002).

A medida que los organismos-diana son cada vez más resistentes y los pesticidas van perdiendo efectividad, muchos agricultores se ven forzados a intensificar su utilización, aplicando cantidades cada vez mayores de pesticidas o combinaciones de ellos, con el fin de mantener los rendimientos del cultivo.

Otra consecuencia del uso de pesticidas es la resurgencia de poblaciones no deseadas. Este fenómeno es causado por la aplicación de pesticidas de amplio espectro, los cuales afectan no solo a los organismos-diana, sino también a sus enemigos naturales, de forma que si el pesticida es aplicado en el momento no adecuado, los organismos-diana podrían propagarse rápidamente ante la falta de enemigos naturales que controlen su crecimiento (Merrington et al., 2002).

1.3.5.2. Toxicidad en el ser humano

La mayor parte del agua potable en Europa proviene de ríos y acuíferos subterráneos. Sin embargo, los episodios de contaminación difusa de recursos hídricos por pesticidas de origen agrícola ha provocado que en muchas zonas agrícolas la concentración de pesticidas en las aguas destinadas a consumo humano exceda el máximo permitido por la directiva europea para aguas potables (2006/118/CE): $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ hasta un máximo de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ teniendo en cuenta la suma de todos los pesticidas presentes en el agua así como sus metabolitos.



Figura 1.12. Principales núcleos de población afectada por pesticidas de origen agrícola. Fuente: Worstpolluted.

Aunque la mayor fuente de exposición a los pesticidas en los seres humanos no sea su ingesta a través de aguas potables, el tratamiento necesario para eliminar dichos compuestos de las aguas de consumo humano supone unas inversiones muy costosas. Este hecho es debido a que aunque los pesticidas a bajas concentraciones pueden no implicar un daño directo e instantáneo en la salud del ser humano, es su carácter bioacumulativo el que les confiere una gran peligrosidad.

Los pesticidas pueden introducirse en el organismo a través de la ingesta de alimentos y agua, de la respiración o del contacto directo. Si la tasa de metabolización y excreción de un compuesto es baja, o su tendencia a quedarse retenido en los almacenamientos de lípidos del organismo es alta (compuesto lipofílico), se dice que el

compuesto tiene tendencia a bioacumularse, presentando los organismos una concentración del compuesto mayor que su concentración en el medio que le rodea.

En el caso de los pesticidas, muchos de ellos presentan dicha tendencia a la bioacumulación, afectando no solo al organismo bioacumulador, sino que se acumula a lo largo de toda la cadena trófica, incrementándose escalón tras escalón, proceso conocido como bioacumulación (Cooper, 1991). Ejemplo de dicha bioacumulación es la presencia de numerosos pesticidas así como de metabolitos procedentes de su degradación en la sangre humana e incluso la leche materna (Campoy et al., 2001). Los efectos tóxicos de los pesticidas, especialmente aquellos de naturaleza crónica, pueden ser muy diversos: carcinogénesis, inmunodeficiencias, mutagénesis, neurotoxicidad y teratogénesis.

1.3.5.3. Toxicidad en organismos-no-diana

Aunque los pesticidas son diseñados para afectar a unos pocos organismos-diana, su aplicación generalmente tiene impactos en el conjunto del ecosistema, afectando a una gran variedad de organismos-no-diana. Este hecho puede llegar a provocar un efecto negativo sobre el propio cultivo, ya que muchos de ellos pueden desempeñar alguna función beneficiosa para los agroecosistemas. Es el caso de las lombrices de tierra, las cuales a pesar de contribuir a airear el suelo y al reciclaje de los nutrientes, suelen verse perjudicadas por la presencia de una gran variedad de pesticidas en el suelo, con lo que sus poblaciones se ven reducidas considerablemente (Schreck et al., 2008). Otro de los importantes impactos de los pesticidas en organismos-no-diana beneficiosos para la agricultura es la reducción en la población de abejas que se viene observando en los últimos años a nivel mundial, aunque aún no se ha podido comprobar la vinculación de este fenómeno con la presencia de pesticidas. De la misma forma resultan perjudicados otros insectos, plantas, aves, peces, mamíferos e incluso microorganismos.

Aunque la mayoría de los pesticidas son usados para el control de organismos no deseados presentes en las partes aéreas de las plantas (con la excepción de aquellos que afectan a las raíces de las plantas), una parte significativa de los pesticidas acaban

llegando al suelo por arrastre del agua de lluvia o riego, donde impactan con las poblaciones microbianas del suelo.

Como se ha comentado anteriormente, la degradación microbiana representa la principal vía de eliminación de los pesticidas que llegan al suelo. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que al mismo tiempo los microorganismos pueden resultar perjudicados por la presencia de dichos pesticidas (Monkiedje et al., 2002; Bending et al., 2006; Lupwayi et al., 2010). Dado que los microorganismos desempeñan un papel fundamental en el reciclaje de los nutrientes del suelo, y por tanto en su fertilidad, determinar los posibles impactos de los pesticidas en las poblaciones microbianas del suelo es de vital importancia para la agricultura.

1.4. La importancia del recurso suelo en la agricultura

Desde los inicios de la cultura occidental, los griegos identificaron al elemento suelo como uno de los cuatro pilares de nuestro sistema natural, junto con el fuego, el aire y el agua. Sin embargo, y pese a su omnipresencia en casi todas las actividades humanas, y a su papel crucial en el soporte y funcionamiento de los ecosistemas, su percepción real se ha mantenido generalmente en un segundo plano frente a otros componentes del sistema natural. Su consideración como campo independiente de estudio sólo ha ido ganando terreno lentamente, y en general, con orientaciones basadas en su potencial de uso agrario más que como ente natural en toda su complejidad (Rubio y Recatalá, 1998).

El suelo, al igual que lo discutido anteriormente con el agua, es el otro gran recurso al que la agricultura está estrechamente vinculada y del cual depende su sostenibilidad. Una agricultura de calidad requiere de un suelo de calidad y viceversa.

1.4.1. El suelo: definición y funciones

Se denomina suelo a la parte no consolidada y superficial de la corteza terrestre, cuya formación es el resultado de la alteración de la superficie de las rocas emergidas por la acción combinada de la climatología local y de los seres vivos con el paso del

1. Introducción

tiempo (Smeck et al., 1983). Constituye uno de los pocos sistemas en los que tanto la geosfera, la hidrosfera, la atmósfera y la biosfera están presentes, interrelacionándose estrechamente entre sí. Dado que su composición es muy heterogénea presenta una distribución variable de sus fracciones sólida (arcillas, arenas, limo y materia orgánica), líquida (agua), gaseosa (aire) y viva (macro y microorganismos), no solo en función de la región en la que se encuentre, sino que también a lo largo del perfil de suelo (profundidad).

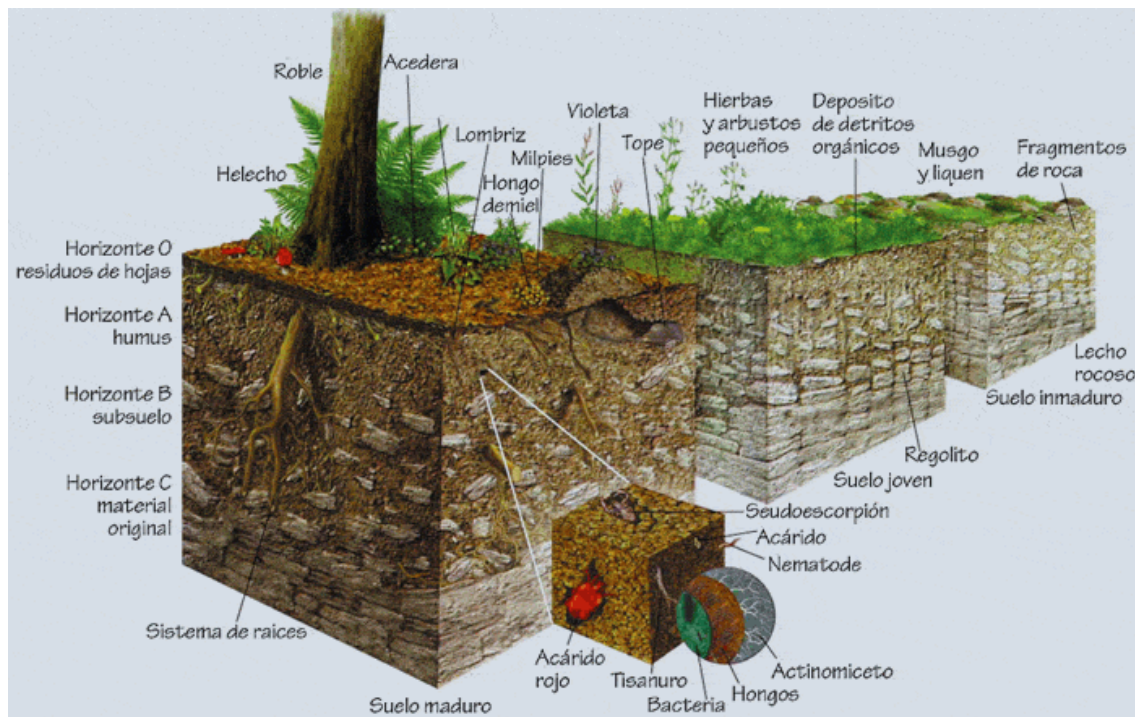


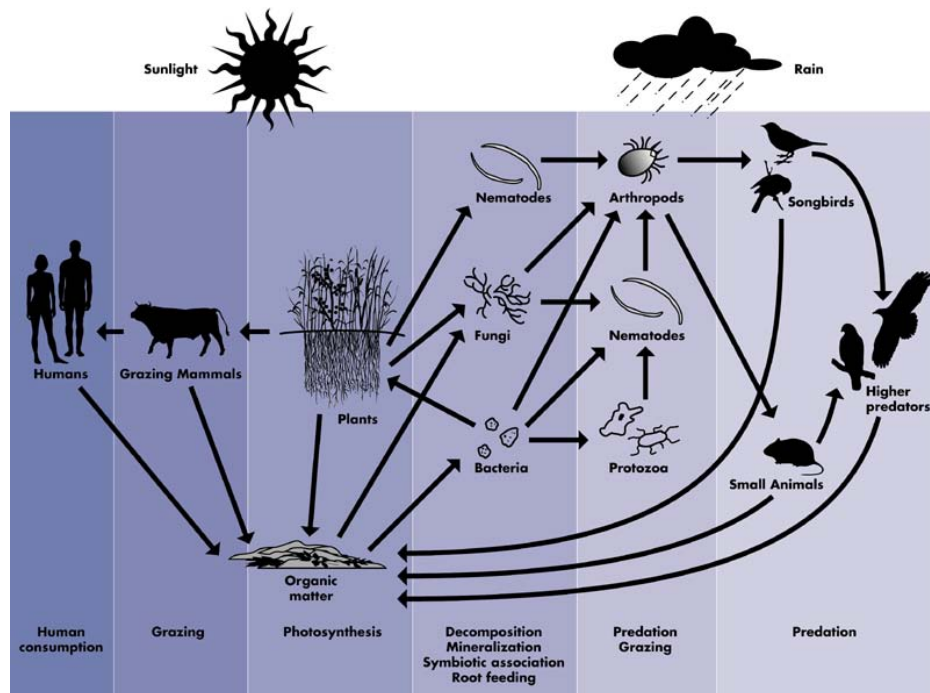
Figura 1.13. Formación y composición de un suelo natural.
Fuente: American Planning Association.

La concepción tradicional del suelo lo consideraba como un recurso inagotable que servía de soporte mecánico para la mayoría de las actividades llevadas a cabo por el ser humano (vivienda, trabajo, socialización) y del cual se podían extraer continuamente materias primas (minerales y fibras) y alimentos. Dicha concepción contrasta con la visión actual del suelo como un recurso no renovable, dinámico y vivo, y cuyo estado ecológico es vital tanto para la producción de alimentos como para el funcionamiento de los ecosistemas locales, regionales y globales (Doran, 2002).

Junto con las dos funciones clásicas antropocéntricas, se incluyen otras que resultan clave desde el punto de vista medioambiental (Rosewell, 1999):

- i. Regula la actividad biológica y los intercambios de materia y energía entre las distintas fases (sólido, líquido y gas) controlando el crecimiento de las plantas, la descomposición de la materia orgánica y el reciclado de nutrientes.
- ii. Influye en la distribución del agua de escorrentía, infiltración y lixiviación, actuando como un inmenso almacenamiento temporal de agua que regula los flujos de agua superficiales y subterráneos.
- iii. Actúa a modo de filtro natural, protegiendo la calidad del agua y el aire, reteniendo los contaminantes (nutrientes en exceso y compuestos tóxicos) y regulando su posterior degradación o solubilización.
- iv. Representa la mayor biodiversidad del mundo, albergando una inmensa variedad de especies vegetales y animales a escala tanto macroscópica como microscópica.

Todas las funciones anteriormente descritas son el resultado de una compleja red de interacciones entre los diferentes elementos que componen el sistema suelo. Aunque resulta difícil atribuir cada una de dichas funciones a un único elemento de los que componen el ecosistema suelo, o resaltar la importancia de uno sobre el resto, sí se puede afirmar que los microorganismos juegan un papel destacado en todas ellas. Participan activamente en la formación de nuevo suelo mediante la transformación de las estructuras orgánicas vegetales y animales en humus (Lupwayi et al., 2001). Los ciclos de los principales nutrientes en la naturaleza (carbono, nitrógeno, azufre y fósforo) incluyen procesos relacionados con las poblaciones microbianas del suelo (Lupwayi et al., 2006). Análogamente, ellas son las encargadas de la eliminación de la mayor parte de los compuestos tóxicos que llegan al suelo, evitando sus impactos negativos en la calidad de las aguas subterráneas y en otros seres vivos (Smith, 1989). Es por ello que los microorganismos están involucrados en todas aquellas transformaciones químicas y biológicas necesarias para el mantenimiento de la fertilidad y la vida en el suelo.



*Figura 1.14. Importancia del reciclaje de nutrientes en la cadena trófica.
Fuente: Biocharfarms.*

1.4.2. Calidad del suelo

De forma análoga al aire o al agua, la calidad del recurso suelo tiene un profundo impacto en la salud y productividad de cualquier organismo con el que esté relacionado. Sin embargo, mientras los estándares de calidad para el agua y el aire están ampliamente desarrollados, la definición y cuantificación de la calidad del suelo es complicada ya que el suelo no es directamente ingerido ni respirado como pasa con el agua o el aire. El concepto de la calidad del suelo ha sido tradicionalmente entendido como una característica abstracta vinculada a la utilidad que de él se hace, por lo que está fuertemente influenciado por los factores sociales, políticos y económicos de un determinado momento histórico, obviando las circunstancias de las generaciones futuras (Pankhurst et al., 1997).

Basándose en que el suelo se puede considerar un sistema vivo y con unas funciones determinadas dentro de los ecosistemas, en 1996 la Sociedad Americana de las Ciencias del Suelo formuló la siguiente definición sobre calidad o salud de un suelo: “su capacidad para funcionar como un sistema vivo, dentro de los límites de los ecosistemas tanto naturales como gestionados por el ser humano, manteniendo la

productividad biológica, preservando o mejorando la calidad del medio ambiente y salvaguardando la salud de las plantas, los animales y las personas” (Doran y Parkin, 1996; Pankhurst et al., 1997). Los términos “calidad” y “salud” del suelo frecuentemente se usan indistintamente en la literatura científica y divulgativa, aunque el término “calidad del suelo” tiende a emplearse en aquellos casos en los que se especifica el uso que se pretende dar a ese suelo (Doran y Parkin, 1994). Así, para Carter et al. (1997), calidad del suelo es: “el grado de aptitud de un suelo para desempeñar una función determinada”.

Al igual que ocurre con el aire o con el agua, es necesario desarrollar una serie de parámetros indicadores de la calidad del suelo, así como estandarizar los procedimientos de medida de dichos parámetros (Larson y Pierce, 1991). Con el fin de que dichos indicadores sean prácticos para todos los sectores involucrados en la gestión y conservación del recurso suelo, deben cumplir una serie de características:

- i. Correlacionarse bien con los procesos del ecosistema.
- ii. Integrar propiedades físicas, químicas y biológicas representativas de las funciones del suelo que de otra forma sería imposible medir.
- iii. Ser relativamente fáciles de medir en condiciones de campo tanto por especialistas como productores y gestores.
- iv. Ser sensibles a la presencia de perturbaciones externas, tanto naturales como antropogénicas.

A diferencia del agua o del aire, la gran variedad de suelos presentes en el planeta hace que resulte especialmente complicado fijar unos valores de referencia únicos que definan un suelo de calidad. Es por ello que resulta necesaria la elaboración de una base de datos fiable que recoja las características de los diferentes tipos de suelo lo más inalterados posible.

Los indicadores de la calidad del suelo deben ser representativos de su estado ecológico, definido según el mayor o menor grado de desempeño de sus funciones naturales. Tradicionalmente, se han clasificado en indicadores físicos, químicos y biológicos dependiendo de la naturaleza del parámetro analizado. Sin embargo, dichas categorías no siempre están bien definidas ya que determinados parámetros pueden

trascender a más de una naturaleza (Karlen et al., 2008). Por ejemplo la M.O., o más específicamente, el carbono orgánico, influye en las 3 categorías y es uno de los parámetros con mayor influencia en la calidad del suelo: afecta a la estabilidad de sus agregados (física), aumenta la retención y disponibilidad de nutrientes (química) y permite el desarrollo de la microbiota edáfica (biológica).

1.4.2.1. Indicadores físicos

Los indicadores físicos aportan información relacionada con la capacidad de aireación y las propiedades hidrológicas del suelo. Dado que dichas propiedades influyen en la profundidad y el volumen de la zona radicular, también afectan a la disponibilidad de nutrientes y al crecimiento de las plantas. Estas herramientas actúan a modo de indicadores de la capacidad del suelo para resistir frente a fuerzas físicas asociadas con el arrastre del agua de lluvia y del viento, que contribuyen a la ruptura de los agregados del suelo, a su dispersión y, finalmente, su erosión. Algunos de los indicadores físicos más utilizados son, en otros, la estructura del suelo, la estabilidad de sus agregados, la capacidad de campo y de infiltración hídrica, y la densidad aparente (Doran y Parkin, 1996).

1.4.2.2. Indicadores químicos

Los indicadores químicos de la calidad del suelo aportan información sobre el equilibrio químico entre las fracciones sólida y acuosa, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de compuestos potencialmente contaminantes. Así, por ejemplo, al estudiar el ciclo del nitrógeno, el contenido en NH_4^+ y NO_3^- del suelo actúan a modo de indicadores del equilibrio entre las reacciones de mineralización del nitrógeno orgánico, nitrificación y desnitrificación. Si bien, tradicionalmente se basaban en la simple caracterización cuantitativa de cada uno de los elementos analizados, la tendencia actual es hacia el análisis cualitativo de las diferentes fracciones en las que algunos parámetros, tales como los relacionados con la M.O. o los metales, están presentes en el suelo, con el fin de conocer su biodisponibilidad o recalcitrancia. Algunos de los parámetros químicos más utilizados son la M.O., componente fundamental del suelo y de su fertilidad, o el contenido en nitrógeno, fósforo y potasio extraíbles, los cuales

indican la disponibilidad de nutrientes esenciales para las plantas, así como su susceptibilidad a ser lavados del medio por lixiviación o escorrentía. Adicionalmente, el pH y la conductividad eléctrica son el resultado de la presencia de multitud de compuestos químicos presentes en el suelo y establecen los límites para el crecimiento óptimo de plantas y microorganismos (Doran y Parkin, 1996).

1.4.2.3. Indicadores biológicos

Los indicadores biológicos son todos aquellos organismos, grupos de organismos, partes de un organismo, productos de un organismo o procesos biológicos que pueden ser utilizados para obtener información sobre una parte o el conjunto del medio ambiente (Wittig, 1993).

Aunque históricamente la determinación de la calidad del suelo se ha basado en parámetros físico-químicos, por su mayor facilidad de medida y de interpretación, los indicadores biológicos están ganando terreno gracias a su carácter integrador de la totalidad de las propiedades físicas, químicas y biológicas que definen al ecosistema suelo, en el tiempo y en el espacio (Pankhurst, 1997). A su vez, gracias a su mayor rapidez de respuesta ante las perturbaciones introducidas en el medio, pueden proporcionar una señal de alarma en las primeras fases de una perturbación. Gracias a ello, los gestores del suelo pueden reaccionar con antelación a dichas perturbaciones, minimizando sus impactos en el medio. No obstante, a la gran diversidad de parámetros biológicos con potencial bioindicador, se le suma la falta de métodos estandarizados para su determinación, así como la escasez de valores de referencia como principales problemas para la generalización de su uso.

La **biomasa microbiana** se define como el componente biótico de la M.O. del suelo, excluyendo la macrofauna y las raíces. Este parámetro está muy relacionado con la fertilidad del suelo (Sparling, 1992) y es un indicador de cambios en la calidad del suelo con un tiempo de respuesta mucho más corto que la simple medida de M.O. (Paul, 1984). Un descenso de este parámetro está asociado a una reducción de las poblaciones microbianas debido a la falta de sustrato con el que mantenerse, o bien a la presencia de un compuesto inhibidor de su actividad (Pau, 1984).

La respiración de las poblaciones microbianas del suelo, o **respiración basal**, es uno de los indicadores biológicos más ampliamente utilizado (Anderson, 1982). Este indicador biológico aporta información sobre la calidad de la M.O. y acerca de si las condiciones del suelo son propicias para su descomposición mediante la medida de la tasa de producción de CO₂ por parte de las poblaciones microbianas edáficas. Su interpretación resulta problemática, ya que si bien la degradación de la M.O. es deseable desde el punto de vista de la nutrición vegetal, valores muy altos de respiración basal implicaría la rápida descomposición de la M.O., la cual es un escaso recurso en el suelo.

La gran variedad de parámetros y circunstancias que pueden hacer variar la respiración de las poblaciones microbianas del suelo hacen que sea muy difícil interpretar este parámetro por separado, de forma que suele combinarse con la medida de la biomasa microbiana para obtener el **coeficiente respiratorio o metabólico** de forma que exprese la tasa de respiración por unidad de biomasa microbiana (Anderson y Domsch, 1990). Potencialmente, es un parámetro indicador del nivel de estrés que una perturbación puede provocar en los microorganismos del suelo. Un aumento de dicho coeficiente es indicador de la alteración del metabolismo de los microorganismos, los cuales se ven obligados a utilizar el carbono que asimilan para obtener energía mediante la respiración celular en lugar de para crear nuevas estructuras celulares (Killham, 1985)

Para conocer el nitrógeno que potencialmente puede ser asimilado por las plantas hay que tener en cuenta dos factores: el nitrógeno mineral ya mineralizado y el **nitrógeno orgánico potencialmente mineralizable**. Este último parámetro es un buen indicador de la calidad del nitrógeno presente en el suelo y del estado ecológico de las poblaciones microbianas responsables de su mineralización. En presencia de una fuente de carbono, los microorganismos aerobios pueden inmovilizar nuevamente el nitrógeno mineralizado pudiendo obtener valores de nitrógeno mineralizable cercanos a cero e incluso negativos. Es por ello que se prefiere determinar este parámetro en condiciones de anegamiento (anaerobias) donde la inmovilización y la nitrificación del nitrógeno mineralizado se minimizan (Powers et al., 1980). Aunque resultaría sencillo clasificar los suelos en función de sus tasas de mineralización de nitrógeno, es difícil asignar un determinado valor a este parámetro a partir del cual clasificar a un suelo como de calidad.

Otro de los parámetros microbiológicos con potencial bioindicador que regula la cantidad de nitrógeno disponible es el **potencial de desnitrificación** de un suelo. Se define como la cantidad de N_2 que es producido por las bacterias desnitrificantes fruto de la reducción anaerobia de NO_3^- en presencia de una fuente no limitante de carbono (Šimek et al., 2002). Este proceso tiene una gran importancia desde el punto de vista agronómico, ya que implica la pérdida de grandes cantidades del nitrógeno aplicado en forma de fertilizantes. Como este proceso tiene lugar solo en ausencia de oxígeno, en condiciones reales tiene especial importancia tras episodios de intensa lluvia o riego (anegamiento) o en profundidades de suelo donde no llega el oxígeno (Rivett et al., 2008).

Otro valioso indicador biológico de la calidad del suelo son las **enzimas** presentes en el mismo. Aunque éstas pueden proceder de animales, plantas, hongos y bacterias, la mayor proporción corresponde a enzimas de origen microbiano, las cuales intervienen en muchos de los procesos que tienen lugar en los suelos, catalizando selectivamente las reacciones en las que están involucradas (Dick, 1997). Las enzimas son los indicadores biológicos más ampliamente desarrollados ya que ofrecen información precisa acerca de cómo una perturbación afecta a un determinado proceso del suelo: degradación de la M.O., liberación de nutrientes inorgánicos, fijación de nitrógeno, nitrificación, desnitrificación, etc., aunque también pueden encontrarse enzimas asociadas a procesos más generales como las deshidrogenasas, las cuales están involucradas en la actividad metabólica microbiana durante su ciclo de vida (Nannipieri et al., 2002). Sin embargo, la mayoría de las actividades enzimáticas medidas en el suelo (excepto la deshidrogenasa y las proteasas) presentan una proporción significativa asociada a enzimas abióticas adsorbidas a las partículas de suelo, lo cual puede enmascarar temporalmente la respuesta del suelo ante una perturbación determinada.

Uno de los procesos más íntimamente ligados a la actividad enzimática microbiana es la mineralización y humificación de la M.O. del suelo, estando asociado cada uno de los ciclos de los principales nutrientes a unas enzimas determinadas (Mijangos, 2009):

- i. Ciclo del carbono: asociado a amilasas, celulasas, lipasas, glucosidasas e invertasas. Por ejemplo, la β -glucosidasa interviene en la liberación de glucosa,

fuente de energía para la actividad microbiana. Hidroliza polímeros de los residuos vegetales (*e.g.*, celobiosa y maltosa) aportando los esqueletos de carbono y energía esenciales para el crecimiento de los organismos heterótrofos del suelo (Hayano y Tubaki, 1985)

ii. Ciclo del nitrógeno: asociado a proteasas, ureasas, amidasas y desaminasas. Por ejemplo, la ureasa pertenece al grupo de enzimas que actúan sobre los enlaces carbono-nitrógeno de la urea, un fertilizante muy común asociado a los purines de origen animal (Nannipieri et al., 1974).

iii. Ciclo del fósforo: asociado a fosfatasas. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina interviene en la mineralización de ésteres de fósforo para producir fosfato inorgánico disponible para las plantas (Speir y Ross, 1978).

iv. Ciclo del azufre: asociado a arilsulfatasas. Por ejemplo, la arilsulfatasa interviene en la mineralización de ésteres de azufre para producir sulfato disponible para las plantas (Castellano y Dick, 1991).

Menos específico que las actividades enzimáticas, pero igualmente valioso como potencial indicador de la calidad del suelo es la **biodiversidad microbiana**. Dado que actualmente nos encontramos con la limitación de desconocer los procedimientos de cultivo para más del 95% de las especies microbianas existentes, existe un especial interés en el desarrollo y aplicación de herramientas alternativas para el estudio de las comunidades microbianas del suelo (Amann et al., 1995). La biodiversidad microbiana, a diferencia de otros indicadores biológicos, no está asociada a una función concreta del suelo sino con ciertos atributos como la resiliencia, es decir, la capacidad del suelo para recuperar su estado original tras verse afectado por una perturbación. Muchos de los procesos que regulan el funcionamiento del ecosistema suelo son difícilmente asignables a una única especie microbiana en particular, sino que son desempeñados por un gran número de especies diferentes (especies redundantes). Ante una perturbación que altere una o varias funciones del suelo, la probabilidad de que el sistema continúe desarrollando dicha función o de que recupere su estado inicial, estará directamente ligada al número de especies que en él habiten (Martín-López et al., 2007)

Entre los métodos disponibles para estudiar la biodiversidad microbiana, se encuentran los análisis metabólico-funcionales a través de perfiles fisiológicos a nivel

de comunidad obtenidos con placas BiologTM. Este procedimiento permite estimar la diversidad metabólico-funcional de las comunidades microbianas del suelo a partir de la evaluación de la capacidad para utilizar diferentes sustratos de carbono contenidos en una placa de incubación.

Adicionalmente, las técnicas moleculares están suponiendo un gran avance en la identificación de microorganismos y, por consiguiente, en el análisis de la estructura de las comunidades microbianas. Dichas técnicas se basan en la extracción del ADN del suelo y la amplificación mediante la técnica de PCR (del inglés, Polymerase Chain Reaction) del gen ribosomal de la subunidad 16S, que todas las especies bacterianas tienen en común, aunque con pequeñas diferencias entre ellas. Posteriormente, mediante DGGE (del inglés, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), dichos fragmentos de ADN amplificado se separan según sus diferencias en la secuencia genética, permitiendo la posterior identificación de los diferentes grupos taxonómicos.

1.4.3. Impacto de la agricultura en la calidad del suelo

Actualmente se estima que casi el 40% de las tierras cultivables del mundo se han visto afectadas negativamente por procesos de degradación inducidos por el ser humano; más del 6% han sido degradadas a tal extremo que su recuperación implicaría elevadas inversiones económicas (Oldeman, 1994). Resulta especialmente grave el hecho de que dicha degradación está originada en muchos casos por las propias prácticas agrícolas, las cuales únicamente están orientadas a la maximización del rendimiento presente, sin tener presente la viabilidad de los cultivos futuros.

Así, las actuales técnicas de laboreo basadas en la intensa mecanización incluso en zonas de grandes pendientes, facilitan la pérdida de las capas más superficiales de suelo por **erosión**, tanto eólica como hídrica. La pérdida de suelo representa un grave problema ambiental por el carácter no renovable del mismo (1 cm de suelo necesita 100-400 años para formarse). En las capas más superficiales del suelo se encuentran los mayores contenidos en M.O., por lo que se produce una pérdida de nutrientes potenciales.

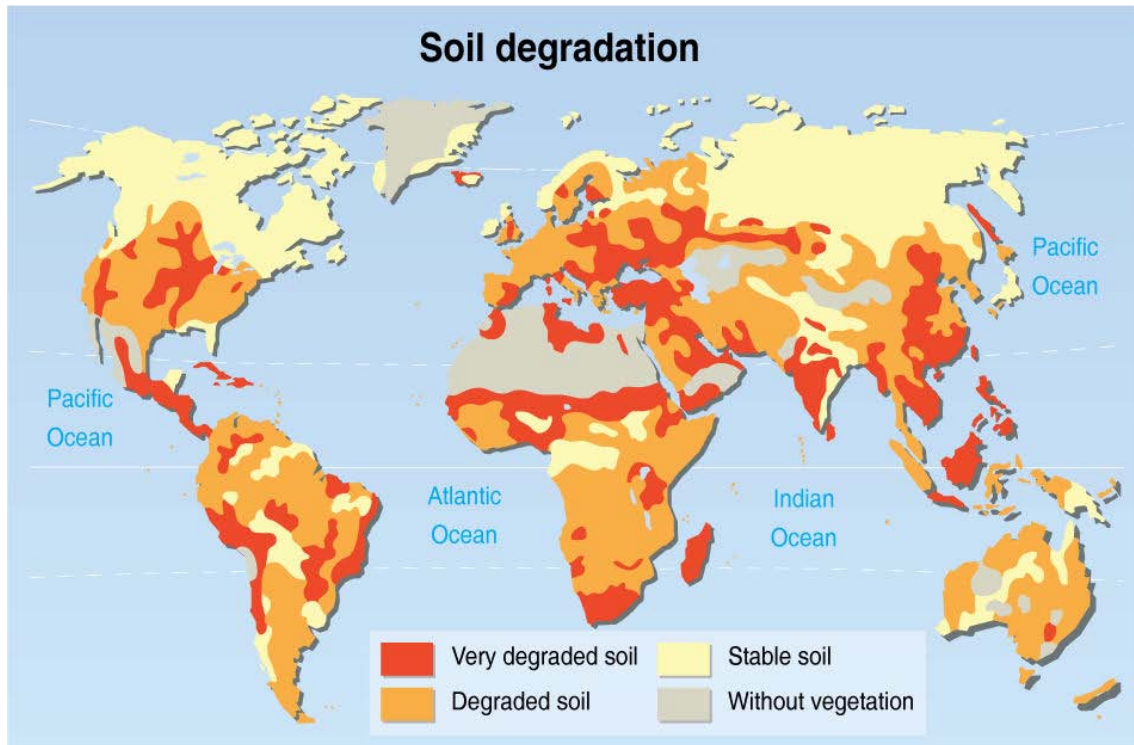


Figura 1.15. Distribución de los suelos degradados en el mundo. Fuente: UNEP.

La implantación de sistemas de regadío para conseguir mayores rendimientos agrícolas y reducir la dependencia de la climatología puede provocar como contrapartida la **salinización** del medio edáfico. Mientras que el agua de lluvia tiene una mineralización débil, la procedente de ríos y aguas subterráneas posee elevados contenidos en sales minerales que pueden quedarse retenidos en el suelo por adsorción a las arcillas o simplemente por evaporación del agua. El aumento progresivo de su concentración en el suelo modifica los equilibrios osmóticos que regulan el intercambio de nutrientes en plantas y microorganismos (Sardinha et al., 2003).

La generalización del monocultivo y la eliminación de cualquier otra especie vegetal que pueda competir por los nutrientes del suelo no solo hacen más vulnerables a los cultivos sino que, además, la falta de cubierta vegetal facilita la erosión del suelo. Existe además una relación entre la biodiversidad de las comunidades vegetales y de los microorganismos del suelo (Freckman, 1994; Rodríguez-Loinaz et al., 2008), por lo que la práctica del monocultivo incide negativamente en la biodiversidad de la microbiota edáfica.

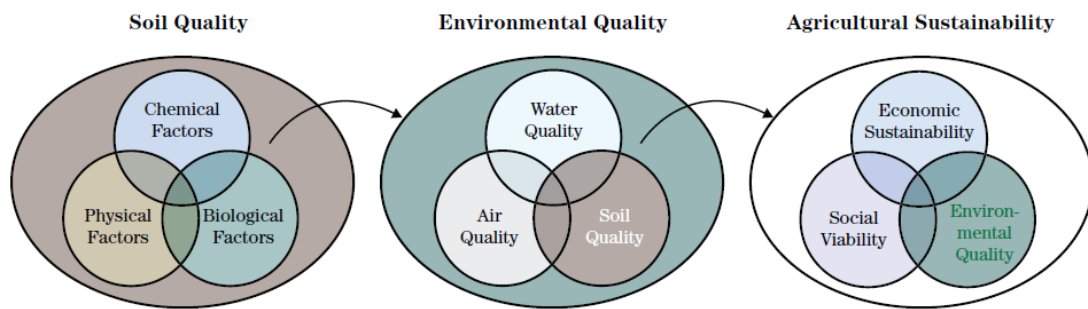
El uso intensivo de fertilizantes inorgánicos además de representar un riesgo potencial para la calidad de las aguas, induce la mineralización del carbono orgánico al descompensar el balance de nutrientes del suelo. La paulatina **pérdida de M.O.** incide negativamente en la fertilidad del suelo si no se repone mediante la adición de enmiendas orgánicas. Si bien el suelo ha sido desde sus orígenes un sumidero de carbono, en la actualidad se ha convertido en un importante foco emisor no solo de CO₂, sino también de otros gases de efecto invernadero tales como el CH₄ o el N₂O (Neftel et al., 2006). Por último, los nutrientes adicionados en los fertilizantes, no solo pueden ser asimilados por las plantas, sino que también por los microorganismos del suelo, pudiendo resultar alterado el equilibrio ecológico de las comunidades microbianas edáficas.

A pesar de los beneficios que los pesticidas reportan desde el punto de vista agronómico, su utilización no resulta inocua para el medio ambiente. La continua aplicación de pesticidas puede conllevar su acumulación en el medio, la **contaminación** de importantes recursos hídricos y la afección de organismos-no-diana. El suelo actúa como primera barrera natural de los recursos hídricos ante la contaminación por pesticidas, y condiciona su permanencia en el medio. Aunque las poblaciones microbianas del suelo son los principales responsables de su degradación, pueden a su vez resultar perjudicadas por las propiedades biocidas de dichos compuestos xenobióticos, pudiéndose ver comprometidas algunas de las funciones que desempeña el suelo.

Aunque actualmente existe una profunda concienciación sobre los impactos derivados de las prácticas agrícolas sobre el medio ambiente, muchas de las iniciativas que se están abordando a nivel político-administrativo están enfocadas únicamente a minimizar los impactos de fertilizantes y pesticidas sobre la calidad de las aguas. Los contaminantes estaban perfectamente identificados; su cuantificación analítica está cada vez más perfeccionada; los focos receptores de la contaminación (las masas de agua) están definidos; y sus impactos en los receptores están ampliamente estudiados.

Sin embargo, en el caso del impacto de las prácticas agrícolas sobre la calidad del suelo, hay numerosas cuestiones que aún quedan por dilucidar. Como se ha comentado anteriormente, son numerosos los factores de origen agrícola que pueden

incidir negativamente en la calidad del suelo. Por otra parte, no hay unos niveles de referencia con los que poder evaluar el estado ecológico de un suelo determinado ni unanimidad acerca de la idoneidad de unos indicadores sobre otros para evaluar la calidad del suelo. Asimismo, las “señales de alarma” de un suelo enfermo son más difíciles de interpretar y, en muchas ocasiones, cuando se manifiestan ya es demasiado tarde o las acciones correctoras son demasiado costosas. Es por ello que se hace necesario profundizar en el conocimiento de todos los factores involucrados en la problemática de la calidad del suelo y la agricultura ya que solo así podremos implementar una nueva agricultura de calidad, respetuosa con el medio ambiente y con las personas.



*Figura 1.16. Relación entre calidad del suelo y agricultura.
Fuente: Karlen et al., 2008.*

1.5. Las zonas húmedas frente a la contaminación agrícola

Entre los ecosistemas agrícolas y acuáticos pueden existir unas zonas de transición de gran valor ecológico conocidas como zonas riparias. Su importancia radica en su capacidad para retener o mitigar los contaminantes de origen agrícola, especialmente aquellos que son transportados en fase acuosa tanto vía superficial (escorrentía) como subterránea (lixiviación) (Casey et al., 2004). Aunque son zonas de limitada extensión, en ellas confluyen una serie de elementos que las convierten en auténticos filtros naturales: intensa vegetación, elevada biodiversidad, y suelo con gran humedad y rico en nutrientes.



Figura 1.17. Zonas húmedas de bosques de ribera bordeando zonas agrícolas.
Fuente: North Carolina State University.

Las zonas húmedas o humedales constituyen uno de los ecosistemas riparios que pueden encontrarse en la naturaleza. Aunque son uno de los ecosistemas más productivos y de mayor valor ecológico, durante muchos años han sido considerados como zonas insalubres e improductivas. Por esta razón, dichas zonas se drenaban intensamente, siendo posteriormente utilizadas como zonas de cultivo debido a la gran fertilidad de sus suelos, o como zonas de expansión urbanística por estar localizadas en zonas relativamente llanas de gran interés paisajístico.

1.5.1. Definición

Existe un gran número de definiciones del concepto humedal, debido a la gran diversidad de hábitats acuáticos y sus peculiaridades en las diferentes partes del mundo; por otra parte, la pluralidad de criterios y opiniones sobre qué debe ser considerado un humedal dificulta la existencia de una única definición. La definición de humedal más común, por ser reconocida y aceptada internacionalmente, se encuentra en el Convenio de Ramsar, en sus dos primeros artículos, aprobado en la ciudad iraní del mismo nombre en el año 1971: “se consideran humedales las extensiones de marismas, pantanos, turberas o superficies cubiertas de agua, sean estas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros. Además podrán comprender zonas de bordes fluviales o de costas adyacentes al humedal, así como las islas o extensiones de agua marina de una

profundidad superior a los seis metros en marea baja, cuando se encuentren dentro del humedal” (Ramsar, 1971).

1.5.2. Funciones de los humedales

La interacción entre los procesos físicos, químicos y biológicos que tienen lugar en los humedales da lugar a una serie de funciones ecológicas derivadas de los ciclos de inundación y secado naturales propios de los humedales en función del nivel piezométrico de las aguas subterráneas.

Durante las estaciones húmedas, el nivel freático de las aguas asciende hasta que aflora a la superficie, mientras que durante las estaciones calurosas y con la ausencia de precipitaciones el nivel de las aguas desciende hasta el punto de poder llegar a desaparecer la lámina de agua. Este hecho permite la alternancia de condiciones anaerobias (inundación) y aerobias (secado) en el terreno, dando lugar a una serie de transformaciones biogeoquímicas en el subsuelo y los sedimentos del humedal que influyen decisivamente en las cualidades químicas y biológicas de las aguas.

Los humedales juegan un papel importante en la regulación de los procesos tanto de recarga y como de descarga de acuíferos subterráneos (Winters, 1999). El agua puede infiltrarse del humedal a los acuíferos subterráneos y viceversa, y en su paso a través de la zona saturada se produce el proceso de depuración de las aguas. Adicionalmente, numerosos humedales situados en las llanuras de inundación almacenan grandes cantidades de agua durante las fuertes precipitaciones y crecidas de los ríos, liberando posteriormente y de forma uniforme el agua por escorrentía, o favoreciendo la recarga de los acuíferos. Una vez en el acuífero, el agua se puede extraer para el consumo humano, o bien seguir los flujos subterráneos hasta que alcanza la superficie en manantiales u otros humedales.

La vegetación de los humedales de ribera puede estabilizar los márgenes de los ríos y disminuir su erosión mediante la reducción de la energía de los ríos, corrientes u otras fuerzas de erosión, al mismo tiempo que las raíces de las plantas sostienen los sedimentos del fondo. Por otra parte, los humedales situados en las partes bajas de las cuencas fluviales pueden servir de lagunas de sedimentación. Además, dado que las

sustancias tóxicas se adhieren con frecuencia a los sedimentos en suspensión, pueden ser retenidas junto con ellos. Sin embargo, esta función no debe sobrestimarse ya que una rápida acumulación de sedimentos puede alterar las funciones del humedal.

En determinadas condiciones, los nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, son retenidos por las plantas y los sedimentos de los humedales, mejorando la calidad del agua y evitando la eutrofización aguas abajo. Adicionalmente, el nitrógeno en forma de NO_3^- puede ser reconvertido en nitrógeno gaseoso y reintroducido en la atmósfera como resultado de la desnitrificación. Por otra parte, algunos humedales juegan un importante papel en la retención del CO_2 (Moore y Turunen, 2004). Las masas de vegetación palustre, y especialmente los depósitos orgánicos de carácter turboso que la acumulación de sus restos produce, supone una parte importante del carbono fijado como M.O.

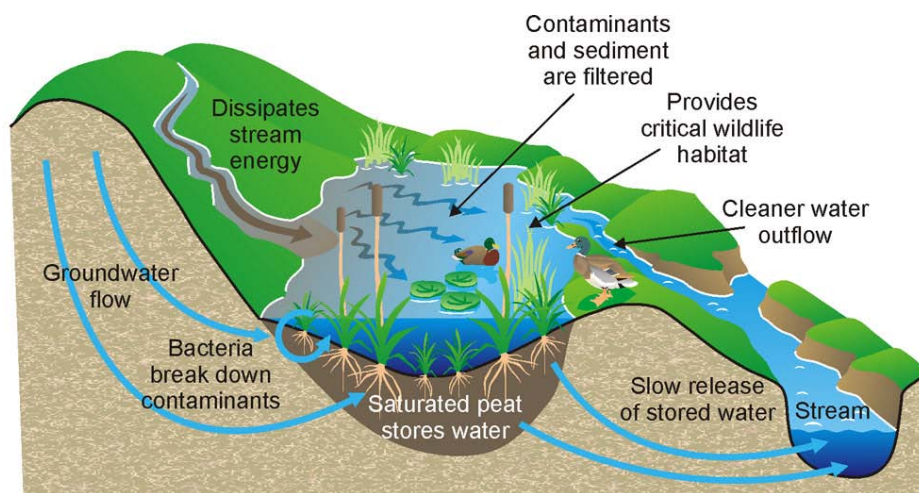


Figura 1.18. Diagrama de las principales funciones de un humedal.

Fuente: Jacqueline Mitchell.

Los ciclos hidrológicos de nutrientes y de materia, y los flujos de energía de los humedales, pueden estabilizar las condiciones climáticas locales, en particular las precipitaciones y las temperaturas. Se ha demostrado que una proporción de la precipitación continental es resultado de la evaporación *in situ*, por lo que la evaporación de agua del humedal puede provocar precipitaciones en las cercanías.

1.5.3. Capacidad depuradora de los humedales

La capacidad de los humedales para recuperar la calidad de las masas de agua tanto superficiales como subterráneas les ha valido el sobrenombre de “*riñones de la naturaleza*” ya que retienen los contaminantes y los transforman biodegradándolos. Sin embargo, dicha capacidad es fruto de la interacción de múltiples factores hidrogeológicos, químicos y biológicos.

1.5.3.1. Factores hidrogeológicos

La capacidad de los humedales para mantener un caudal base en los ríos así como de atenuar las variaciones bruscas de éste, contribuye a la mejora de la calidad de las aguas de forma indirecta. La localización y configuración morfológica del humedal condiciona el tiempo de retención del agua en éste, así como su capacidad para interceptar y atenuar las avenidas de los ríos por los que es abastecido (Koskiaho, 2003). Durante los periodos de recarga hidrológica, cuando el nivel freático se encuentra en su punto más bajo la capacidad de almacenamiento de agua se ve reducida, aunque la retención de avenidas puede tener lugar gracias a que la vegetación proporciona un excelente coeficiente de fricción. Mientras que en invierno y primavera, cuando el nivel freático se encuentra en su punto más alto y las plantas se han visto superadas por la lámina de agua, la capacidad de controlar avenidas se ve seriamente reducida.

La morfología propia de los humedales (zonas planas de gran superficie) junto con la habitual presencia de abundante vegetación, proporcionan a los humedales una gran capacidad de reducción de velocidad del cauce de los ríos, con la consiguiente eliminación de sedimentos (Braskerud et al., 2000). Cuanta mayor sea la reducción de la velocidad del cauce y tiempo de residencia del agua en el humedal, mayor será la eficiencia en la retención de sedimentos de éste. Dichos sedimentos pueden contener adsorbidos nutrientes (en especial, fósforo), así como pesticidas, metales pesados y agentes patógenos. Es por ello que los humedales actúan no solo a modo de filtros decantadores de sedimentos, sino que también pueden ayudar a reducir el nivel de tóxicos presentes en ellos.

1.5.3.2. Factores físico-químicos

La adsorción de compuestos a partículas de suelo puede llegar a ser un mecanismo nada despreciable en la reducción de nutrientes y metales pesados disueltos en las corrientes de agua (Gray et al., 2000). Este proceso es especialmente importante en humedales ricos en arcillas, cuyas partículas, de pequeño tamaño y con gran desarrollo superficial, les proporcionan unas propiedades adsorbentes excelentes. Otro parámetro que influye en el proceso de adsorción es el pH del medio, de forma que en ambientes ácidos los cationes se adsorben preferentemente frente a los aniones.

Bajo ciertas condiciones, el fósforo puede ser transformado de formas solubles a formas insolubles que precipitan. En condiciones ácidas, el fósforo precipita combinándose con aluminio o hierro, mientras que bajo condiciones alcalinas lo hace con calcio y magnesio. Sin embargo, las condiciones anaerobias presentes en los humedales pueden provocar alteraciones en el pH que se traduzcan en resolubilizaciones del fósforo previamente precipitado (Picard et al., 2005). La importancia relativa de la precipitación en los procesos de eliminación de fósforo no están del todo clara, debido a que la materia particulada de este tipo puede sufrir transformaciones diversas siguiendo diferentes caminos y bajo formas varias.

1.5.3.3. Factores biológicos

La alternancia de condiciones anaerobias (inundación) y aerobias (secado) en el terreno, debido a las variaciones en el nivel freático y la presencia de una abundante fuente de carbono orgánico en el suelo procedente de la descomposición de la materia vegetal muerta, permite el desarrollo de una importante población de microorganismos facultativos entre los que destacan las bacterias desnitrificadoras (Rivett et al., 2008). Bajo condiciones anóxicas, dichas bacterias se ven obligadas a usar NO_3^- como aceptor de electrones, reduciéndolo a especies gaseosas nitrogenadas (N_2 y N_2O). Este proceso cobra especial importancia en zonas húmedas que reciben aguas superficiales o subterráneas con altos contenidos en NO_3^- de origen agrícola, donde gracias a la desnitrificación natural, se reduce el riesgo de eutrofización de las aguas y se reducen

los costes de su tratamiento en caso de querer ser posteriormente destinadas a consumo humano (Rivett et al., 2008).

Las poblaciones de bacterianas pueden crecer considerablemente bajo condiciones favorables, lo que conlleva la asimilación de una gran cantidad de nutrientes (Kelso et al., 1999). Sin embargo el tiempo de almacenamiento puede variar considerablemente, y bajo condiciones desfavorables, el número de bacterias puede verse reducido en un corto periodo de tiempo liberando grandes cantidades de nutrientes de nuevo al medio.

Las raíces de las plantas pueden también eliminar nutrientes del suelo mediante la asimilación de sustancias disueltas presentes en él (Gottschall et al., 2007). Sin embargo, el crecimiento de las plantas tiene un carácter eminentemente estacional, por lo que el proceso de eliminación de nutrientes se ve limitado a las estaciones en las que tiene lugar el desarrollo de la vegetación. Factores tales como el tipo de vegetación, la edad y el estado de conservación de la misma influyen en la cantidad de nutrientes potencialmente eliminable, y por ello se considera la desnitrificación como principal mecanismo responsable de la eliminación de nutrientes nitrogenados de las aguas en zonas húmedas (Burt et al., 1999).

Adicionalmente, muchas plantas que se encuentran en los humedales pueden liberar grandes cantidades de oxígeno por sus raíces, y consecuentemente crean zonas puntuales aerobias. La alternancia de zonas aerobias (nitrificación) con zonas anaerobias (desnitrificación) permite optimizar la eliminación de nitrógeno en la naturaleza y ayuda a reducir los niveles de M.O. disuelta en el agua (Mayer et al., 2006).

1.5.4. Degradación de los humedales

Como se ha comentado anteriormente, históricamente los humedales han sido considerados como lugares insalubres, fuente de enfermedades y de insectos, por lo que habían sido rechazados socialmente. Como consecuencia de dicho rechazo, muchas de estas áreas húmedas fueron drenadas y desecadas con fines agrícolas (son terrenos muy fértiles) o de expansión urbanística (son grandes extensiones llanas).



Figura 1.19. Humedal drenado con fines agrícolas. Fuente: Ducks unlimited Canada.

Otro impacto directo sobre los humedales es la pérdida de biodiversidad debida a actividades humanas incontroladas como son la deforestación (incendios e industria maderera) así como la caza y la pesca de especies animales de gran valor ecológico e indispensables para el equilibrio ecológico del humedal.

Pero, sin duda alguna, la actividad humana de la que derivan un mayor número de impactos es la agricultura. Además de los efectos directos debidos al drenaje y secado de humedales para aumentar las tierras de cultivo, se dan otros indirectos, menos visibles a corto plazo pero igualmente dañinos, debido a la utilización abusiva de fertilizantes y pesticidas.

La entrada creciente de nutrientes (NO_3^- , fósforo,...) así como de compuestos agroquímicos (pesticidas) en los humedales, bien a través de cauces superficiales (arrastre por escorrentía), bien a través de aguas subterráneas (lavado por lixiviación), ha sobrepasado su capacidad depuradora, alterando la composición química de sus aguas (eutrofización) y afectando negativamente a todas las formas de vida que componen estos frágiles y valiosos ecosistemas. Este hecho ha puesto en serio peligro una gran cantidad de humedales en todo el mundo hasta llegar al punto de haber provocado su degradación irreversible en muchos casos.

Nota: *Parte de la información incluida en este apartado 1.5. ha sido extraída del Plan Estratégico Español para la Conservación y Uso Racional de los Humedales (MARM, 2000) y convenientemente ampliada.*

1.6. Referencias

- Aislabie, J., Lloyd-Jones, G., 1995. A review of bacterial degradation of pesticides. *Australian Journal of Soil Research* 33, 925-942.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59, 143-169.
- Anderson, J.P.E., 1982. Soil respiration. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part II. Chemical and Microbiological Properties*. SSSA and ASA, Madison, pp. 831-871.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1990. Application of eco-physiological quotients (qCO_2 and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 251-255.
- Arah, J.R.M., Smith, K.A., Crichton, I.J., Hesheng, L., 1991. Nitrous oxide production and denitrification in Scottish soils. *Journal of Soil Science* 42, 351-367.
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.-C., García-Río, L., 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 123, 247-260
- Averill, B.A., Tiedje, J.M., 1982. The chemical mechanism of microbial denitrification. *FEBS letters* 138, 8-12.
- Barriuso, E., Houot, S., Serra-Wittling, C., 1997. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pesticide Science* 49, 65-75.
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso E., Gabrielle, G., 2002. Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview. *Agronomie* 22, 21-33.
- Beltran, J., Hernández, F., Morell, I., 1995. Estudios de adsorción de plaguicidas en suelos mediante experiencias en batch. In: *Avances en la Investigación en Zona no Saturada*. Gonzalo, J.M., Antigüedad, I. (Eds.) pp: 257-268.
- Bending, G.D., Lincoln, S.D., Edmondson, R.N., 2006. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution* 139, 279-287.
- Bigler, F., Forrer, H.R., Fried, P.M., 1992. Integrated crop protection and biological controls in cereals in Western Europe. In: *Biological Control and Integrated Crop Protection: Towards Environmentally-Safer Agriculture*. van Lanteren, J.C., Minks, A.K., de Ponti, O.M.B., (Eds.). Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, pp. 95-116.

- Braskerud, B., Lundekvam, H., Krogstad, T., 2000. The impact of hydraulic load and aggregation on sedimentation of soil particles in small constructed wetlands. *Journal of Environmental Quality* 29, 2013-2020.
- Burt, T.P., Matchett, L.S., Goulding, K.W.T., Webster, C.P., Haycock, N.E., 1999. Denitrification in riparian buffer zones: the role of floodplain hydrology. *Hydrological Processes* 13, 1451-1463.
- Campoy, C., Jiménez, M., Olea-Serrano, M.F., Moreno-Frias M., Cañabate, F., Olea, N., Bayés, R., Molina-Font, J.A., 2001. Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Human Development* 65, 183-190.
- Carter, M.R., Gregorich, E.G., Anderson, D.W., Doran, J.W., Janzen, H.H., Pierce, F.J., 1997. Concepts of soil quality and their significance. In: Gregorich, E.G., Carter, M.R. (Eds.), *Soil Quality for Crop Production and Ecosystem Health*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-20.
- Carson, R., 1985. *Silent Spring*. Penguin, Harmondsworth (1ª edición de 1962 por Houghton Mifflin).
- Casey, R.E., Taylor, M.D., Klaine, S.J., 2004. Localization of denitrification activity in macropores of a riparian wetland. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 563-569.
- Castellano, S.D., Dick, R.P., 1991. Cropping and sulfur fertilization influence on sulfur transformations in soils. *Soil Science Society of America Journal* 55, 114-121.
- Chambers, B.J., Smith, K.A., Pain, B.F., 2000. Strategies to encourage better use of nitrogen in animal manures. *Soil Use and Management* 16, 157-161.
- Chen, C.R., Xu Z.H., Zhang, S.L., 2005. Soluble organic nitrogen pools in forest soils of subtropical Australia. *Plant and Soil* 277, 285-297.
- Chester, G., Simsiman, G.V., Levy, J., Alhajjar, B.J., Fathuulla, r.N., Harkin, J.M., 1989. Environmental fate of alachlor and metachlor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 110, 1-74.
- Cleemann, M., Poulsen, M.E., Hilbert, G., 1995. Deposition of lindane in Denmark. *Chemosphere* 30, 2039-2049.
- Conway, G., Pretty, J., 1991. *Unwelcome Harvest: Agriculture and Pollution*. Earthscan Publications, London, UK.
- Cooper, K., 1991. Effects of pesticides on wildlife. In: Hayes, W.J., Laws, E.R., (Eds.) *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 463-496.
- Coquet, Y., 2003. Sorption of pesticide atrazine, isoproturon, and metamitron in the Vadose Zone. *Vadose Zone Journal* 2, 40-51.
- Cox, L., Celis, R., Hermosín, M.C., Cornejo, J., 2000. Natural soil colloids to retard simazine and 2,4-D leaching in soil. *Journal of Agriculture Food and Chemistry* 48, 93-99.
- CPA, 2000. *Crop Protection Association Handbook 2000*. Crop Protection Association, Peterborough.

- Cullum, R.F., 2009. Macropore flow estimations under no-till and till systems. *Catena* 78, 87-91.
- Dick, R.P., 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, pp. 121-156.
- Doran, J.W., 2002. Soil health and global sustainability: translating science into practice. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88, 119-127.
- Doran, J.W., Parkin, T.B., 1994. Defining and assessing soil quality. In: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA Special Publication 35. SSSA, Madison, pp. 3-21.
- Doran, J.W., Parkin, T.B., 1996. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In: Doran, J.W., Jones, A.J. (Eds.), *Methods for Assessing Soil Quality*. SSSA Special Publication 49. SSSA, Madison, pp. 25-37.
- Dugan, P.J., 1992. *Conservación de Humedales, un análisis de temas de actualidad y acciones necesarias*. UICN. Gland, Suiza.
- Eurostat, 1998. *Derived from data in crop protection: Half yearly statistics*. European Union, Brussels.
- FAO, 1990. *Water and sustainable agricultural development: a strategy for the implementation of the Mar de Plata action plan for the 1990s*. Rome, Italy.
- FAO, 1993. An overview of pollution of water by agriculture. J.A. Sagardoy. In: *Prevention of water pollution by agriculture and related activities, Proceedings of the FAO Expert Consultation, Water Report 1*. Rome, Italy, pp. 19-26.
- FAO, 1996. *Control of water pollution from agriculture*. In Ongley, E.D. (Ed.), *FAO irrigation and drainage paper*. Rome, Italy.
- FAO, 2003. *Groundwater Management - The Search for Practical Approaches*. Water reports 25. Rome, Italy.
- Fernandes, M.C., 2004. *Comportamiento de plaguicidas en suelos de Andalucía Occidental y Bajo Alentejo: Efecto de la adición de enmiendas orgánicas*. Tesis doctoral. Departamento de cristalografía, mineralogía y química agrícola. Universidad de Sevilla.
- Fowler, D., Sutton, M.A., Skiba, U. and Hargreaves, K.J., 1996. Agricultural nitrogen and emissions to the atmosphere. In: *Issues in Environmental Science and Technology 5: Agricultural Chemicals and the Environment* Hester, R.E., Harrison, R.M., (Eds). The Royal Society of Chemistry, Letchworth, pp. 57-84.
- Freckman, D.W., 1994. *Life in the soil, soil biodiversity: its importance to ecosystem processes*. Report on a Workshop held at the Natural History Museum, London.
- García-Ruiz, J.M., 2010. The effects of land uses on soil erosion in Spain: a review. *Catena* 81, 1-11.

- Gottschall, N., Boutin, C., Crolla, A., Kinsley, C., Champagne, P., 2007. The role of plants in the removal of nutrients at a constructed wetland treating agricultural (dairy) wastewater, Ontario, Canada. *Ecological Engineering* 29, 154-163.
- Gray, S., Kinross, J., Read, P. and Marland, A. 2000. The nutrient assimilative capacity of maerl as a substrate in constructed wetland systems for waste treatment. *Water Research* 34, 2183-2190.
- Guo, L., Jury, W.A., Wagenet, R.J., Flury, M., 2000. Dependence of pesticide degradation on sorption: non-equilibrium model and application to soil reactors. *Journal of Contaminant Hydrology* 43, 45-62.
- Hassall, K.A., 1990. *The Biochemistry and Uses of Pesticides*. (2nd Edition). Macmillan Press, London.
- Hayano, K., Tubaki, K., 1985. Origin and properties of β -glucosidase activity of tomato-field soil. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 553- 557.
- Haynes, R.J., Martin, R.J., Goh, K.M., 1993. Nitrogen fixation, accumulation of soil nitrogen and nitrogen balance for some field-grown legume crops. *Field Crops Research* 35, 85-92.
- Henle, K., Alard, D., Clitherow, J., Cobb, P., Firbank, L., Kull, T., McCracken, D., Moritz, R.F.A., Niemelä, J., Rebane, M., Wascher, D., Watt, A., Young, J., 2008. Identifying and managing the conflicts between agriculture and biodiversity conservation in Europe-A review. *Agriculture Ecosystems and Environment* 124, 60-71.
- Isherwood, K.F., 2000. *Fertiliser Use and the Environment*. (Revised Edition). International Fertiliser Industry Association. Paris.
- Jalali, M., Moharrami, S., 2007. Competitive adsorption of trace elements in calcareous soils of western Iran. *Geoderma* 140, 156-163.
- Jansson, S.L. and Persson, J. (1982) Mineralisation and immobilisation of soil nitrogen. In: *Nitrogen in Agricultural Soils* (Ed. Stevenson, F.J.), *Agronomy Monograph No. 22*, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 229–252.
- Jenkinson, D.S., 1990. An introduction to the global nitrogen cycle. *Soil Use and Management* 6, 56-60.
- Juraske, R., Castells, F., Vijay, A., Muñoz, P., Antón, A., 2009. Uptake and persistence of pesticides in plants: Measurements and model estimates for imidacloprid after foliar and soil application. *Journal of Hazardous Materials* 165, 683-689.
- Karlen, D., Wienhold, B., Liebig, M., Norfleet, L., 2008. *Soil Quality Physical Indicators: Selecting Dynamic Soil Properties to Assess Soil Function*. United States Department of Agriculture. *Soil Quality Technical Note No. 10*
- Kelso, B.H.L., Smith, R.V., Laughlin, R.J., 1999. Effects of carbon substrates on nitrite accumulation in freshwater sediments. *Applied Environmental Microbiology* 65, 61-66.

- Killham, K., 1985. A physiological determination of the impact of environmental stress on the activity of microbial biomass. *Environmental Pollution* 38, 283-294.
- Koskiaho, J., 2003. Flow velocity retardation and sediment retention in two constructed wetland-ponds. *Ecological Engineering* 19, 325-337.
- Kovárová-Kovar, K., Egli, T., 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: From single-substrate controlled growth to mixed substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62, 646-666.
- Krogh, K.A., Halling-Sørensen, B, Mogensen, B.B., Vejrup, K.V., 2003. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50, 871-901.
- Larson, W.E., Pierce, F.J., 1991. Conservation and enhancement of soil quality. In: *Evaluation for Sustainable Land Management in the Developing World, Vol. 2: Technical Papers*. IBSRAM Proceedings No. 12 (2), International Board for Soil Research and Management. Bangkok, Thailand.
- Leake, C.R., Humphreys, S.P., Austin, D.J., 1995. Factors influencing the modelling of pesticide degradation in soil and the estimation of half-life (DT50) and DT90 values. In: *BCPC Monograph No. 62*. Walker A., et al. (Eds.). British Protection Council, Farnham, Surrey, UK, pp. 217-222.
- Lee, S.,J. Gan, J., Kim, S., Kabashima, J.N., Crowley, D.E., 2004. Microbial transformation of pyrethroid insecticides in aqueous and sediment phases. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1-6.
- Li, Y., Zhang, J., 1999. Agricultural diffuse pollution term from fertilisers and pesticides in China. *Water Science and Technology* 39, 25-32.
- Linn, D.M., Carski, T.H., Brusseau, M.L., Chang, F.H. (Eds.), 1993. *Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil*. Soil Science Society of America, Madison, WI, p. 260.
- Lord, E.I., Anthony, S.G., 2000. MAGPIE: A modelling framework for evaluating nitrate losses at national and catchment scales. *Soil Use and Management* 16, 167-174.
- Luo, J., de Klein, C.A.M., Ledgard, S.F., Saggar S., 2010. Management options to reduce nitrous oxide emissions from intensively grazed pastures: A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 136, 282-291.
- Lupwayi, N.Z., Arshad, M.A., Rice, W.A., Clayton, G.W., 2001. Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. *Applied Soil Ecology* 16, 251-261.
- Lupwayi, N.Z., Clayton, G.W., O'Donovan, J.T., Harker, K.N., Turkington, T.K., Soon, Y.K., 2006. Nitrogen release during decomposition of crop residues under conventional and zero tillage. *Canadian Journal of Soil Science* 86, 11-19.
- Lupwayi, N.Z., Brandt, S.A., Harker, K.N., O'Donovan, J.T., Clayton, G.W., Turkington, T.K., 2010. Contrasting soil microbial responses to fertilizers and herbicides in a canola-barley rotation. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1997-2004.

- Magee, P.N., 1982. Nitrogen as a potential health hazard. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 296, 543-550.
- Makepeace, R., 1996. Sticking up for adjuvants, *Farming and Conservation* April issue, pp. 26-27.
- MARM, 2000. Plan Estratégico Español para la Conservación y Uso Racional de los Humedales. Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente.
- Martín-López, B., González, J.A., Díaz, S., Castro, I., García-Llorente M., 2007. Biodiversidad y bienestar humano: el papel de la diversidad funcional. *Ecosistemas* 16, 69-80.
- Materechera, S.A., 2009. Tillage and tractor traffic effects on soil compaction in horticultural fields used for peri-urban agriculture in a semi-arid environment of the North West Province, South Africa. *Soil and Tillage Research* 103, 11-15.
- Mayer, P.M., Reynolds, S.K., McCutchen, M.D., Canfield, T.J., 2006. Riparian Buffer Width, Vegetative Cover, and Nitrogen Removal Effectiveness: A Review of Current Science and Regulations. EPA/600/R-05/118. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
- Merrington, G., Winder, L., Parkinson, R., Redman, M., 2002. *Agricultural pollution: Environmental problems and practical solutions*. Spon Press, New York.
- Mijangos, I., 2009. Impacto de las prácticas agrícolas sobre la salud del suelo. Tesis doctoral, pp. 22-23.
- Miller, P.C.H., 1991. Agricultural sprayer design to minimize environmental contamination. In: *Chemistry, Agriculture and the Environment*. Richardson, M.L., (Ed.). Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 308-331.
- Monkiedje, A., Spiteller, M., 2002. Sorptive behaviour of the phenylamide fungicides, mefenoxam and metalaxil, and their acid metabolite in typical Cameroonian and German soils. *Chemosphere* 49, 659-668.
- Monkiedje, A., Ilori, M.O., Spiteller, M., 2002. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1939-1948.
- Moore, T.R., Turunen, J. 2004. Carbon accumulation and storage in mineral subsoil beneath peat. *Soil Science Society of America Journal* 68, 690-696.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli S., Sequi, P., 1974. Use of 0.1 M pyrophosphate to extract urease from a podzol. *Soil Biology and Biochemistry* 6, 359-362.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-33.
- Neftel, A., Fischer, C., Flechard, Ch., 2006. Measurements of greenhouse gas fluxes from agriculture. *Greenhouse Gases and Animal Agriculture: An Update*.

Proceedings of the 2nd International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture 1293, 3-12.

OCDE, 1997. Environmental Indicators for Agriculture. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

Oldeman, L.R., 1994. The global extent of soil degradation. In: Greenland, D.J. y Szabolcs, I. (Eds.) Soil Resilience and Sustainable Land Use. CAB International, Wallingford, UK, pp. 99-118.

Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., 1997. Biological Indicators of Soil Health. CAB International, Wallingford, pp. 451.

Parsons, J.W., 1984. Green manuring. Outlook on Agriculture 13, 20-23.

Paul, E.A., 1984. Dynamics of organic matter in soils. Plant and Soil 76, 275-285.

Peel, S., Chambers, B.J., Harrison, R., Jarvis, S.C., 1997. Reducing nitrogen emissions from complete dairy farm systems. In: Gaseous Nitrogen Emissions from Grasslands. Jarvis, S.C., Pain, B.F., (Eds). CAB International, Wallingford, pp. 383-390.

Pérez-Sarmentero, J., Molina, A., 2000. Las enzimas, indicadores biológicos de la salud del suelo. Phytoma 117, 41-46.

Peters, N.E., Meyers, T.P., Aulenbach, B.T., 2002. Status and trends in atmospheric previous termdepositionnext term and emissions near Atlanta, Georgia, 1986-99. Atmospheric Environment 36, 1577-1588.

Picard, C.R., Fraser, L.H., Steer, D., 2005. The interacting effects of temperature and plant community type on nutrient removal in wetland microcosms. Bioresource Technology 96, 1039-1047.

Powers, R.F., 1980. Mineralizable soil nitrogen as an index of nitrogen availability to forest trees. Soil Science Society of America Journal 44, 1314-1320.

Powlson, D.S., 1993. Understanding the soil nitrogen cycle. Soil Use and Management 9, 86-94.

Pretty, J.N., Mason, C.F., Nedwell, D.B., Hine, R.E., Leaf S., Dils., R., 2003. Environmental Costs of Freshwater Eutrophication in England and Wales. Environmental Science and Technology 37, 201-208.

Ramsar, 1971. Convention on Wetlands of International Importance especially as Waterfowl Habitat. Ramsar (Iran)

Richards, I.R., Turner, I.D.S., Wallace, P.A., 1999. Manure and fertiliser contributions to soil mineral nitrogen and the yield of forage maize. Nutrient Cycling in Agroecosystems 55, 175-185.

Rickert, D., 1993. Water quality assessment to determine the nature and extent of water pollution by agriculture and related activities. In: Prevention of Water Pollution by Agriculture and Related Activities. Proceedings of the FAO Expert Consultation, Santiago, Chile.

- Rivett, M.O., Smith, J.W.N., Buss, S.R., Morgan, P., 2007. Nitrate occurrence and attenuation in the major aquifers of England and Wales. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology* 40, 335-352.
- Rivett, M.O. Buss, S.R., Morgan, P., Smith J.W.N., Bemment, C.D., 2008. Nitrate attenuation in groundwater: A review of biogeochemical controlling processes. *Water Research* 42, 4215-4232.
- Rodríguez-Cruz, M.S., Jones, J.E., Bending, G.D., 2006. Field-scale study of the variability in pesticide biodegradation with soil depth and its relationship with soil characteristics. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2910-2918.
- Rodríguez-Loinaz, G., Onaindia, M., Amezaga, I., Mijangos, I., Garbisu, C., 2008. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 49-60.
- Rosewell, C.J., 1999. Maintaining Soil and Water Quality. Paper presented to NSW Agriculture, Soil Management Strategic Planning Workshp, Tocal, NSW. Adapted from *Soil and Water Quality: An agenda for agriculture*. National Academy Press, Washington, D.C.
- Rosswall, T., Paustian, K., 1984. Cycling of nitrogen in modern agricultural systems. *Plant and Soil* 76, 3-21.
- Rubio, J.L., Recatalá, L., 1998. El suelo: un recurso natural amenazado. *Revista Valenciana d'Estudis Autonomics* 23, 329-353.
- Sardinha, M.T., Muller, H., Schmeisky, R., Joergensen, G., 2003. Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. *Applied Soil Ecology* 23, 237-244.
- Schlesinger, W.H., 1997. *Biogeochemistry, an Analysis of Global Change*. 2nd Edition. Academic Press, San Diego.
- Schreck., E., Geret, F., Gontier, L., Treilhou M., 2008. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere* 71, 1832-1839.
- Shiklomanov, I.A., 1990. Global water resources. *Natural Resources* 26, 34-43.
- Siebers, J., Gottschild, D., Nolting, H.G., 1994. Pesticides in precipitation in northern Germany. *Chemosphere* 28, 1559-1570.
- Sillman, S., 2003. 9.11-Tropospheric Ozone and Photochemical Smog. *Treatise on Geochemistry* 9, 407-431.
- Šimek, M., Elhottová, D., Hopkins, D.W., 2002. What is the so-called optimum pH for denitrification in soil? *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1227-1234.
- Smeck, N.E., Runge, E.C.A., Mackintosh, E.E., 1983. Dynamics and genetic modelling of soil systems. In: Wilding, L.P., Smeck, N.E., Hall, G.F., (Eds.), *Pedogenesis and Soil Taxonomy. Part I. Concepts and Interactions*. Elsevier, Amsterdam, pp. 51-81.

- Smith, A.E., 1989. Degradation, fate, and persistence of phenoxyalkanoic acid herbicides in soil. *Reviews of Weed Science* 4, 1-24.
- Sommer, S.G., Schjoerring, J.K., Denmead, O.T., 2004. Ammonia emission from mineral fertilizers and fertilized crops. *Advances in Agronomy* 82, 557-622.
- Spark, K.M., Swift, R.S., 2002. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *Science of the Total Environ.* 298, 147-161.
- Sparling, G.P., 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research* 30, 195-207.
- Speir, T.W., Ross, D.J., 1978. Soil phosphatase and sulphatase. In: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, London, pp. 295-336.
- Sukul, P., Spiteller, M., 2001. Influence of biotic and abiotic factors on dissipating metalaxyl in soil. *Chemosphere* 45, 941-947.
- Tisdale, S.L., Nelson, W.L., Beaton, J.D., Halvin, J.L., 1993. *Soil Fertility and Fertilisers*. 5th Edition. Prentice Hall, New Jersey.
- Topp, E., Scheunert, I., Attar, A., Forte, F., 1986. Factors affecting the uptake of ¹⁴C-labelled organic chemicals by plant from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 11, 219-229.
- Topp, E., Vallaes, T., Soulas, G., 1997. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 547-575.
- UNEP, 1997 United Nations Environment Programme (UNEP), 1997. *World Atlas of Desertification*, Second Edition. Wiley, New York.
- van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture Ecosystems and Environment* 60, 81-96.
- van Emden, H.F., 1992. *Pest Control*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Webb, K.M., Aylmore, L.A.G., 2002. The role of soil organic matter and water potential in determining pesticide degradation. *Developments in Soil Science* 28, 117-125.
- Whitehead, D.C., 2000. *Nutrient Elements in Grassland: Soil-Plant-Animal Relationships*. CABI Publishing, Wallingford.
- Winter, T.C., 1999. Relation of streams, lakes, and wetlands to groundwater flow. *Hydrogeology Journal* 7, 28-45.
- Wittig, R., 1993. General aspects of biomonitoring heavy metals by plants. In: Market, B. (Ed.), *Plants as Biomonitors*, VCH Publisher, New York, pp. 3-27.
- Wrage, N., Velthof, G.L., Laanbroek, H.J., Oenema, O., 2004. Nitrous oxide production in grassland soils: assessing the contribution of nitrifier denitrification. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 229-236.

2

- 2.1. El acuífero cuaternario de Vitoria-Gasteiz
- 2.2. El humedal de Salburua

Zona de estudio

“Buscad leyendo y hallaréis meditando”

San Juan de la cruz (1542-1591)

2. Zona de estudio

2.1. El acuífero cuaternario de Vitoria-Gasteiz

El acuífero cuaternario de Vitoria-Gasteiz (Figura 2.1.) fue objeto de investigación en la tesis doctoral de Iñaki Arrate (1994) y representa un ejemplo bien documentado de degradación de recursos hídricos debido a un conjunto de actuaciones agrícolas inadecuadas con respecto al agua y al suelo. En la presente tesis no se ha llevado a cabo un seguimiento hidrodinámico ni hidroquímico del acuífero como en el caso de Martínez-Santos (2008) o Martínez (2012), sino que se han estudiado a escala de laboratorio determinados procesos relacionados con la dinámica de los contaminantes agrícolas en dicha acuífero. No obstante sí se hace necesario realizar una primera contextualización histórico-geográfica que ayude a comprender la problemática ambiental a la que esta sometida la zona agrícola que sirve de referencia para los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo.

2.1.1. Descripción

El acuífero cuaternario de Vitoria-Gasteiz, situado en el entorno de esta ciudad, está constituido por depósitos fluvio-aluviales que ocupan una extensión de unos 90 km² con un espesor medio del orden de 5 m. Se trata de un acuífero de carácter libre y porosidad intergranular. El coeficiente de almacenamiento presenta un valor medio de 0.2 y la transmisividad se encuentra en un rango de 40-150 m² d⁻¹.

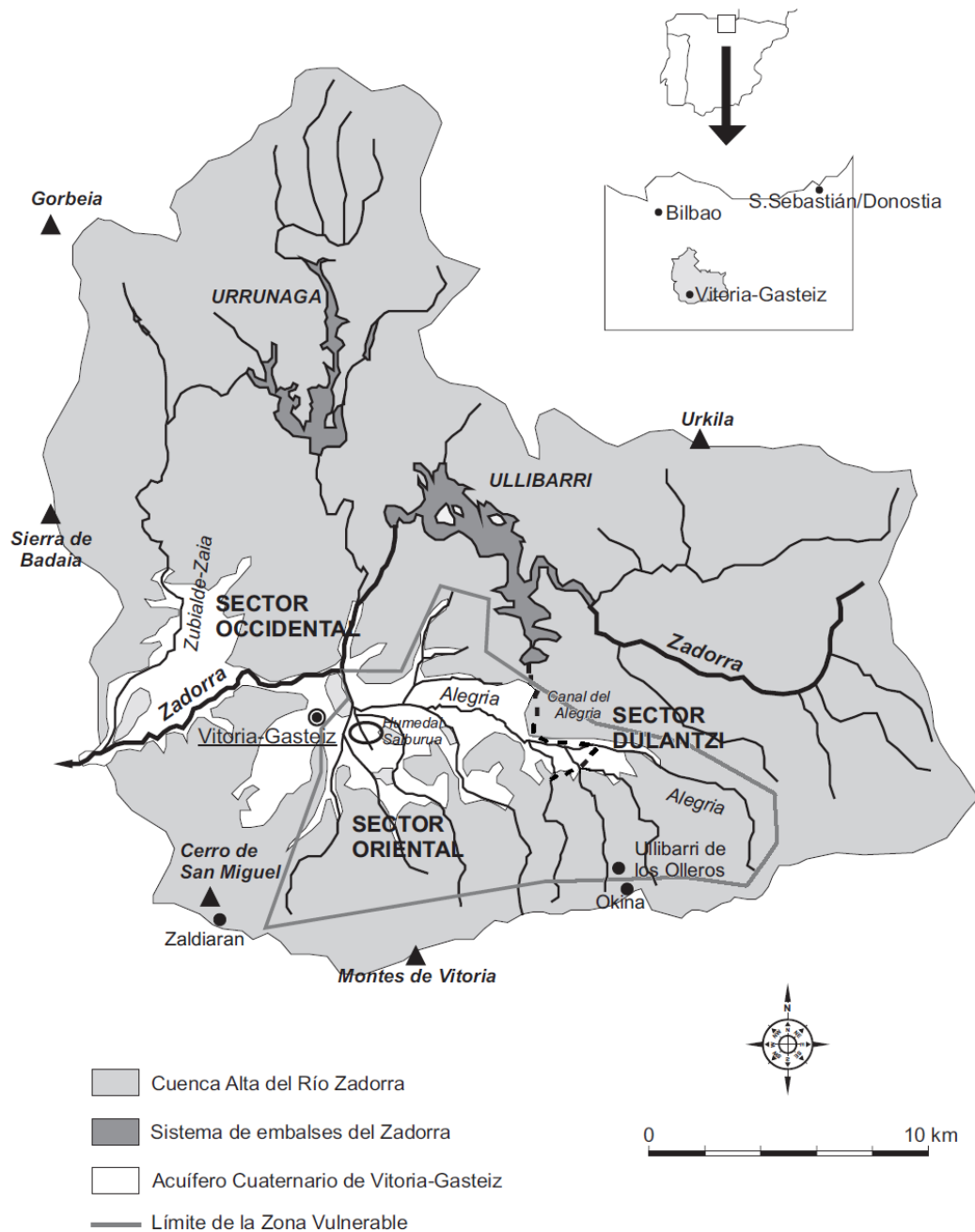


Figura 2.1. Localización geográfica del Acuífero Cuaternario y de la Zona Vulnerable.
Fuente: Arrate (2004)

La formación presenta dos sectores, claramente diferenciados en la Figura 2.1. El Oriental (Sector Oriental + Sector Dulantzi) ocupa unos 50 km² con un espesor de 2 a 10 m. Está formado por gravas heterométricas en una matriz areno-arcillosa. El Occidental, de unos 40 km² y 1 a 4 m de espesor, está básicamente constituido por materiales areno-limosos. Dado que en el momento de planificación de la tesis el área declarada como Zona Vulnerable a la contaminación por nitratos únicamente afectaba al sector oriental, a partir de este punto no se discutirán los factores relacionados con el sector occidental.

2.1.2. Transformaciones antrópicas del acuífero

2.1.2.1. Recarga del acuífero

Hasta mediados del siglo XX, la recarga al acuífero procedía fundamentalmente de las lluvias sobre los depósitos cuaternarios, y en menor cuantía de la infiltración de parte de las aguas de los ríos que atraviesan la formación en época de aguas altas.

La descarga del acuífero se producía sobre todo a la red fluvial, facilitada por la presencia de una red de zanjás, de unos 0.5 m de profundidad, tiempo antes excavadas para evitar las inundaciones en las áreas cultivadas. Hay que decir que en esta época el nivel freático se encontraba muy cerca de la superficie (0 - 1.5 m), lo que permitía la presencia de algunos humedales.

No obstante, a comienzos de los años 60 para evitar la inundación de terrenos cultivados, se modificó la red de drenaje sobre el acuífero. Los cauces de algunos ríos fueron profundizados o incluso modificados en su trazado, y se excavó una densa red de zanjás de hasta 2.5 m de profundidad, cuya geometría se adaptó a los terrenos agrícolas. Este hecho trajo consigo un descenso generalizado del nivel freático de entre 1 y 2.5 m, y, por tanto, una pérdida notable de la capacidad reguladora del acuífero. Los humedales desaparecieron con la consiguiente pérdida de su función ecológica. Igual suerte corrieron muchos pequeños manantiales situados en las cercanías de la red de zanjás.

Adicionalmente, con el fin de incrementar los aportes de agua a los embalses del Sistema Zadorra, al principio de los 70 se procedió a la derivación total, en la entrada del cuaternario, hacia ese Sistema del río Alegría y dos de sus afluentes (Figura 2.1.).

En consecuencia, el sector Oriental del acuífero perdió una fuente de recarga muy importante.

Estas dos modificaciones indujeron a que a pesar de la rápida recarga del acuífero que tiene lugar con las lluvias de invierno, el agua acumulada es drenada en un corto periodo de tiempo por la densa red de drenaje, de forma que durante el verano el nivel piezométrico es mínimo y está controlado básicamente por los bombeos agrícolas.

2.1.2.2. Usos del suelo

En lo que a los usos del suelo se refiere, la mayor parte del acuífero se dedicaba originalmente a la agricultura de secano, cereal sobre todo. No obstante, el cambio a mediados del siglo XX del cultivo de secano tradicional al de regadío de remolacha y patata, implicó un fuerte aumento de la demanda en agua, sobre todo en los meses estivales. Esta demanda se cubrió por bombeo de las aguas del propio acuífero en la mayor parte de su sector Oriental. Junto con esto, el cambio trajo también un notable aumento en el uso de fertilizantes y pesticidas sobre el acuífero.

El área ocupada por el cultivo de regadío pasó paulatinamente de menos del 1% del total del cuaternario en 1954 al 11.5% en 1968 y alcanzó el 67.5% en 1982. En contraposición, el secano pasó de un 78.9% en 1954 a un 11.4% en 1982, situación ésta que puede considerarse próxima a la actual.

2.1.3. Impactos sobre la calidad de las aguas del acuífero

2.1.3.1. Presencia de NO_3^-

El cambio en los usos del suelo, con una superficie de terreno cada vez mayor destinada a la agricultura de regadío, unido a la intensificación de la fertilización en los cultivos condujo a un rápido incremento en los contenidos de nitratos en las aguas subterráneas del acuífero.

A mediados del siglo XX, los datos disponibles sobre la calidad de las aguas subterráneas de la zona (IGME, 1968) evidenciaban una mineralización baja-media y una ausencia casi total de nitratos. En abril 1986 (datos del IGME, 1986) los análisis

indicaban ya una cierta presencia de NO_3^- en las aguas del acuífero, con unos contenidos que, por lo general, superaban los 50 mg L^{-1} , aunque por debajo de los 100 mg L^{-1} , excepto en áreas muy localizadas, próximas a pequeños núcleos de población.

Durante la primera mitad de la década de los 90 el incremento en el contenido en nitratos continuó siendo muy significativo, alcanzando valores habituales en torno a 150 mg L^{-1} y, puntualmente, de hasta 250 mg L^{-1} .

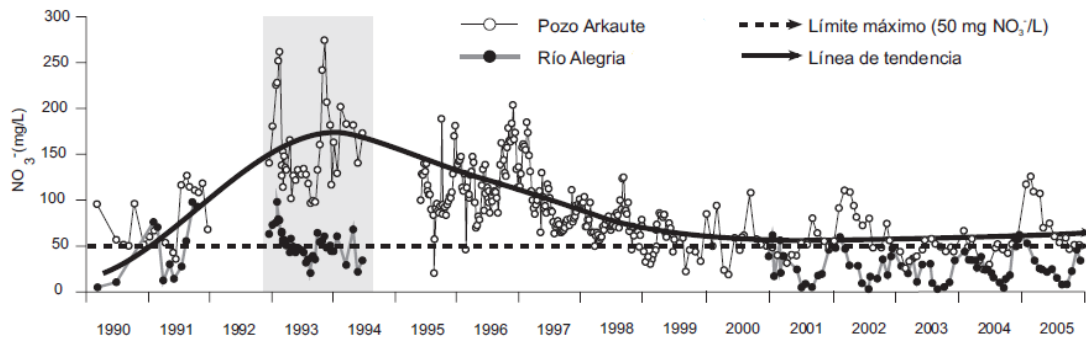


Figura 2.2. Evolución temporal del contenido en nitratos (mg L^{-1}) en un pozo del sector oriental del acuífero (Pozo Arkaute) y a la salida del río alegría desde 1990 hasta 2005. Fuente: Martínez-Santos, 2008

La explicación de esta tendencia creciente hay que buscarla en el origen del agua utilizada para riego. En el sector Oriental, con el río Alegria derivado, son las aguas del propio acuífero las que se usan para riego, produciendo así un cierto ciclo cerrado (se riega con aguas ya cargadas en fertilizantes) que explica el continuo incremento de nitratos en las aguas, del orden de 20 mg L^{-1} por año durante, al menos, algunos años.

A partir del año 1994, la concentración de nitrato empezó a descender progresivamente hasta alcanzar los $80\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$ a finales de los 90, y algo menos desde entonces a la actualidad, sin que en estos últimos años se haya venido observando una tendencia clara en la evolución de estos contenidos en las aguas del sector más oriental del acuífero. Esta disminución se pudo deber, al menos en parte, a un uso más racional de los fertilizantes y a un cambio en el origen del agua utilizada para el regadío la cual comenzó a obtenerse de pequeñas balsas artificiales de agua superficial ubicadas fuera del acuífero cuaternario (García-Linares et al., 2003).

2.1.3.2. Presencia de pesticidas

Junto con los nitratos, los pesticidas son la otra gran familia de compuestos procedentes de prácticas agrarias intensivas que representan un mayor peligro para la calidad de las aguas. Aunque hasta ahora se ha prestado mayor atención a los primeros, a medida que aumenta su presencia en las aguas y en la cadena trófica crece la preocupación sobre sus potenciales peligros para el medio ambiente y el ser humano.

La presencia de nitratos de origen agrario en las aguas puede actuar como primera señal de advertencia de que éstas puedan llegar a contener pesticidas, ya que su dinámica en el medio es más lenta que la de los nitratos, y son detectados en concentraciones mucho menores, aún siendo sus efectos tóxicos mucho mayores.

Mientras la presencia de nitratos ha venido siendo constatada desde hace más de 20 años en las aguas pertenecientes a la Zona Vulnerable, no ha sido hasta fechas recientes, cuando ha empezado a llevarse un control sobre la presencia de pesticidas de origen agrario.

Con motivo de la aplicación de la Directiva Marco de Aguas (2000/60/CE), la cual obliga a los estados miembros a vigilar y controlar la contaminación causada en el medio acuático por sustancias peligrosas, se estableció una Red de Control de Plaguicidas en la Comunidad Autónoma del País Vasco en el año 2008 (Red de Control de Aguas Subterráneas de la Agencia Vasca del Agua-URA).

Dicha red consta de un total de 29 puntos de muestreo, (5 en la Zona Vulnerable) localizados en puntos en los que por su cercanía a zonas de actividad agrícola y ganadera, es más probable, a priori, la detección de sustancias y subproductos ligados a los tratamientos extensivos. Se establecen dos campañas anuales (primavera e invierno) coincidiendo con los momentos hidrológicos más propicios para su detección en las aguas. Se analizan entre 18-45 sustancias diferentes, entre pesticidas y sus productos de degradación, en función de la mayor o menor probabilidad de encontrar ciertos compuestos asociados a tratamientos agrícolas concretos, pudiéndose incrementar o disminuir los parámetros en función de los resultados obtenidos

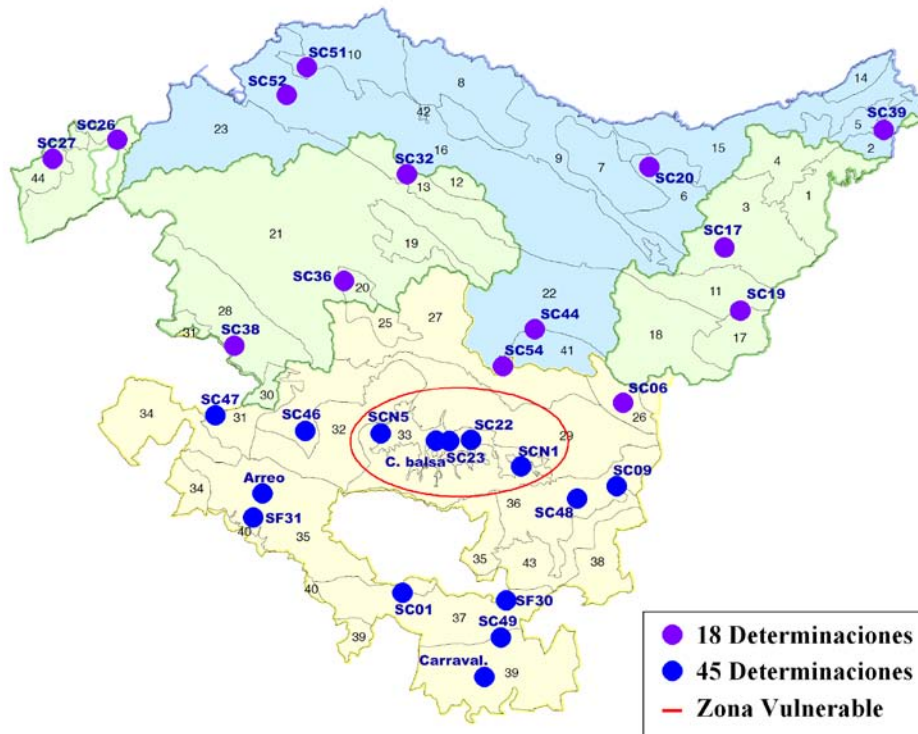


Figura 2.3. Distribución de los puntos de muestreo de la Red de Control de Plaguicidas del Gobierno Vasco. Fuente URA

En las primeras campañas llevadas a cabo entre abril de 2008 y abril de 2009 (Tabla 2.1.) se detectó la presencia de pesticidas en la mayoría de los puntos de muestreo de la Zona Vulnerable, con niveles que en muchos casos sobrepasaban el límite máximo de potabilidad (Directiva 2006/118/CE) situado en $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ de sustancia activa para cada pesticida hasta un máximo total de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. No obstante, se ha observado una tendencia positiva en la calidad de las aguas, sin detectarse presencia de ninguno de los 45 compuestos analizados en los últimos 2 años.

Adicionalmente, el Grupo de Química Analítica de la Facultad de Farmacia de Vitoria-Gasteiz llevó a cabo en colaboración con el Grupo de Hidrogeología una campaña de muestreo de aguas tanto superficiales y subterráneas entre Julio de 2007 y Noviembre de 2008 mucho más exhaustiva tanto en puntos de muestreo (13 en total) como en periodicidad (9 muestreos), detectando ininterrumpidamente la presencia de una gran variedad de pesticidas entre los que destacaban el difenoconazol y el etofumesato, alcanzando concentraciones máximas de $4,3$ y $3,8 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

2. Zona de estudio

Tabla 2.1. Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) de los pesticidas encontrados en las aguas subterráneas de la Zona Vulnerable.

Fecha	SONDEO				
	SCN5 Manantial Ulibarri	SF45 Canal de la balsa	SC22 Manantial Iartzza	SC23 Piezómetro Salburua	SCN1 Manantial Los chopos
10/04/2008	Chlorf (0,02)			Chlorf (0,03)	
07/10/2008		Clorp (0,02)	3,4 dicl (1,55)		3,4 dicl (0,48)
03/04/2009		Atraz (0,10) Etof (0,11)	Aldrin (0,02) Prom (0,03) 3,4 dicl (0,13) Chlorf (0,06) Clorp (0,04)		3,4 dicl (0,32)
06/11/2009					
14/04/2010		Terbut (0,12) Glif (0,07)			
04/11/2010					
11/04/2011					
04/11/2011					

Chlorf: Chlorfenvinphos; Clorp: Clorpyriphos; Atraz: Atrazine; Etof: Etofumesato; Terbut: Terbutylazine; Glif: Glifosato; 3,4 dicl: 3,4 dicloroanilina; Prom: Prometryn.
Fuente: Red de Control de Aguas Subterráneas de la Agencia Vasca del Agua
<http://www.telur.es/redbas/plaguicidas/default.html>

Si bien el volumen de datos disponibles es insuficiente como para poder realizar afirmaciones categóricas, las diferencias observadas entre las campañas de muestro llevadas a cabo por la Agencia Vasca del Agua y nuestro grupo de investigación, ponen de manifiesto la necesidad de ampliar la red de muestro tanto en una dimensión temporal como espacial, con el fin de realizar un seguimiento mucho más exhaustivo de la presencia de pesticidas en la Zona Vulnerable.

2.1.4. Declaración de Zona Vulnerable a la contaminación por nitratos

La contaminación de aguas superficiales y subterráneas por nitratos de origen agrario ha representado un problema constante en las principales zonas agrícolas del mundo durante las últimas décadas. La Unión Europea no fue ajena a esta problemática, y por ello la Comisión Europea estableció en diciembre de 1991 la Directiva del

Consejo (91/676/CEE), la cual fijaba unas directrices para proteger los ríos y corrientes subterráneas más expuestas a la contaminación por nitratos, estableciendo unas bandas de protección ambiental alrededor de ellos, que llamó "Zonas vulnerables". Se entendía por este término a todas aquellas superficies territoriales cuya escorrentía o filtración afecte o pueda llegar a afectar a masas de agua con contenidos en nitrato superiores al límite fijado en 50 mg L^{-1} . Además dicha directiva recomienda establecer «programas de acción» respecto de las zonas vulnerables designadas, los cuales deben incluir medidas concretas para recuperar la calidad de las aguas de la zona afectada.

En el caso de España, el estado traspuso esta Normativa mediante el Real Decreto 261/1998 (BOE número 61 de 11 de marzo de 1996), y finalmente el Gobierno Vasco mediante el Decreto 390/1998 declaró como Zona Vulnerable el Sector Oriental de la Unidad Hidrogeológica Vitoria-Gasteiz, al tiempo que se aprobó el Código de Buenas Prácticas Agrarias. En dicho código se establecen los límites de abonado y aplicación de pesticidas según los diferentes cultivos y la calidad del suelo, así como la época y condiciones de aplicación de los fertilizantes y pesticidas.

Con posterioridad, los seguimientos de la calidad de las aguas realizados en el ámbito del País Vasco indicaron que el Sector Dulantzi, perteneciente también a la Unidad Hidrogeológica Vitoria-Gasteiz, también estaba afectado de forma significativa y continuada por nitratos de origen agrario. En consecuencia, mediante la Orden de Abril de 2008 se amplió la Zona Vulnerable incluyendo el Sector Dulantzi así como sus áreas de recarga ocupadas por usos agrarios. De esta forma, la Zona Vulnerable resultante pasó a denominarse: Unidad Hidrogeológica Vitoria-Gasteiz, Sectores Oriental y Dulantzi. Finalmente, en 2009 se produce la declaración de Zona Vulnerable en el Sector Occidental del acuífero (Orden de 18 de noviembre de 2009), por la que se declara zona vulnerable a la contaminación por nitratos a la unidad hidrogeológica Vitoria-Gasteiz, Sector Occidental-Foronda I y II. En el presente trabajo solo se hace referencia al sector Oriental-Dulantzi al ser éste el que estaba vigente en el momento de planificación de la tesis.

En diciembre de 2000, el Gobierno Vasco aprobó el Plan de Actuación en Zonas Vulnerables, que desde entonces rige la que es hasta ahora la única Zona Vulnerable de la Comunidad Autónoma del País Vasco. El Plan establece, entre otras indicaciones,

“medidas de control y seguimiento de la evolución temporal de nitratos”. El seguimiento de la calidad de las aguas es una herramienta vital para comprobar la eficacia de las medidas correctoras establecidas en el Plan de Actuación, y llegado el caso, modificarlas (Martínez-Santos, 2008).

La Dirección de Aguas del Gobierno Vasco es la encargada de llevar a cabo el seguimiento de la calidad de las aguas subterráneas y superficiales de la Zona Vulnerable. Paralelamente, el Grupo de Hidrogeología de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea gestiona su propia red en el marco de sus proyectos de investigación.

2.2. El humedal de Salburua

El humedal de Salburua, localizado geográficamente en las proximidades del municipio de Vitoria-Gasteiz, está formado por dos lagunas. La más occidental es conocida con el nombre de Balsa de Betoño, que se extiende hasta las cercanías de la localidad del mismo nombre y ocupa una extensión aproximada de 20 hectáreas. La Balsa de Zurbano, en el sector más oriental de este humedal, está constituida a su vez por las Balsas de Arkaute, con 28 hectáreas, y al norte suyo, por la Balsa de Larregana, la más pequeña de las tres con 18 hectáreas (Figura 2.4.). En máxima inundación todas ellas suman unas 66 hectáreas de lámina de agua, aproximadamente una tercera parte de la superficie total del humedal (CEA, 2004).

Este humedal forma parte de la convención RAMSAR desde 2002 y está enclavado en la red de parques que bordean la ciudad, conocida como “Anillo Verde”. Adicionalmente, Salburua está emplazado dentro de la Zona Vulnerable y es un punto natural de descarga del acuífero cuaternario, de ahí su importancia en la hidrodinámica e hidroquímica que rigen dicho acuífero.

En el presente trabajo, los estudios se han centrado únicamente en la Balsa de Arkaute, la mayor de todas ellas, mientras que la de Betoño ha sido descartada por la influencia que pudiese ejercer sobre ella la actual expansión urbanística de la ciudad de Vitoria-Gasteiz, la cual se extiende hasta el límite mismo de dicha balsa. Por su parte, la Balsa de Larregana permanece seca prácticamente durante todo el año.



Figura 2.4. Localización de las Balsas de Zurbano (Arkaute + Larregana) y Betoño. Aparece representado el Canal de la Balsa, así como las numerosas acequias de drenaje, la salida de la balsa. Fuente Martínez-Santos, 2008.

2.2.1. Antecedentes del humedal

El humedal se consiguió conservar más o menos natural, hasta que el en año 1857 se realizó la apertura de un conjunto de acequias de drenaje cuyo objetivo era el drenaje de los terrenos para aumentar la zona de cultivo (CEA, 2004). La restauración del humedal en 1998 conllevó la inutilización del Canal de la Balsa (principal vía de drenaje), la retirada de los cultivos y el inicio de la reforestación con especies vegetales autóctonas. La recuperación comenzó con la construcción de un dique con compuerta para la regulación del nivel en la balsa, y en el acuífero, y evitar que una subida excesiva afectase a zonas cultivadas próximas (área de Arkaute) (Martínez et al., 2001).

La restauración del humedal supuso un aumento de nivel piezométrico de 1.5 m, y la aparición de una lámina de agua libre en el centro de la balsa. Actualmente abundan en sus aguas especies tales como *Lemna minor* y algas filamentosas (*i.e. Cladophora sp* y *Spirogyra sp*) presentes habitualmente en aguas sometidas a procesos de eutrofización (Martínez-Santos, 2008). El área más oriental, junto a la academia de la Ertzaintza, está repoblada con especies autóctonas de robles, fresnos, arces y arbustos diversos.

2.2.2. Atenuación natural de nitratos

Tras la recuperación se procedió a un control mensual de la calidad de las aguas del entorno de la Balsa de Zurbano (Martínez-Santos, 2008). Se estableció en 2001 una red que incluía tanto las aguas superficiales (acequias de entrada y salida, y arroyos) como las aguas subterráneas (pozo Arkaute y piezómetros a distintas profundidades).

Los contenidos en nitratos de las aguas a la salida de la Balsa presentan una notable disminución respecto a los de las aguas de entrada por el S (Arkaute), mayoritarias en la Balsa, fenómeno no explicable por dilución, como evidencian ensayos realizados con cloruro como elemento conservativo (Martínez-Santos, 2008).

Como se ha discutido anteriormente, los humedales son ecosistemas riparios que actúan como verdaderos filtros naturales frente a la contaminación difusa de origen agrícola. En el caso del humedal de Salburua, estudios anteriores evidencian el papel activo del humedal en la pérdida de nitratos de las aguas (Martínez et al., 2001; García-Linares et al., 2003 y 2005; Martínez-Santos, 2008). De hecho, la presencia de

sedimentos ricos en materia orgánica [3-5 % en los primeros 50 cm del sector oriental (Martínez-Santos, 2008)], las condiciones redox (abundantes bandas de oxido-reducción en los suelos, y valores de hasta -270 mV en las aguas más profundas de los piezómetros) y el régimen de flujo semiconfinado (condicionado por el paquete arcilloso en superficie) propician las condiciones necesarias para el desarrollo de una intensa actividad microbiana desnitrificadora. Con el fin de corroborar tal hipótesis, se llevaron a cabo ensayos de potencial de desnitrificación con bloqueo de acetileno en muestras de suelo procedentes de la zona no saturada del humedal, midiéndose tasas de desnitrificación de 18,7-20,3 mg N día⁻¹ kg⁻¹ en las muestras de suelo de los horizontes más superficiales y bastante menores en los inferiores, en relación directa con la materia orgánica, confirmando la capacidad del suelo del humedal para eliminar nitratos vía desnitrificación (Sánchez-Pérez et al., 2003).

2.2.3. Atenuación natural de pesticidas

Los muestreos llevados a cabo por la Agencia Vasca del Agua en el periodo 2008-2009 evidenciaron la presencia de pesticidas en la balsa de Zurbano, tanto en aguas superficiales como subterráneas, aunque actualmente su concentración se encuentra por debajo de los límites de detección.

Si bien hay evidencias de la funcionalidad del humedal como filtro natural frente a la contaminación por nitratos, no se disponen de datos suficientes para determinar su papel en la dinámica de los pesticidas que afectan a la Zona Vulnerable, así como para estudiar las posibles interacciones de los pesticidas con las poblaciones microbianas desnitrificantes del humedal.

2.3. Referencias

Antigüedad, I., Martínez-Santos, M. Martínez, M., Muñoz, B. Zabaleta, A. Uriarte, J., Morales, T., Iribar, V., Sánchez, J.M., Ruiz, E., 2009. Atenuación de nitratos en el Humedal de Salburua (País Vasco). Contexto hidrogeológico. Boletín Geológico y Minero 120, 409-422.

- Arrate, I., Morell, I., Antigüedad, I., 1992. La contaminación por nitratos en el Acuífero Cuaternario de Vitoria-Gasteiz. Distribución espacial y evolución temporal. *Hidrogeología y Recursos Hidráulicos XVI*, 127-141.
- Arrate, I., 1994. Estudio Hidrogeológico del Acuífero Cuaternario de Vitoria-Gasteiz (Araba, País Vasco). Tesis Doctoral. Departamento de Geodinámica. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Arrate, I., Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., Vallecillo, M.A., Iribar, V., Ruiz, M., 1997. Groundwater pollution in Quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, Spain). *Environmental Geology* 30, 257-265.
- CEA, 2004. Salburua, Agua y Vida. Ed. CEA Centro de Estudios Ambientales, Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz.
- García-Linares, C., Martínez-Santos, M., Martínez-Bilbao, V., Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., 2003. Wetland restoration and nitrate reduction: the example of the peri-urban wetland of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, North Spain). *Hydrology and Earth System Sciences* 7, 109-121.
- García-Linares, C., Martínez, M., Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., 2005. Nitrate time-evolution in the waters of the quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, Spain). Influence of wetlands. En: Razowska, L. y Saduski, A. (Eds.), *Nitrates in Groundwater in Europe*, IAH Selected Papers, 15-25.
- IGME, 1968. Estudio hidrogeológico general de la provincia de Alava. Instituto Geológico y Minero de España. Memoria inédita.
- IGME, 1986. Proyecto para el análisis de focos de contaminación, evolución y efectos en la Unidad Cuaternaria de Vitoria. Instituto Geológico y Minero de España. Memoria inédita.
- Martínez M., García C., Antigüedad I., Sánchez-Pérez J.M., Aizpurua A., 2001. Funcionalidad de las zonas húmedas del cinturón peri-urbano de Vitoria-Gasteiz: consecuencias sobre la desnitrificación de las aguas subterráneas. En: López-Rodríguez J.J., Quemada Sáez-Badillos M. (Eds.): *Actas de las V Jornadas sobre Investigación en la Zona no Saturada*, Pamplona, 147-156
- Martínez-Santos, M., 2008. Dinámica espacio-temporal de la calidad de las aguas de la Zona Vulnerable de Vitoria-Gasteiz (País-Vasco). Tesis Doctoral. Departamento de Geodinámica. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Martínez, M., 2012. Caracterización hidrodinámica e hidroquímica del humedal de Salburua (Álava, País Vasco). Tesis Doctoral. Departamento de Geodinámica. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Sánchez-Pérez, J.M., Iribar, A., Martínez, M., García-Linares, C., Antigüedad I., 2003. Eliminación de nitratos por desnitrificación en la zona no saturada del suelo en un humedal del cinturón peri-urbano de Vitoria-Gasteiz. En: Álvarez-Benedí, J., Marinero, P. (Eds.), *Estudios de la Zona no Saturada del suelo VI*, Valladolid, 385-390.

3

3.1. Objetivo general

3.2. Objetivos específicos

Objetivos

*“El experimentador que no sabe lo que
está buscando no comprenderá lo que
encuentra”*

Claude Bernard (1813-1878)

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

La modernización e intensificación de la agricultura ha permitido aumentar los rendimientos de producción al ritmo que demanda una población en constante crecimiento. Sin embargo, este hecho ha llevado asociado una serie de impactos adversos en el medio ambiente que pueden llegar a comprometer la sostenibilidad de la agricultura en el futuro. A la degradación de la calidad de las aguas asociada al uso de fertilizantes y pesticidas agrícolas, hay que añadir los impactos que dichos compuestos pueden ocasionar en la calidad del suelo, la cual viene determinada en buena parte por el estado de las comunidades microbianas edáficas que regulan muchos de los procesos que tienen lugar en el ecosistema edáfico.

Por todo ello, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar, a escala de laboratorio, los posibles impactos que algunos fertilizantes y pesticidas empleados en la Zona Vulnerable de Vitoria-Gasteiz tienen sobre la calidad del suelo y el agua en dicha zona.

3.2. Objetivos específicos

- O.1.: Estudiar el comportamiento de fertilizantes y pesticidas utilizados en una parcela representativa de la Zona Vulnerable durante el cultivo de remolacha azucarera con el fin de evaluar su lixiviación a las aguas subterráneas y su persistencia en el suelo (Capítulo 5). Contrastar los datos de campo con las simulaciones de los modelos LEACHN y LEACHP.
- O.2.: Simular, a escala de laboratorio mediante columnas de lixiviación, la dinámica de los nitratos en las aguas subterráneas que circulan a través del suelo de la zona riparia del humedal de Salburua:
- O.2.1. Analizar los distintos procesos microbianos responsables de la eliminación de nitratos de las aguas subterráneas (Capítulo 6).
 - O.2.2. Determinar la influencia de la temperatura y de la materia orgánica del suelo en la eliminación de nitratos (Capítulo 6).
- O.3.: Estudiar el impacto de la deltametrina sobre la actividad microbiana desnitrificante en el suelo de la zona riparia del humedal de Salburua (Capítulo 7).
- O.4.: Evaluar los parámetros microbiológicos con potencial bioindicador más sensibles a los impactos de los contaminantes agrícolas sobre la calidad del suelo, especialmente aquellos involucrados en el ciclo del nitrógeno (Capítulo 8, 9, 10).
- O.5.: Monitorizar el impacto sobre la calidad del suelo asociado a distintos fertilizantes y pesticidas utilizados en la Zona Vulnerable de Vitoria-Gasteiz, analizando asimismo la repercusión de dichos impactos en la calidad de las aguas:
- O.3.1.: Comparar la fertilización inorgánica (NPK 8-15-15) frente a la orgánica (avicompost) (Capítulo 9).
 - O.3.2.: Analizar tres pesticidas funcionalmente distintos: difenoconazol (fungicida), deltametrina (insecticida) y etofumesato (herbicida) (Capítulo 9).

- O.3.3.: Evaluar los efectos sinérgicos y/o antagónicos de la aplicación conjunta de fertilizantes y pesticidas (Capítulo 9).
- O.3.4.: Determinar el efecto de la concentración de los pesticidas en el suelo (5, 50 y 500 mg kg⁻¹) (Capítulo 10).

3. Objectives

3.1. General objective

Modernization and intensification of agriculture have managed to increase crop yields at the rate demanded by a growing world population. Nevertheless, this fact has resulted in a variety of adverse impacts on the environment, which can put the future sustainability of agriculture at risk. In this respect, apart from the degradation of water quality due to the use/abuse of fertilizers and pesticides, the impact of these compounds on soil quality must be considered. Such impact depends, to a great extent, on the status of the soil microbial communities, since they are responsible for many of the processes that take place in the soil ecosystem.

Therefore, the main objective of this work was to study, under laboratory conditions, the potential impact of some of the fertilizers and pesticides currently used in the Vulnerable Zone of Vitoria-Gasteiz on its soil and water quality.

3.2. Specific objectives

- O.1.: To study the fate of fertilizers and pesticides in a representative agricultural plot from the Vulnerable Zone during sugar beet cultivation, regarding their leaching to groundwater and persistence in the soil ecosystem (Chapter 5). To contrast field data with simulations from LEACHN and LEACHP models.
- O.2.: To simulate, under laboratory conditions and using soil column leaching assays, nitrate dynamics in the groundwater entering the riparian zone of the Salburua wetland:
- O.2.1.: To analyse the different microbial processes responsible for nitrate removal in groundwater (Chapter 6).
- O.2.2.: To assess the influence of temperature and soil organic matter on nitrate removal (Chapter 6).
- O.3.: To study the impact of the insecticide deltamethrin on microbial denitrifying activity from the riparian zone of the Salburua wetland (Chapter 7).
- O.4.: To assess those microbial parameters with potential as bioindicators of soil quality which are most sensitive to the impact of agricultural pollutants, specially those involved in the nitrogen cycle (Chapters 8, 9, 10).
- O.5.: To monitor the impact of different fertilizers and pesticides currently used in the Vulnerable Zone of Vitoria-Gasteiz on soil quality, as well as the effects of such impact on water quality:
- O.3.1.: To compare inorganic (NPK 8-15-15) *versus* organic fertilization (avicompost) (Chapter 9).
- O.3.2.: To analyse three functionally different pesticides: difenoconazole (fungicide), deltamethrin (insecticide) and ethofumesate (herbicide) (Chapter 9).
- O.3.3.: To evaluate synergistic and/or antagonistic effects from the simultaneous application of fertilizers and pesticides (Chapter 9).

O.3.4.: To assess the effect of pesticide concentration in soil (5, 50 and 500 mg kg⁻¹) (Chapter 10).

3. Objectifs

3.1. Objectif général

La modernisation et l'intensification de l'agriculture a permis augmenter les rendements au rythme demandé par une population en constante croissance. Cependant, ce fait a été associé à une série d'impacts négatifs sur l'environnement qui peuvent compromettre la durabilité de l'agriculture dans l'avenir. À cet égard, à la dégradation de la qualité de l'eau associée à l'utilisation / l'abus d'engrais et de pesticides, il faut ajouter les impacts que ces composés peuvent avoir sur la qualité des sols, laquelle est largement déterminée par l'état des communautés microbiennes du sol qui régulent de nombreux processus qui se déroulent dans l'écosystème souterrain.

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier en laboratoire les impacts potentiels que certains engrais et pesticides utilisés dans la Zone Vulnérable à Vitoria-Gasteiz ont sur la qualité des sols et de l'eau de cette région.

3.2. Objectifs spécifiques

- O.1.: Etudier le comportement des engrais et des pesticides utilisés dans une parcelle représentative de la Zone Vulnérable au cours de la culture de la betterave sucrière, afin d'évaluer leur lessivage vers les eaux souterraines et leur persistance dans le sol (Chapitre 5). Comparer les données du terrain avec des simulations réalisées avec les modèles LEACHN et LEACHP.
- O.2.: Simuler, à l'échelle du laboratoire en utilisant des colonnes de lixiviation, la dynamique des nitrates dans les eaux souterraines s'écoulant au travers de du sol riparien de la zone humides de Salburua:
- O.2.1. Analyser les différents processus microbiens responsables de l'élimination des nitrates des eaux souterraines (Chapitre 6).
 - O.2.2. Déterminer l'influence de la température et de la matière organique du sol dans l'élimination des nitrates (Chapitre 6).
- O.3.: Etudier l'impact de la deltaméthrine sur l'activité microbienne dénitrifiante dans le sol riparien de la zone humide de Salburua (Chapitre 7).
- O.4.: Evaluer les paramètres microbiologiques potentiellement bioindicateurs les plus sensibles aux effets des polluants agricoles sur la qualité des sols, en particulier ceux impliqués dans le cycle de l'azote (Chapitre 8, 9, 10).
- O.5.: Surveiller l'impact sur la qualité des sols associé à différents engrais et pesticides utilisés dans la zone vulnérable à Vitoria, en analysant les effets de ces impacts sur la qualité de l'eau:
- O.5.1.: Comparer l'engrais minéral (NPK 15-08-15) et l'engrais organique (avicompost) (Chapitre 9).
 - O.5.2.: Analyser trois pesticides fonctionnellement distincts: le difénoconazole (fongicide), la deltaméthrine (insecticide) et l'éthofumesate (herbicide) (Chapitre 9).
 - O.5.3.: Évaluer les synergies et/ou antagonistes mise en œuvre conjointe d'engrais et de pesticides (Chapitre 9).

O.5.4.: Déterminer l'effet de la concentration de pesticides dans le sol (5, 50 et 500 mg kg⁻¹) (Chapitre 10).

4

- 4.1. Descripción de los ensayos
- 4.2. Compuestos agroquímicos utilizados
- 4.3. Métodos analíticos
- 4.4. Modelo LEACHM
- 4.5. Problemas experimentales

Material es y métodos

*“Lo que con mucho trabajo se adquiere,
más se ama”*

Aristóteles (384 AC-322 AC)

4. Materiales y métodos

4.1. Descripción de los ensayos

4.1.1. Ensayo 1: Modelización del transporte de nitratos y pesticidas en una parcela agrícola de la Zona Vulnerable (Capítulo 5)

El objetivo del presente ensayo era estudiar el comportamiento de los fertilizantes y los pesticidas utilizados en una parcela representativa de la Zona Vulnerable durante el cultivo de remolacha azucarera con el fin de evaluar su lixiviación a las aguas subterráneas y su persistencia en el suelo. Adicionalmente se contrastaron las medidas de campo con las simulaciones de los modelos LEACHN y LEACHP, con el fin de evaluar su validez de cara a futuros estudios.

La parcela de referencia está localizada al este del pueblo de Gauna (Álava), en el Sector Dulantzi de la Zona Vulnerable del acuífero cuaternario de Vitoria-Gasteiz (42° 49N; 2° 29W). Ésta posee una extensión de 3.55 ha, una pendiente casi nula, y en

ella se practica la rotación de remolacha azucarera (*Beta vulgaris L.*) y trigo de invierno (*Triticum aestivum L.*), característica de la zona agrícola de estudio.

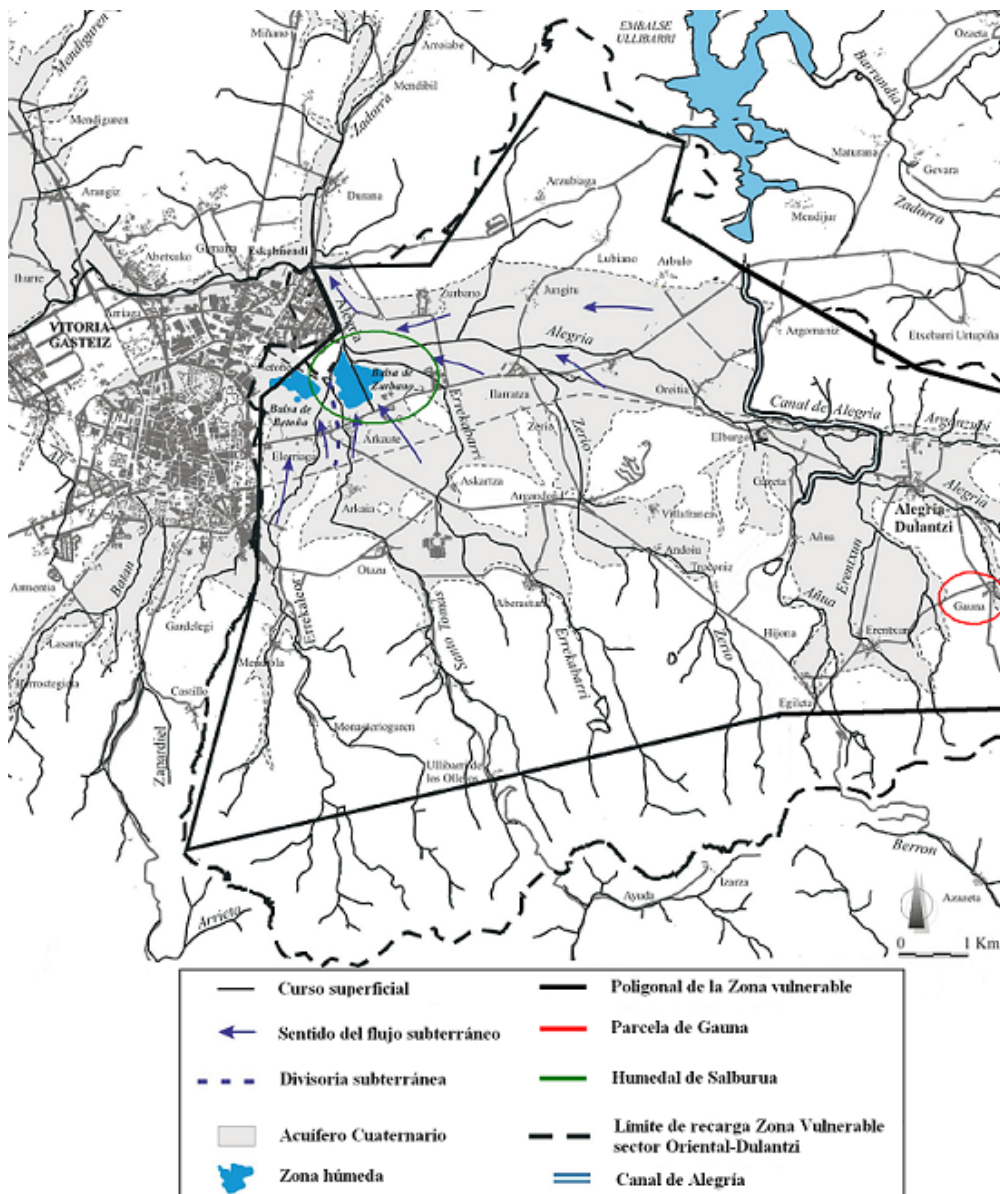


Figura 4.1. Localización de la parcela de Gauna y el humedal de Salburua en la Zona Vulnerable. Fuente: Martínez-Santos, 2008.

Esta parcela ha venido siendo utilizada desde 2007 por el grupo de Hidrogeología y de Química Analítica de la UPV-EHU para estudiar la dinámica de nitratos y pesticidas tanto en suelo como en aguas subterráneas bajo diferentes tipos de cultivo. Para ello dispone de dos piezómetros situados los extremos de la parcela, uno en la zona de entrada (GAU-2) y otro en la zona de salida (GAU-1) del flujo de de las aguas subterráneas, para la toma de muestras y el seguimiento de la evolución del nivel

piezométrico. Se cuenta adicionalmente con la valiosa colaboración de su propietario, Fernando, el cual lleva a cabo un control minucioso de todas las aportaciones que recibe la parcela a lo largo del periodo de cultivo: precipitaciones, riego, fertilizantes, pesticidas...

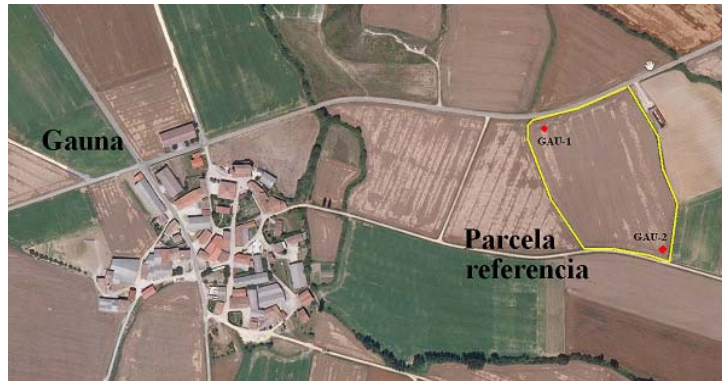


Figura 4.2. Localización de la parcela experimental en el municipio de Gauna.
Fuente: SIGPAC

El periodo modelado incluyó un ciclo entero de cultivo de remolacha azucarera que fue sembrada el 23 de abril de 2007 y cosechada el 30 de Octubre de 2007. Durante el periodo de estudio se identificaron todas las aportaciones de fertilizantes y pesticidas, así como la intensidad y duración de los riegos aplicados por aspersión. Los datos climatológicos se recopilaron de la estación meteorológica de Arkaute, dentro de la Zona Vulnerable, aunque los datos correspondientes a las precipitaciones sucedidas durante el periodo de estudio proceden de las mediciones recogidas por el propio agricultor en el mismo pueblo de Gauna.

Se contó con los datos de campo recogidos por nuestro grupo de investigación en la parcela de Gauna entre marzo y noviembre de 2007 que incluían: evolución de la concentración de NO_3^- y pesticidas en agua subterránea y del nivel piezométrico. Adicionalmente se contó con los datos de tres muestreos de suelo llevados a cabo en tres momentos diferentes del periodo de cultivo (presembrado, en mitad del cultivo y tras la cosecha), a distintas profundidades (0-30, 30-60 y 60-90 cm) con el fin de analizar el contenido de NO_3^- y pesticidas. Para estos últimos también se analizó el primer centímetro de suelo al ser la parte del suelo en la que quedan mayoritariamente adsorbidos.

4.1.2. Ensayo 2: Simulación a escala de laboratorio de la atenuación natural de nitratos en el suelo del humedal de Salburua (Capítulo 6)

El objetivo del presente estudio era simular a escala de laboratorio la dinámica de los nitratos transportados por las aguas subterráneas a través del suelo del humedal de Salburua. Mediante ensayos basados en columnas de lixiviación se quiso estudiar la importancia de los distintos procesos microbianos responsables de la eliminación de nitratos así como la influencia de la materia orgánica y la temperatura en dicho proceso.



Figura 4.3. Localización, extracción y montaje final de las columnas inalteradas de lixiviación. Fuente: Sigpac (A), propias (B,C,D,E).

Los trabajos llevados en el entorno de Salburua (Figura 4.1.), se han centrado en una localización concreta del humedal: la zona riparia cuya restauración ecológica comenzó en el 1998 y que está situada en la parte más oriental del humedal, entre la balsa de Arkaute y la academia de la Ertzaina (Figura 4.3.). La elección de este emplazamiento no fue trivial, ya que a través de ella discurren los principales flujos de entrada de agua subterránea al humedal, representando el 15% del total de los aportes que recibe.

En esta localización, el grupo de Hidrogeología de la UPV-EHU lleva desarrollando una intensa actividad investigadora en los últimos años con el fin de identificar los flujos subterráneos de entrada al humedal así como el papel que juega Salburua en la dinámica de los nitratos de la Zona Vulnerable (Martínez-Santos, 2008; Martínez, 2012).

Para ello se tomaron 9 columnas de suelo inalterado en un punto central de la zona riparia mediante martillo percutor y testigo porta tuberías de PVC (1 m de profundidad y 4,5 cm de diámetro interior). Tres de las columnas se destinaron para su caracterización y análisis morfométrico por horizontes así como para su análisis físico-químico, y el resto para los ensayos de lixiviación.

Cada columna se dividió en sus tres horizontes (H-A, 0-20 cm; H-Bg, 20-70 cm; y H-B2g, 70-90 cm), a cada uno de los cuales se les acopló una serie de elementos de PVC y PP de acuerdo al esquema de la Figura 4.4. Dicho sistema, al ser estanco, nos permitió asegurar un ambiente anóxico durante la lixiviación, a la vez que facilitaba la acumulación del lixiviado y los gases generados hasta su extracción. La lixiviación se realizó introduciendo la corriente de entrada por la parte inferior de las columnas simulando el flujo ascendente de las aguas subterráneas que se da en la zona de estudio.

Se introdujo mediante bomba peristáltica un caudal de 90 mL d⁻¹ de agua desionizada desoxigenada con helio (equivalente a los 46 mm d⁻¹ de un episodio de riego en los campos agrícolas que rodean el humedal) con una concentración de 200 mg NO₃⁻ L⁻¹ (correspondiente a los valores máximos registrados en las aguas subterráneas en la década de los 80-90) con el fin de simular las condiciones medioambientales más adversas a las que se enfrentó el humedal. Se dispuso un set de tres réplicas para cada horizonte para su lixiviación a 20 y 10°C.

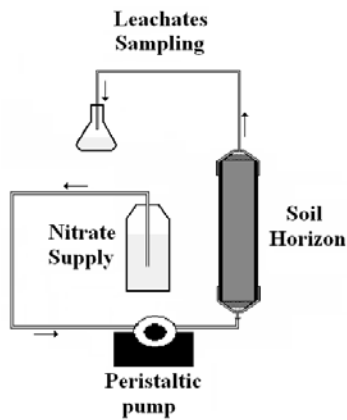
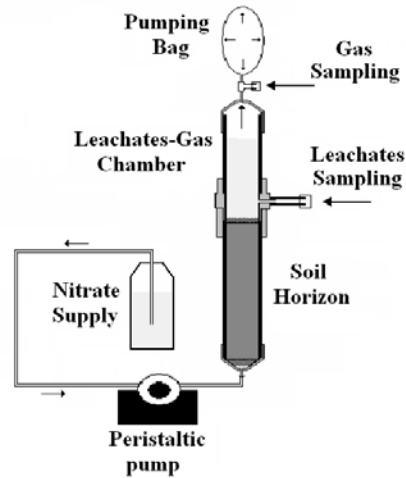
A) Traditional design*B) New design proposed*

Figura 4.4. Esquema de montaje de las columnas de lixiviación.

Durante los 125 días que duró el ensayo, se analizó periódicamente en el lixiviado el contenido en NO_3^- , NH_4^+ , carbono orgánico disuelto (en inglés, dissolved organic carbon, DOC) y pH, así como el contenido en CO_2 y N_2O de los gases generados. Al final del ensayo las columnas se diseccionaron para el análisis físico-químico de los suelos.

4.1.3. Ensayo 3: efecto de la deltametrina sobre la desnitrificación en Salburua (Capítulo 7)

En un primer intento por estudiar el posible impacto de los pesticidas sobre la capacidad desnitrificadora del humedal de Salburua se llevó a cabo el siguiente ensayo. Se realizó un mallado en la zona riparia del humedal de Salburua, y en cada punto se extrajo muestra de los primeros 20 cm de suelo mediante barrena manual (Figura 4.5.). Tras la separación manual de piedras y raíces de gran tamaño se trasladaron al laboratorio en bolsas herméticamente cerradas y refrigeradas (tiempo de transporte inferior a 90 minutos). Una vez en el laboratorio se homogeneizaron y se tomó una muestra representativa para su posterior análisis físico-químico.

Tras 48 h de secado a temperatura ambiente, se homogeneizaron, trituraron y tamizaron < 2 mm. A continuación se dividieron en 4 partes, a cada una de las cuales se les aplicó una solución de hexano con distintas cantidades de deltametrina disuelta de

forma que la concentración final en el suelo fuera de 0, 25, 125 y 250 mg deltametrina kg s.s.



Figura 4.5. Proceso de toma de muestras de suelo y su posterior tratamiento.
Fuente: Sigpac (A) y propias (B, C, D, E, F)

Tras 24 h de evaporación del disolvente, se tomaron submuestras de 25 g de suelo de cada una de las muestras y se dispusieron en el interior de recipientes de vidrio con cierre hermético, se ajustó su humedad al 75 % de su capacidad de campo y se introdujo un vasito con NaOH 0,1 M para capturar el CO₂ producido por el suelo durante su incubación a 20°C en oscuridad. Tras 2, 15, 28 y 58 días se cuantificó el CO₂ producido y el contenido en deltametrina en el suelo.

Paralelamente se tomaron 25 g de suelo de cada una de las muestras y se dispusieron en el interior de viales de 120 mL cerrados herméticamente con septum de caucho perforable. Tras ajustar su humedad al 75 % de su capacidad de campo y

sustituir la atmósfera interior del vial por He, los viales se incubaron bajo condiciones anóxicas y en oscuridad a 20°C. Tras 2, 15, 28 y 58 días se midió el contenido en deltametrina del suelo, así como la generación de N₂, CO₂, N₂O y CH₄ en el interior del vial mediante cromatógrafo de gases (KNK 3000 HRGC) equipado con detector de conductividad térmica, una columna empacada Porapak Q 80/100 3 m x 1/8” (Sugelabor) y helio como gas portador con un caudal de 16 mL min⁻¹. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes: temperatura de columna: 25 °C; temperatura de inyección: 25 °C; temperatura del detector: 150 °C.

Ambos ensayos se llevaron a cabo adicionalmente en presencia de 20 mg N-NO₃⁻ kg s.s. para evaluar el efecto conjunto de nitratos y deltametrina en la desnitrificación bacteriana.

4.1.4. Ensayo 4: validación de parámetros microbianos con potencial bioindicador de la calidad del suelo (Capítulo 8)

Tras una intensiva revisión bibliográfica y constatar la gran diversidad de metodologías existentes para el estudio del impacto de agroquímicos en la calidad del suelo a escala de laboratorio, se optó por seguir la metodología de “incubaciones en bandejas” descrita por Monkiedje et al. (2002) aunque con diversas modificaciones, para adaptarla a nuestras necesidades experimentales.

Para conocer el efecto inmediato de los pesticidas en las poblaciones microbianas, se decidió tomar muestras de suelo procedente de la zona riparia del humedal de Salburua, donde los microorganismos edáficos no habían sido expuestos a la presencia de dichos compuestos en los últimos 15 años.

El procedimiento de muestreo fue similar al llevado a cabo en el anterior ensayo (Figura 4.5.), utilizando el mismo mallado de la zona y la misma metodología de extracción y procesado de muestra de suelo mediante barrena manual. Tras la separación manual de piedras y raíces de gran tamaño se trasladaron al laboratorio en bolsas herméticamente cerradas y refrigeradas (tiempo de transporte inferior a 90 minutos). Una vez en el laboratorio se homogeneizaron y se tomó una muestra representativa para su posterior análisis físico-químico.

Tras secarse durante 48 h a temperatura ambiente, se procedió a su cribado, tamizado (< 2 mm), y división en submuestras de 4 kg de suelo seco, cada una de las cuales se depositó en bandejas de plástico de 10 L de capacidad (Figura 4.6.). Se dispusieron tres réplicas para cada una de las concentraciones estudiadas [i.e. 5, 50 y 500 mg compuesto activo kg⁻¹ suelo seco (s.s.)]. Tras la aplicación del pesticida disuelto en metanol, y la posterior evaporación del disolvente, se adicionó la cantidad de agua necesaria para mantener el suelo al 60 % de su capacidad de campo, se taparon con láminas de plástico perforadas para evitar una pérdida excesiva de humedad y se incubaron en oscuridad durante 90 días a 22±1°C. La humedad del suelo se mantuvo constante mediante reposición gravimétrica diaria de agua en caso de que fuera necesaria. Se tomaron muestras tras 0, 7, 30, 60 y 90 días de incubación para analizar el contenido en pesticida y determinar los parámetros microbiológicos



Figura 4.6. Incubación de las muestras de suelo en bandejas. Fuente: propia.

Debido a que aún no se habían determinado los pesticidas que presentaban un mayor interés desde el punto de vista medioambiental, se utilizó para este primer ensayo el fungicida tebuconazol por razones coyunturales del momento de diseño del ensayo.

Los parámetros microbiológicos con potencial bioindicador de la calidad del suelo que se estudiaron fueron: respiración basal, respiración inducida por sustrato, carbono de la biomasa, coeficiente respiratorio, coeficiente metabólico, las principales actividades enzimáticas (deshidrogenasa, ureasa, arilsulfatasa, fosfatasa alcalina y β -glucosidasa), contenido en NO_3^- y NH_4^+ del suelo y diversidad funcional en base a Biolog EcoplatesTM.

4.1.5. Ensayo 5: efecto de pesticidas y fertilizantes sobre la calidad del suelo (Capítulo 9)

Una vez validada la metodología experimental se llevaron a cabo los ensayos definitivos para evaluar el impacto de fertilizantes y pesticidas sobre la calidad del suelo. Los 3 pesticidas que resultaron más interesantes tras las simulaciones con LEACHP y los datos observados en la parcela de referencia de Gauna fueron el fungicida difenoconazol, el insecticida deltametrina y el herbicida etofumesato. Se optó por aplicar a las muestras de suelo los mismos productos comerciales que se estaban utilizando en la parcela de Gauna para los tres pesticidas (Score, Audace y Kemitran, respectivamente), ya que de esta manera se simulaba de manera más exacta las condiciones reales de campo.

En lo que respecta a los fertilizantes estudiados, aunque en la parcela de Gauna únicamente se aplican fertilizantes nitrogenados sintéticos, se decidió incluir en el ensayo un abono orgánico (avicompost) con el fin de estudiar una posible alternativa, a priori más ecológica, con la que poder reducir los impactos medioambientales debidos a las prácticas agrícolas de la Zona Vulnerable.

Uno de los aspectos más interesantes del presente ensayo fue el estudio del efecto conjunto de fertilizantes y pesticidas sobre las poblaciones microbianas del suelo. Si bien la mayoría de estudios se centran únicamente en un único tipo de compuestos, en condiciones reales, ambas familias de compuestos coexisten en los suelos agrícolas, pudiéndose dar interacciones sinérgicas y/o antagónicas entre ellos, imposibles de predecir con su estudio por separado.

Dentro de los parámetros microbiológicos estudiados se decidió analizar el nitrógeno potencialmente mineralizable y el potencial de desnitrificación, para profundizar así en aquellos parámetros relacionados con el ciclo del nitrógeno, clave desde el punto de vista agrícola, y más en una zona afectada por la contaminación de nitratos. Adicionalmente se incluyó un índice denominado Treated-Soil Quality Index (T-SQI) que agrupara las diferentes actividades enzimáticas del suelo relacionadas con los principales ciclos de nutrientes (*i.e.* nitrógeno: ureasa, azufre: arilsulfatasa, carbono, β -glucosidasa, fósforo: fosfatasa alcalina), para recopilar la información que

proporcionan en un único índice indicador de la capacidad del suelo para el reciclaje de nutrientes, y por lo tanto, de su fertilidad.

4.1.6. Ensayo 6: efecto de la concentración de los pesticidas sobre la calidad del suelo (Capítulo 10)

Para finalizar la serie de estudios referentes al impacto de agroquímicos en la calidad del suelo, se llevó a cabo un ensayo con los 3 pesticidas seleccionados anteriormente (difenoconazol, deltametrina y etofumesato) con el fin de estudiar su impacto en las poblaciones microbianas a medida que su concentración aumenta en el medio.

Se llevó a cabo la misma metodología experimental llevada a cabo en el ensayo 5, pero incluyendo un parámetro microbiológico adicional relacionado con el ciclo del nitrógeno: la diversidad de las bacterias oxidadoras de amonio en base al análisis del gen *amoA* mediante PCR-DGGE. Esta técnica fue desarrollada durante la estancia realizada en el ECOLAB (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle) de Toulouse perteneciente al CNRS francés.

4.2. Compuestos agroquímicos utilizados

4.2.1. Fertilizantes

4.2.1.1. Avicompost

El fertilizante orgánico utilizado es una mezcla de deyecciones de ave y paja compostada que es comercializada por la empresa Avicompost de Arakil, próxima al municipio de Gauna, cuya composición se detalla en la Tabla 4.1. Tiene estructura en forma de pellets de entorno a 3 cm de largo (Figura 4.7.) aunque para su aplicación en los ensayos de laboratorio se trituraron para que su distribución fuera más homogénea.

Tabla 4.1. Composición físico-química del compost

Parámetro	Unidades	Magnitud
Humedad	%	10
pH en agua	Adimensional	6,8
Conductividad	dS m ⁻¹	16,8
Materia orgánica	%	56
Nitrógeno total	%	4,5
C/N ratio		9,0
Fósforo	%	5,0
Potasio	%	4,0
Azufre	%	2,6
Magnesio	%	3,01
Calcio	%	3,0
Boro	mg kg ⁻¹ s.s.	44
Cobre	mg kg ⁻¹ s.s.	37
Zinc	mg kg ⁻¹ s.s.	377

**Figura 4.7.** Pesticidas y fertilizantes usados en los presentes ensayos. Fuente: Propia

4.2.1.2. NPK

El fertilizante inorgánico NPK utilizado en los presentes trabajo tiene una composición 8-15-15, en forma de nitrato amónico (8 % N-NH₄NO₃), anhídrido fosfórico (15 % P₂O₅) y óxido de potasio (15 % K₂O). Análisis físico-químicos realizados en nuestro laboratorio evidenciaron la presencia de una gran fuente de azufre asociado a sulfatos (8,07 % S-SO₄⁻²) y cloruros (12,4 % Cl⁻). Fue suministrado por el

propio agricultor aunque es comercializado por Martínez La Pera Cereales y Abonos S.A., distribuidor oficial de Fertiberia. Se comercializan en forma de gránulos de 2 cm de diámetro aunque para su aplicación en los ensayos de laboratorio se trituraron para que su distribución fuera más homogénea (Figura 4.7.).

4.2.2. Pesticidas

Todos los pesticidas fueron suministrados por el propio agricultor en forma de productos comerciales como los que él mismo aplica en la parcela de referencia de Gauna (Figura 4.7.).

4.2.2.1. Difenoconazol

El fungicida difenoconazol (en inglés difenoconazole) se aplicó en forma de producto comercial Score[®] comercializado por Syngenta Agro S.A. Tiene una riqueza en difenoconazol del 25 % p/v (250 g L⁻¹).

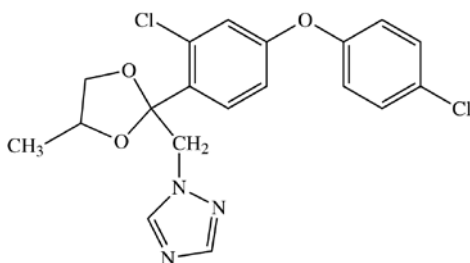


Figura 4.8. Estructura molecular del difenoconazol.

Fuente: Farm Chemicals International

El difenoconazol es un fungicida de amplio espectro pertenece a la familia de los triazoles. Tiene efecto preventivo y curativo sobre un amplio rango de enfermedades fúngicas. Inhibe la biosíntesis del ergosterol mediante la inhibición de la enzima esterol-1,4- α - dimetilasa. El difenoconazol interfiere en la biosíntesis del ergosterol de las membranas celulares, deteniendo el desarrollo de los patógenos mediante la inhibición de la demetilación del esterol (enzima del hongo sterol-1-4- α - demethylase). Actúa primordialmente en el desarrollo de las hifas secundarias del patógeno dentro de los

tejidos de la planta pero también lo hace, en menor escala, sobre el desarrollo y la virulencia de las conidias de los hongos.

Es una molécula penetrante que una vez aplicada sobre la planta se trasloca sistemáticamente vía xilema. Es redistribuido dentro de los órganos tratados, principalmente en las hojas, pudiéndose mover translaminarmente de una cara de la hoja a la otra. Se aplica en una gran variedad de cultivos tales como cereales, césped, tubérculos, algodón, soja, café, caña de azúcar, vid, frutales, plantas ornamentales, contra un amplio espectro de hongos patógenos, especialmente de la clase de los ascomicetos y deuteromicetos.

4.2.2.2. Deltametrina

El insecticida deltametrina (en inglés deltamethrin) se aplicó en forma de producto comercial Audace[®] comercializado por Agrodan S.A.. Tiene una riqueza en deltametrina del 2,5 % p/v (25 g L⁻¹).

La deltametrina es un insecticida semi-sintético de la familia de los piretroides de que actúa a modo de neurotoxina. Es un potente inhibidor de la calcineurina (proteína fosfatasa 2B). Esta acción inhibitoria induce una hiperexcitabilidad celular alterando los canales de calcio permitiendo la entrada incontrolada de Ca²⁺ en las células.

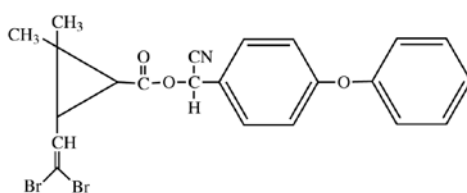


Figura 4.9. Estructura molecular de la deltametrina.
Fuente: Farm Chemicals International

En agricultura está autorizado su uso para el control de diversas plagas, entre ellas: langosta y otros ortópteros, pulgones, coleópteros, lepidópteros y otras familias de insectos que atacan a los cultivos. Debido a su amplio espectro y por su acción insecticida por contacto y elevado poder insecticida, se usa para controlar las formas adultas, y los estadios ninfales de los insectos que no han penetrado en el interior de los

tejidos vegetales. Por su poder insecticida se presta a ser usado también en cebos envenenados y trampas para capturas masivas de insectos.

La deltametrina se usa en fruticultura, viticultura, olivicultura, horticultura, floricultura, en las plantas ornamentales, en cultivos herbáceos industriales (cereales, oleaginosas, tabaco, algodón, etc.), y otros cultivos agrícolas. También es usado en la desinfección de granos de cereales almacenados.

Mientras que para los mamíferos, este insecticida es clasificado como seguro, es muy tóxico para la vida acuática, particularmente los peces, y por tanto debe ser utilizado con extrema precaución alrededor de zonas de agua.

4.2.2.3. Etofumesato

El herbicida etofumesato (en inglés ethofumesate) se aplicó en forma de producto comercial Kemitran[®] comercializado por Agrodan S.A.. Tiene una riqueza en etofumesato del 50 % p/v (500 g L⁻¹).

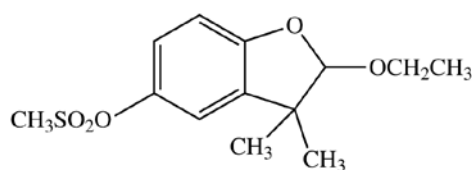


Figura 4.10. Estructura molecular del etofumesato.

Fuente: Farm Chemicals International

El etofumesato es un herbicida selectivo, de la familia de los benzofuranos, utilizado tanto en presiembra como en pre-emergencia o post-emergencia. Una vez aplicado en campo puede ser absorbido a través de las raíces de la planta y posteriormente transportado hasta las hojas, o bien a través de las propias hojas en el momento en que la semilla germina, emerge de la tierra y atraviesa la capa de suelo donde se encuentra el producto. En consecuencia esta acción se ve favorecida en suelos húmedos. El herbicida inhibe el crecimiento del meristema, retrasa la división celular y limita la formación de cutícula al afectar a la biosíntesis de lípidos. Sus efectos represores o modificadores incluyen todas las desviaciones del desarrollo natural, por ejemplo: destrucción, retardo, quemadura de la hoja, albinismo, enanismo y similares.

Las plantas que no se destruyen, frecuentemente están atrofiadas y no son competitivas, con la floración destruida.

Se utiliza contra el crecimiento de herbáceas, gramíneas y malas hierbas de hoja ancha en distintos tipos de remolacha, tabaco, zanahorias y césped. Por esta última aplicación es frecuentemente usado para el mantenimiento de campos de golf.

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. *Parámetros físico-químicos*

Dentro de estos parámetros se incluyen todas aquellas determinaciones analíticas realizadas para determinar la composición físico-química de las aguas procedentes de las columnas de lixiviación. Todos ellos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos expuestos en APHA (2005).

Para la determinación del **contenido en NO_3^-** de las muestras de agua se tomaron 2,5 mL de cada muestra de lixiviado y se adicionó agua desionizada hasta completar un volumen total de 50 mL. Posteriormente se adicionó 1 mL de HCl 1 N y tras 15 minutos de reacción, se midió la absorbancia ($\lambda = 220$ nm) mediante espectrofotómetro, eliminando la absorbancia debida a compuestos orgánicos ($\lambda = 275$ nm).

Para la determinación del **contenido en NH_4^+** de las muestras de agua se tomaron 20 mL de cada muestra de lixiviado a los que se adicionaron 1 mL de una disolución de fenol (0,3% en peso) y nitroprusiato sódico (3×10^{-3} % en peso), 1 mL de otra disolución de hipoclorito sódico (0,2 % en volumen) y NaOH 0,5 M, y se completó con agua desionizada hasta completar un volumen total de 25 mL. Tras 1 h de reacción se midió su absorbancia ($\lambda = 635$ nm) mediante espectrofotómetro.

Para la determinación del **DOC** de las muestras de agua, a 1,5 mL de cada muestra de lixiviado se adicionaron 3,5 mL de mezcla crómica-sulfúrica compuesta de dicromato potásico 35 mM, 4,6 g de sulfato de plata (0,46 % en peso), sulfato de mercurio (1,7 % en peso), 250 mL de ácido sulfúrico y agua desionizada hasta

completar un volumen total de 1 L. Tras someter la mezcla a digestión a 140°C durante 2 horas, se midió la absorbancia ($\lambda = 600$ nm) mediante espectrofotómetro.

4.3.2. Parámetros microbiológicos

4.3.2.1. Bioindicadores de carácter general

La **respiración basal** fue determinada de acuerdo a la norma ISO 16072 (2002). Para ello, se tomaron 25 g de suelo al 60 % de su capacidad de campo y fueron introducidos en un recipiente de cristal con cierre hermético, el cual contenía un pequeño vaso con 10 mL de NaOH 0,2 M. Se sometió a incubación durante 72 h a 30°C en ausencia de luz. El CO₂ procedente de la respiración microbiana del suelo quedaba retenido en la solución de NaOH y se cuantificaba por valoración con una solución de HCl 0,1 M.

A continuación se procedió a determinar la **respiración inducida por sustrato** de acuerdo a la norma ISO 17155 (2002). La medida de la tasa de respiración en presencia de una concentración saturante de sustrato representa la velocidad de reacción máxima, de forma que es proporcional a la biomasa microbiana potencialmente activa (Epelde, 2010). Para ello, se adicionaron 10.000 mg C kg⁻¹ suelo seco (s.s.) a las muestras de suelo previamente incubadas para la determinación de la respiración basal, tras lo cual, se introdujo un nuevo vaso con 10 mL de NaOH 0,2 M en el recipiente de cristal con cierre hermético y se incubaron a 30°C durante 6 h en ausencia de luz. Pasado este tiempo se valoró el CO₂ procedente de la respiración microbiana retenido en la solución de NaOH mediante valoración con HCl 0,1 M.

Finalmente se calculó el **coeficiente respiratorio**, bioindicador de estrés microbiano (Anderson y Domsch, 1985), mediante el cociente entre la respiración basal y la respiración inducida por sustrato.

El **carbono de la biomasa microbiana** fue determinado mediante el método de incubación con fumigación con cloroformo (Vance et al., 1987). Se expusieron muestras de 5 g de suelo a una atmósfera rica en cloroformo libre de etanol durante 24 h en oscuridad. A continuación se extrajo el carbono orgánico del suelo mediante 20 mL de sulfato de potasio 0,5 M y agitación durante 1 h a 165 r.p.m, tras lo cual se separó el

sobrenadante con filtros Whatman No. 42. El contenido en carbono orgánico disuelto en el sobrenadante se determinó por digestión a 150°C durante 1 h con una solución ácida de crómico-sulfúrico y medición de su absorbancia ($\lambda = 445$ nm) con espectrofotómetro. El carbono de la biomasa se calculó por diferencia entre el carbono orgánico disuelto en las muestras fumigadas con cloroformo y las que no lo fueron, y un factor de conversión de 2,64 (Voroney et al., 1991).

Para la determinación de la **actividad deshidrogenasa**, enzima asociada a la actividad oxidativa de los microorganismos vivos del suelo, fue determinada de acuerdo a Epelde et al. (2008a). Se adicionó a 1g de suelo, 0,4 mL de una solución tampón de tris hidroximetil aminometano (THAM) 100 mM de pH 7,0 y 0,5 mL de una solución de iodonitrotetrazolio cloruro-INT al 0,5 % en peso. La mezcla se incubó a 25°C y pasadas 4 h la reacción se paró con 8 mL de metanol. Tras centrifugar a 1250 r.p.m. durante 5 minutos la absorbancia ($\lambda = 490$ nm) del sobrenadante se midió mediante espectrofotómetro.

4.3.2.2. Bioindicadores de los principales ciclos de nutrientes

La mayoría de los métodos para la determinación de actividades enzimáticas se basan en la cuantificación colorimétrica del producto liberado por la actividad de la enzima objeto de estudio tras la adición de un sustrato específico..

En el caso de la **actividad enzimática ureasa**, se determinó de acuerdo a Rodríguez-Loínez et al., (2008). Se adicionaron a 1 g de suelo 1,75 mL de una solución tampón de borato 100 mM y de pH 10,0 y 0,25 mL de una disolución 820 mM de urea. Tras 1 h de incubación de la mezcla a 37°C, la reacción se paró con 6 ml de una disolución acidificada de cloruro potásico 2 M. Tras centrifugar a 3500 r.p.m. durante 3 minutos, 0,25 mL del sobrenadante se mezcló con 3,75 mL de agua destilada, 2 mL de una mezcla reactiva (Reactivo A) compuesta de 1 volumen de una disolución de salicilato sódico (17% en peso) y nitroprusiato sódico (0,12% en peso), 1 volumen de NaOH 0,3 M y 1 volumen de agua desionizada. Finalmente se adicionaron 0,8 mL de una disolución de dicloroisocianurato sódico (0,1 % en peso) a la mezcla y tras 30 minutos de reacción se midió la absorbancia ($\lambda = 670$ nm) mediante espectrofotómetro.

En el caso de las **actividades enzimáticas β -glucosidasa, arilsulfatasa y fosfatasa alcalina** se determinaron de acuerdo a Epelde et al. (2008a) y Rodríguez-Loinaz et al. (2008). Se adicionaron a 1 g de suelo 1,6 mL de disolución tampón modificado universal (MUB) 20 mM y de pH 6,0 para la β -glucosidasa, 1,6 mL de disolución tampón acetato 500 mM de pH 5,8 para la arilsulfatasa, y 1,6 mL de disolución tampón MUB de pH 11 para la fosfatasa alcalina. A continuación se adicionaron 0,4 mL de disolución sustrato [i.e., 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (1,5% en peso) para la β -glucosidasa; potasio 4-nitrofenil sulfato (1,3% en peso) para la arilsulfatasa; 4-nitrofenil fosfato disódico (1,85% en peso) para la fosfatasa alcalina]. La mezcla se incubó a 37 °C durante 45 minutos, tras los cuales, la reacción se paró con 0,4 mL de una disolución de cloruro cálcico 500 mM y 1,6 ml de una disolución de NaOH 500 mM. Posteriormente, la mezcla se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 3 minutos, y la absorbancia ($\lambda = 410$ nm) del sobrenadante se cuantificó mediante espectrofotómetro.

A partir de los valores de estas cuatro actividades enzimáticas se calculó el índice de calidad de suelos tratados (en inglés **Treated-Soil Quality Index, T-SQI**) propuesto por Mijangos et al., (2010), el cual, a diferencia de otros índices, tiene en cuenta tanto la magnitud como el signo de la variación de cada actividad enzimática con respecto a la de un suelo de referencia control, así como la frecuencia con que dichas variaciones se dan. La expresión es la siguiente:

$$T - SQI = 10^{\log m + \frac{\sum_{i=1}^n (\log n_i - \log m) - \sum_{i=1}^n |\log n_i - \log \bar{n}|}{n}} \quad (4.1.)$$

donde m es el valor de referencia (el valor medio de cada actividad enzimática en el suelo control de referencia en 100%) y n es el valor medido para cada actividad enzimática en los suelos tratados expresados en % con respecto al suelo control.

4.3.2.3. Bioindicadores específicos del ciclo del nitrógeno.

Para la determinación del **nitrógeno potencialmente mineralizable** se siguió el método descrito en Powers et al. (1980). Tras introducir 2,5 g de suelo y 6,25 mL de agua desionizada en tubos de polipropileno, se incubó la mezcla durante 7 días en baño maría a 40°C. Trascurrido este tiempo, se pasó la mezcla a recipientes de vidrio

donde se le adicionó 6,25 mL de una disolución de KCl 4 M, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y finalmente se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. A continuación, se tomó 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 0,5 mL adicionales de la disolución de KCl 4 M, 2,5 ml de agua desionizada y 2 ml del Reactivo A y 1 mL de la disolución de dicloroisocianurato sódico previamente descrito para la actividad enzimática ureasa. Finalmente, tras 30 minutos de reacción se midió la absorbancia ($\lambda = 670$ nm) mediante espectrofotómetro.

La **nitrificación** microbiana se monitorizó estudiando la evolución del contenido en NH_4^+ y NO_3^- del suelo siguiendo los protocolos descritos en Sparks et al. (1996). Para ello tras someter a agitación 10 g de suelo con 20 mL de una disolución KCl 1 M durante 1 h a 170 rpm, se filtró la mezcla con filtros Whatman No.1. Para determinar el contenido en NH_4^+ del sobrenadante, se tomaron 2 mL de éste y se mezcló con 1 mL del reactivo A y 0,5 mL de dicloroisocianurato sódico (ambas disoluciones descritas anteriormente para la actividad enzimática ureasa). Finalmente, tras 30 minutos de reacción se midió la absorbancia ($\lambda = 670$ nm) mediante espectrofotómetro. Para determinar el contenido en NO_3^- del sobrenadante, se clarificaron 2 mL de éste con 5 mL de una disolución de crema de alúmina (0.46 % en peso) y se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 3 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia ($\lambda = 220$ nm) mediante espectrofotómetro, eliminando la absorbancia debida a compuestos orgánicos ($\lambda = 275$ nm).

La medida del **potencial de desnitrificación** se llevó a cabo de acuerdo a Šimek et al. (2002) con modificaciones propias. Se introdujeron 10 g de suelo en un vial de 120 mL cerrado herméticamente con un séptum de caucho perforable. Se adicionaron 75 mg $\text{N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ s.s. y 75 mg C-glucosa kg^{-1} s.s. en 10 mL de agua desionizada y se sustituyó la atmósfera interior del vial por helio con acetileno (10% en volumen). Tras 24 de incubación a 25 °C en un agitador rotatorio a 200 r.p.m. se tomó 1 mL de la atmósfera interior del vial y se midió el contenido en $\text{N-N}_2\text{O}$ cromatográficamente mediante cromatógrafo de gases (KNK 3000 HRGC) equipado con detector de conductividad térmica, una columna empacada Porapak Q 80/100 3 m x 1/8" (Sugelabor) y helio como gas portador con un caudal de 16 mL min^{-1} . Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura de columna: 25 °C; temperatura de inyección: 25 °C; temperatura del detector: 150 °C.

4.3.2.4. Bioindicadores de biodiversidad funcional

Para el análisis de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas del suelo (en inglés Community Level Physiological Profiles, CLPPs) , se utilizaron las Biolog Ecoplates™ de acuerdo a Epelde et al. (2008b). Se sometió a agitación 1 g de suelo en 10 mL de agua Mili-Q ultrapura y autoclavada mediante agitador orbital a 125 r.p.m. Tras la agitación, se dejó reposar la mezcla y se diluyó 1:100 con agua Mili-Q ultrapura y autoclavada para ser inocuada en los 31 pocillos que incorporan las Biolog Ecoplates™ las cuales son incubadas a 30°C durante 7 días. Dichos pocillos contienen distintos sustratos de carbono (aminas/amidas, aminoácidos, carbohidratos, ácidos carboxílicos, polímeros) más un pocillo en blanco para cada réplica. Diariamente se midió en cada pocillo mediante un lector de microplatos (Anthos Zenyth 3100) la absorbancia ($\lambda = 595$ nm) procedente de la coloración morada que resulta de la reducción del tetrazoilo presente en las Biolog Ecoplates™ por el NADH microbiano. El **desarrollo de color medio por pocillo** (en inglés Average Well Colour Development, AWCD) se determinó a partir de la media de todas las absorbancias positivas medidas periódicamente. Los datos procedentes de las medidas realizadas a las 48 h de incubación se utilizaron para calcular diferentes índices, ya que fue en este periodo de tiempo cuando se registró a mayor tasa de crecimiento microbiano. El número de sustratos utilizados (absorbancia en cada pocillo $> 0,25$, este valor marcó el comienzo de la fase exponencial) se consideró proporcional a la **riqueza en especies microbianas, S**. Adicionalmente se calculó el **índice de diversidad de Shannon ($H' = -\sum p_i \cdot \log_2 p_i$)** considerando los valores de absorbancia equivalentes a la abundancia de especies (Magurran, 2004).

Para la determinación de la diversidad de bacterias oxidadoras de amonio a través de PCR-DGGE, se comenzó extrayendo el ADN de 0,25 g de muestras de suelo mediante el kit PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, California, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN se determinó mediante gel de agarosa (1% en peso) con 1 μg de bromuro de etidio mL^{-1} , por comparación con patrón standard de ADN. La intensidad de las bandas del gel se midió por iluminación con UV y calculando las áreas con el software Bio-profil V99 (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

A continuación los genes *amoA* fueron amplificados por PCR mediante los primers *amoA*-F1-GC y *amoA*-R1 propuestos por Avrahami et al. (2003). La amplificación fue llevada a cabo a partir de 50 ng de ADN disueltos en 50 μ L de una mezcla formada por 1 x tampón incoloro GoTaq Flexi (Promega Corporation, Madison, WI), 0,16 mg mL⁻¹ BSA, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 μ M de cada primer, 400 μ M de cada dNTP, 1 U de GoTaq Hot Start Polymerase (Promega M 5001) y la cantidad de agua ultrapura necesaria para completar los 50 μ L de la mezcla de reacción. La PCR fue llevada a cabo en un termociclador MJ Research PTC-200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) usando el siguiente programa: 94 °C durante 1 min; 35 ciclos de 94 °C durante 45 s, 57 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s; y una extensión final a 72 °C durante 7 min. El ADN amplificado fue cuantificado mediante gel de agarosa (1% en peso) con 1 μ g de bromuro de etidio mL⁻¹, por comparación con patrón standard de ADN. La intensidad de las bandas del gel se midió por iluminación con UV y calculando las áreas con el software Bio-profil V99 (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

Tras la amplificación se tomaron 100 ng de ADN de cada una de las réplicas para su análisis mediante DGGE, el cual fue llevado a cabo de acuerdo a Avrahami et al. (2003) mediante un sistema universal de detección de mutaciones DCode (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA): 400 ng de ADN amplificado se cargaron en un gel de acrilamida [0,5 x Tris-acetate-EDTA (TAE), 37:1 acrilamida-bisacrilamida] (6 % en peso), con un gradiente de desnaturalización que iba del 45 al 65% (el 100% de desnaturalización correspondía a una disolución 7 M de urea y formamida desionizada al 40% en peso). La DGGE discurrió a 100 V (voltaje constante) y 60 °C durante 17 h en 0,5 x TAE, y el gel posteriormente fue teñido con SYBR verde (Sigma-Aldrich) diluido x 2000 durante 30 minutos y lavado finalmente con agua desionizada. Las imágenes del gel fueron tomadas mediante cámara fotográfica apta para iluminación UV usando el programa Vision-Capt (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Las bandas de los geles fueron analizadas mediante el programa Quantity One Software (Bio-Rad Richmond, USA).

A partir de los datos de los geles de DGGE, se determine la diversidad de las bacteria oxidadoras de amonio mediante el índice de diversidad de Shannon ($H' = - \sum p_i \cdot \log_2 \cdot p_i$), donde en este caso p_i es el ratio entre la intensidad de una banda específica y

la intensidad total de todas las bandas de un mismo carril analizado habiendo eliminado previamente la intensidad de fondo (Qu and Wang, 2008).

4.3.3. Cuantificación analítica de los pesticidas

Las determinaciones analíticas de referentes a los pesticidas fueron realizadas por los servicios SGiker de la UPV de la Facultad de Ciencia y Tecnología de Leioa y de la Facultad de Farmacia de Vitoria, pero se detalla el procedimiento seguido.

La concentración de los pesticidas en el suelo fue cuantificada a través de extracciones sucesivas con 2 disolventes de distinta polaridad. Inicialmente, 5 g de suelo fueron sometidos a extracción mediante agitación con 5 mL de acetonitrilo durante 5 minutos a 25 °C. Tras ello, se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 800 r.p.m., y se recogió el sobrenadante S1. Los mismos 5 g de suelo fueron sometidos nuevamente a extracción, esta vez con 5 mL de isopropanol bajo las mismas condiciones hasta conseguir el sobrenadante S2. Se mezclaron S1 y S2 y se sometieron a una extracción en fase sólida con 1 g de Florisil® para eliminar interferencias. El eluato se evaporó hasta sequedad total bajo corriente de N₂. El residuo se reconstituyó en 2 mL de isopropanol, se filtró (0,22 µm), y fue finalmente analizado mediante GC-MS (modelo 6890) directamente acoplado a un espectrómetro selectivo de masas inertes (modelo 5973) de Agilent Technologies (Palo Alto, CA). La columna usada fue una HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm), el gas portador fue helio con un caudal de 1,6 mL min⁻¹. La temperatura del horno siguió el siguiente programa: 70 °C de temperatura inicial durante 2 min, con una rampa de 25 °C min⁻¹ a 250 °C, y posteriormente subida a razón de 2 °C min⁻¹ hasta los 280 °C (esta temperatura se mantuvo durante 5 minutos). La inyección (1 µL) fue llevada a cabo en modo sin-split, estando el inyector y la fuente iónica a 250 °C y 280 °C, respectivamente. Las muestras fueron analizadas en modo Scan. Los analitos fueron identificados de acuerdo a su espectro de masas y cuantificados mediante el área obtenida para cada ion seleccionado: difenoconazol (m/z 323), deltametrina (m/z 181) y etofumesto (m/z 207). Antes de la extracción se incorporó un patrón interno a las muestras. Las curvas de calibrado fueron llevadas a cabo en la matriz de estudio (suelo) en el rango de 1-50 mg pesticida kg⁻¹ s.s. con una desviación standard < 15%.

4.4. Modelo LEACHM

4.4.1. Descripción general

Éste es un modelo mecanicista determinista desarrollado por Hutson y Wagenet (1989) que describe monodimensionalmente los flujos de agua a través de suelos insaturados de hasta 2 metros de profundidad y estructurados verticalmente en horizontes. Así mismo, el modelo es capaz de simular los fenómenos que experimentan los solutos contenidos en dichos flujos de agua tales como transporte, dilución, evaporación, absorción vegetal, transformación físico-química y degradación.

LEACHM tiene diferentes módulos, cada uno de las cuales simula el comportamiento de diferentes tipos de compuestos relacionados con el mundo agrícola, siendo el LEACHN y el LEACHP los módulos encargados de simular el transporte y transformación de los compuestos nitrogenados y de los pesticidas respectivamente.

De entre los modelos de tipo mecanicista determinista, éste es uno de los más utilizados para simular el transporte de solutos y ha sido validado en diferentes condiciones de campo y con solutos tan diferentes como nitrato, bromuro, aluminio, pesticidas, etc. (Dust et al., 2000; Asare et al., 2001; Singh and Sondhi 2001; Paramasivam et al., 2002; Mahmood 2005). El modelo presenta entre otras ventajas el estar bien documentado, ser de fácil uso y requerir poco tiempo de cálculo.

El módulo de simulación de flujos de agua es común al resto de módulos y se basa en la aplicación técnicas de resolución numéricas a las ecuaciones de flujo de Richard. Las condiciones del límite superior se pueden variar en la escala temporal para simular eventos de precipitación o riego (flujo de agua positivo) y la evaporación (flujo de agua negativo). En lo que respecta a las condiciones de límite inferior, el modelo puede simular situaciones de no flujo, gradiente unitario, o nivel piezométrico constante.

Los procesos envueltos en el transporte y transformación de nitrógeno considerados por el módulo LEACHN incluyen: la convección o transporte másico del nitrógeno disuelto; la difusión molecular debido al gradiente de concentración; y las transformaciones mediadas por los microorganismos del suelo. En la modelización del componente biológico del ciclo del nitrógeno el modelo realiza una serie de asunciones:

- i. Considera la nitrificación como un proceso que tiene lugar en un solo paso ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$) y no en dos ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$).
- ii. El cambio en el contenido en nitrógeno orgánico del suelo es muy pequeño en comparación con el resto de tasas de transformación de nitrógeno inorgánico.
- iii. La desnitrificación es un proceso altamente dependiente del grado de saturación del suelo y se desprecia el transporte difusivo de oxígeno en suelo.

El módulo LEACHP simula la dinámica de los pesticidas basándose en las ecuaciones de Richard anteriormente citadas en combinación con las ecuaciones de dispersión convectivas. El modelo permite simular la adsorción de los pesticidas al suelo de acuerdo a ecuaciones tanto lineales como no lineales. La degradación de los pesticidas es descrita mediante cinéticas microbianas de primer orden en las que la constante de degradación puede ser modificada de acuerdo a variaciones en la temperatura y el contenido en humedad del suelo.

4.4.2. Datos de entrada al modelo

Los principales datos de partida de carácter general que requiere el modelo LEACHM incluyen información referente al suelo, a las condiciones climáticas, al cultivo, y a los compuestos considerados (compuestos nitrogenados y pesticidas) (Ng et al., 2000). Otras constantes adicionales necesarias para definir las condiciones de límite inferior son por ejemplo la unidad de tiempo deseada, los coeficientes de difusión y dispersión, y constantes de reacciones químicas, aunque muchas de ellas son incorporadas por el modelo y rara vez requieren modificación.

Adicionalmente cada uno de los módulos utilizados requiere de unos parámetros de entrada específicos. Los principales datos que requiere el módulo LEACHN hacen referencia a la composición del fertilizante adicionado, las diferentes reservas de nitrógeno orgánico presente en el suelo y las tasas de actividad microbiana correspondientes a las diferentes transformaciones relacionadas con el ciclo del nitrógeno que el modelo considera. De la misma manera el módulo LEACHP requiere de datos referentes al pesticida, tales como su coeficiente de adsorción, tiempo de vida medio, solubilidad y densidad volumétrica.

4.4.3. Limitaciones del modelo

El modelo LEACHM tiene una serie de limitaciones tales como no considerar el efecto del transporte preferencial de solutos por fracturas del suelo o la escorrentía superficial, no poder predecir parámetros relacionados con el cultivo, o no poder trabajar con horizontes de suelo de espesor desigual (Ng et al., 2000).

4.5. Problemas experimentales

4.5.1. Lixiviación de fertilizantes y pesticidas en columnas de suelo

Se intentó simular a escala de laboratorio mediante columnas de lixiviación el lavado de fertilizantes y pesticidas desde los suelos agrícolas y su transporte a las aguas subterráneas de la Zona Vulnerable bajo diferentes escenarios hidrológicos: eventos de precipitación *versus* eventos de riego.

Aunque la metodología idónea para ello era la basada en ensayos de lixiviación con columnas inalteradas de suelo de la parcela de Gauna, no fue técnicamente posible. La razón estriba en que el propio proceso de extracción de las columnas inalteradas de suelo (introducción de tubos de PVC de 1 m de profundidad y 4,5 cm de diámetro interior mediante testigo y martillo percutor) que en el suelo de Salburua había resultado eficaz, compactaba el suelo de Gauna y modificaba, por consiguiente, sus propiedades hidrodinámicas.

Por ello, se cambió la metodología experimental, utilizando columnas de suelo alterado. Para ello se extrajeron capas de suelo de 10 cm de profundidad en la parcela de Gauna (0-10, 10-20, 20-30, 30-40 cm) mediante barrena manual, se sometieron a secado durante 48 h a temperatura ambiente, cribado y tamizado a < 2mm, se reconstituyeron en columnas alteradas de suelo de 40 cm de profundidad manteniendo la estratificación original del suelo en capas de 10 cm intentando mantener las condiciones reales del suelo (densidad aparente: 1,2 kg dm⁻³).

Una vez listo el montaje y al intentar humedecer las columnas de suelo observamos que la velocidad de drenaje del agua aplicada disminuía a medida que

aumentaba la profundidad del suelo, hasta apenas observarse avance del frente de agua por debajo de los primeros 15 cm de columna de suelo.

Este fenómeno posiblemente estuviera asociado a la expansión de las arcillas causado por el proceso de secado y re-humectación llevado a cabo durante el acondicionamiento de las columnas. Dicha expansión de las arcillas podría haber provocado una reducción progresiva de la porosidad del suelo y un estrechamiento de los canales intersticiales, reduciendo considerablemente la capacidad del suelo para el drenaje de agua (Gens y Alonso, 1992).

En un último intento por estudiar la simulación de pesticidas y fertilizantes en el suelo de la parcela agrícola, se intentaron los ensayos de lixiviación mediante columnas cerradas herméticamente, introduciendo el flujo de agua a presión mediante bomba peristáltica para conseguir unos flujos de drenaje similares a los observados en campo tras un episodio de precipitación o de riego. No obstante, las curvas de evolución del trazador evidenciaron las diferencias entre las propiedades hidrodinámicas del suelo real y el alterado sometido a lixiviación forzada.

Ante las dificultades para continuar con esta línea de trabajo, y dado que contábamos con los datos experimentales de campo y las simulaciones realizadas con los modelos LEACHN y PEACHP, decidimos no proseguir con estos ensayos.

4.5.2. Medida del carbono de la biomasa microbiana

A pesar de haber validado el protocolo de medida del carbono de la biomasa en el ensayo preliminar con el fungicida tebuconazol, este parámetro no pudo ser cuantificado en los ensayos llevados a cabo con el resto de pesticidas. En el primer caso el pesticida fue aplicado a las muestras de suelo mediante una solución de metanol y el agua no fue aportada hasta que el disolvente se evaporó completamente. En el caso del difenoconazol, la deltametrina y el etofumesato, por el contrario, las formulaciones comerciales de los pesticidas fueron aplicadas al suelo conjuntamente con el agua, de forma que los disolventes orgánicos que contenían estuvieron presentes a lo largo de toda la incubación, interfiriendo en el procedimiento analítico de medida del carbono orgánico.

Por ello se utilizó finalmente la respiración inducida por sustrato como único parámetro microbiano indicador de la biomasa potencialmente activa.

4.6. Referencias

- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1985. Determination of eco-physiological maintenance requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biology and Fertility of Soils* 1, 81-89.
- APHA, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater 21st edition. In: Eaton, A.E., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., (Eds.). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. Washington, DC.
- Asare, D.K., Sammis, T.W., Smeal, D., Zhang, H., Sitze, D.O., 2001. Modeling an irrigation management strategy for minimizing the leaching of atrazine. *Agricultural Water Management* 48, 225-238.
- Avrahami, S., Liesack, W., Conrad, R., 2003. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology* 5, 691-705.
- Dust, M., Baran, N., Errera, G., Hutson, J.L., Mouvet, C., Schäfer, H., Vereecken, H., Walker, A., 2000. Simulation of water and solute transport in field soils with the LEACHP model. *Agricultural Water Management* 44, 225-245.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Hernández-Allica, J., Barrutia, O., Garbisu, C., 2008a. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology* 39, 299-310.
- Epelde, L., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Blanco, F., Garbisu, C., 2008b. Effects of chelates on plants and soil microbiol community: Comparison oferta and EDDS for lead phytoextraction. *Science of the Total Environment* 401, 21-28.
- Epelde, L., 2010. Evaluation of the efficiency of metal phytoremediation processes with microbiological indicators of soil health. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco (UPV-EHU).
- Gens, A., Alonso, E.E., 1992. A framework for the behaviour of unsaturated expansive clays. *Canadian Geotechnical Journal* 29, 1013-1032.
- Hutson, J.L., Wagenet, R.J., 1989. LEACHM: Leaching Estimation and Chemistry Model. Department of crop and atmospheric sciences, Cornell University, Ithaca, N.Y.
- ISO 16072, 2002. Soil quality e Laboratory Methods for Determination of Microbial Soil Respiration.
- ISO 17155, 2002. Soil quality e Determination of Abundance and Activity Soil Microflora using Respiration Curves.

- Mahmood, B., 2005. Analysis of a LEACHN-based management technique in 'predictive mode'. *Agricultural Water Management* 75, 25-37.
- Magurran, A.E., 2004. *Measuring biological diversity*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Martínez-Santos, M., 2008. Dinámica espacio-temporal de La calidad de lãs águas de La Zona Vulnerable de Vitoria-Gasteiz. Tesis doctoral. Departamento de Geodinámica. Universidad Del País Vasco (UPV-EHU).
- Martínez, M., 2012. Carcaterización hidrodinámica e hidroquímica Del humedal de Salburua. Tesis doctoral. Departamento de Geodinámica. Universidad Del País Vasco (UPV-EHU).
- Mijangos I, Albizu I, Epelde L, Amezaga I, Mendarte S, Garbisu C., 2010. Effects of liming on soil properties and plant performance of temperate mountainous grasslands. *Journal of Environmental Management* 91, 2066-2074.
- Monkiedje, A., Ilori, M.O., Spiteller, M., 2002. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1939-1948.
- Ng, H.Y.F., Drury, C.F., Serem, V.K., Tan, C.S., Gaynor, J.D., 2000. Modeling and testing of the effect of tillage, cropping and water management practices on nitrate leaching in clay loam soil. *Agricultural Water Management* 43, 111-131.
- Paramasivam. S., Alva, A.K., Fares, A., Sajwan, K.S., 2002. Fate of nitrate and bromide in an unsaturated zone of a sandy soil under citrus production. *Journal of Environmental Quality* 31, 671-681.
- Powers, R.F., 1980. Mineralizable soil nitrogen as an index of nitrogen availability to forest trees. *Soil Science Society of America Journal* 44, 1314-20.
- Qu, X.H., Wang, J.G., 2008. Effect of amendments with different phenolic acids on soil microbial biomass, activity, and community diversity. *Applied Soil Ecology* 39, 172-179.
- Rodríguez-Loinaz, G., Onaindia, M., Amezaga, I., Mijangos, I., Garbisu, C., 2008. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 49-60.
- Šimek M, Elhottová D, Hopkins, DW., 2002. What is the so-called optimum pH for denitrification in soil? *Soil Biology & Biochemistry* 34:1227-1234.
- Sinhg, K.G., Sondhi, S.K., 2001. Validation of a fertilizer nitrogen model duing crop production. *Journal of agricultural engineering research* 78, 317-324.
- Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnson, C.T., Sumner, M., 1996. *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Book Series, Madison, WI.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703-707.

Voroney, R.P., Winter, J.P., Gregorich, E.G., 1991. Microbe/plant soil interactions. In: Coleman, C., Fry, B. (Eds.), Carbon Isotope Techniques. Academic Press, New York, pp. 77-99.

5

- 5.1. Abstract
- 5.2. Introduction
- 5.3. Materials and methods
- 5.4. Results and discussion
- 5.5. Conclusions
- 5.6. References

Results and discussion I:

**Modelization of environmental
fate and transport of nitrates and
pesticides in an agricultural soil
by LEACHN and LEACHP models**

*“No nos atrevemos a muchas cosas porque
son difíciles, pero son difíciles porque no
nos atrevemos a hacerlas”*

Lucio Anneo Séneca (4 a. C. – 65)

5. Modelization of environmental fate and transport of nitrates and pesticides in an agricultural soil by LEACHN and LEACHP models

Accepted for poster presentation in: 2012 Sino-European Symposium on Environment and Health (SESEH 2012) Galway, Ireland, August 20 - 25, 2012.

5.1. Abstract

In the present study, LEACHN and LEACHP models have been used to simulate fertilizer and pesticide dynamics in an agricultural soil of the Vulnerable Zone of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, Spain) during a sugar beet growing season. Firstly, LEACHN model was calibrated by adjusting input parameters (soil and crop data) until fitting their predictions of piezometric level evolution and NO_3^- content in groundwater to measured data in a piezometer located in the agricultural plot (GAU-1). Since the water flow module is common to these two models, subsequently the same input parameters from LEACHN model were used in LEACHP to simulate pesticide behaviour in both soil and leachings. LEACHN simulations of NO_3^- dynamics in

groundwater and piezometric evolution proved to be in satisfactory agreement with measured values. According to LEACHP predictions, however, the model described accurately ethofumesate leaching, but in general overestimated pesticide residual content in soil profiles. Deviations between LEACHP predictions and experimental data must be due to simplifying limitations inherent in the model (*e.g.* influence of preferential macropore flows). The close matching of measured and model predictions regarding nitrogen cycle and ethofumesate, suggests the capability of LEACHN and LEACHP to be used for preliminary assessment of nitrate and ethofumesate leaching, resulting from targeted irrigation management strategies.

5.2. Introduction

The use of agrochemicals (*i.e.* fertilizers and pesticides) in intensive agriculture has been recognized as a potential source of environmental pollution specifically with respect to water quality, since the recovery of fertilizers by a single harvested crop seldom exceeds 25-70% of total applied fertilizer (Allison, 1996; Singh and Sondhi 2001) and less than 0.3% of the pesticides has been estimated to reach its target pest (Pimentel, 1995). The process of water movement and leaching of both nitrate (NO_3^-) and pesticides within the soil profile is highly complex, involving numerous interactions and transformations (Mahmood, 2005). In fact, results have shown that in addition to agrochemical field application rates, factors such as tillage system (Kanwar et al., 1988), cropping system (Peterson and Power, 1991), soil type and environment conditions (Williams and Kissel, 1991) can play important roles in determining the amount of NO_3^- and pesticides leached into groundwater (Johnson et al., 1999).

Given the many factor involved, computer simulation models are increasingly used to study the transport mechanisms of agricultural chemicals through the soil profile and their susceptibility to leaching (Johnson et al., 1999; Dust et al., 2000; Mahmood, 2005). Deterministic-mechanistic models consist of representations of single processes based on physical principles formulated as mathematical equations. Solution of these equations requires a full specification of the boundary conditions of the system in space and time and the initial conditions for each of the variables. These models are comprehensive; simulation results allow insight into the mechanisms and identify

sensitive parameters that govern water and solute fluxes in the dynamic soil-water-air system (Dust et al., 2000). Over the last decades, a large number of computer simulation models have been proposed, most of them, however, were developed as research tools and cannot be applied for management purposes, as they require too many parameters that cannot be obtained by simple field management (Singh and Sondhi, 2001). LEACHN and LEACHP, two modules of LEACHM model, have been widely validated by several groups all around the world against data from field studies (Vink et al., 1997; Johnson et al., 1999; Dust et al., 2000; Asare et al., 2001; Singh and Sondhi 2001; Mahmood 2005). They have been widely tested under different soil and environmental conditions, and they have been reported as valuable tools to simulate field-scale transformations and movement of NO_3^- and pesticides respectively in the unsaturated zone of the soil profile.

The purpose of the present study was to assess the feasibility of LEACHN and LEACHP models to simulate the fate and transport of nitrate and pesticides in an agricultural soil of the Vulnerable Zone of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, North Spain). This agricultural zone is located in the East Sector of the quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, North Spain), a well documented example of groundwater quality degradation due to the intensification of irrigated agriculture combined with the anthropogenic alteration of natural hydrological conditions of the aquifer (Sánchez-Pérez et al., 2003).

5.3. Materials and methods

5.3.1. Study area

Since the end of the 1960s to the mid-1990s, intensification of agriculture in the quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, North Spain), and the increase in irrigated agriculture, combined with the diversion of principal rivers traversing the aquifer and the extension of the artificial drainage network of the aquifer led to an important nitrate contamination in groundwater, exceeding $150 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ (Arrate, 1994; Arrate et al., 1997; Sanchez-Perez et al., 2003). In the mid-1990s, by contrast, nitrate values of the aquifer showed a tendency to decrease, in parallel with a reduction

in the amount of N-fertilizer applied by farmers. Nevertheless, in 1998, the East Sector of the quaternary aquifer was designated by the Basque Government as a Nitrate Vulnerable Zone according to the 91/676/EEC Nitrate Directive and a Code of Good Practice was approved. Now, nitrate concentrations of groundwater are about 60-70 mg $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ (García et al., 2005).

Opposing to what happens with nitrates, the existing literature on groundwater contamination by pesticides is punctual and dispersed, specially in the zone under study. However, assessing the amount of pesticide leached to groundwater is not trivial, since degradation processes and the analytical complexity for pesticide identification and quantification are some of the major problems regarding environmental impact of agriculture. Thus, to detect pesticide pollution in water masses from the vulnerable zone, a program of pesticide screening was implemented by our work team in May 2007 together with the NO_3^- pollution monitoring. In fact, significant concentrations of different pesticides have been periodically detected in both surface and groundwater from the vulnerable zone, concomitant with their application for agricultural purposes.

The 3.55 ha experimental field plot was located within the eastern sector of the quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz in Gauna (42° 49N; 2° 29W). At the beginning of the assay several soil cores were collected in order to determine its physical-chemical composition and classification (Table 5.1.). The soil has a loamy-clay texture in the upper horizons (0-60 cm), while the lower horizons (60-90 cm) have a more silty-clay-loam texture. The bedrock (2-3 m deep) is constituted by impermeable marls. During study period (April-November 2007) the water table stood at between 0.5 and 2 m deep from the cropped soil surface. The thin aquifer is recharged mainly by the infiltration of rainfall or irrigation water through the unsaturated zone.

Meteorological data (temperature and potential evapotranspiration) were collected at Arkaute using an automatic meteorological station, while rainfall data were recorded by a manually pluviometric station installed in the experimental field plot. During the period corresponding to the sugar beet crop (*Beta vulgaris L.*) (18 April – 6 November 2007) the mean temperature was of 14.9°C and precipitation was of 470 mm, below the average annual rainfall recorded for the study zone (600mm).

Table 5.1. Main characteristics of the soils at Gauna

Parameter	Units	0-30	30-60	60-90
Sand	%	21.54	20.14	16.91
Silt	%	42.74	43.57	46.00
Clay	%	35.72	36.30	37.09
pH in water	Adimensional	8.36	8.44	8.46
Organic carbon	%	0.95	0.74	0.44
Total nitrogen	%	0.14	0.11	0.06
C/N	Adimensional	6.69	6.61	7.17
N-NO ₃ ⁻	mg N kg ⁻¹ soil	6.66	5.08	3.75
N-NH ₄ ⁺	mg N kg ⁻¹ soil	0.25	0.21	0.10
P	mg P kg ⁻¹ soil	34.10	22.59	4.74
Bulk density	g cm ⁻³	1.28	1.28	1.27
Field capacity	g water g ⁻¹ soil	0.36	0.36	0.37
Permanent wilting point	g water g ⁻¹ soil	0.20	0.20	0.21
Saturated hydraulic conductivity	m s ⁻¹ x 10 ⁻⁷	9.45	8.89	9.16

5.3.2. Experimental data

The period of model validation extended from 18 April to 6 November 2007. Soil was divided into three layers of 30 cm corresponding to pedological discontinuities (Table 5.1.). The sugar beet crop was planted on 23 April and harvested on 30 October. Two application of N-fertilizer were made: on 20 April NPK fertilizer (8-15-15) was used (61.3 kg N ha⁻¹) and the N form was ammonium nitrate, and on 4 June Nac27 fertilizer (27 % N) was used (118.8 kg N ha⁻¹) and the N form was also ammonium nitrate. Seven doses of irrigation were applied by sprinkling irrigation during summer season from 28 June to 8 September approximately every 10 days (30-43 mm day⁻¹). Seven pesticide applications were also made through sugar beet growing season at different application rates for each pesticide (Table 5.2.).

Two piezometers were installed in the ends of the plot on April 2007 for groundwater sampling and piezometric level monitoring in groundwater upflow (GAU-2) and downflow (GAU-1) from the agricultural plot. In the present work only data obtained from GAU-1 are shown since this piezometer, being downflow, is more representative of the hydro-bio-geological dynamics of NO₃⁻ and pesticides from the

whole agricultural plot. Two CTD-Diver devices (Van Essen Instruments) installed in both piezometers on 12 July recorded continuously data from variations in piezometric level with an acquisition time step of 1 hour. Piezometric level evolution is of great importance, since its monitoring allows identify aquifer recharge events (rise of piezometric level), and therefore, check the influence of both rainfall and irrigation on processes involved in NO_3^- and pesticide leaching.

Table 5.2. Pesticide application rates during sugar beet growing season

Date	Active compound	Type of biocide	Application rate (kg ha⁻¹)
24/04/2007	Metamitron	Herbicide	0.700
	Chloridazon	Herbicide	0.650
	Ethofumesate	Herbicide	0.250
15/05/2007	Metamitron	Herbicide	0.560
	Ethofumesate	Herbicide	0.200
	Phenmedipham	Herbicide	0.080
	Desmedipham	Herbicide	0.080
18/05/2007	Metamitron	Herbicide	0.700
	Ethofumesate	Herbicide	0.200
	Phenmedipham	Herbicide	0.064
	Desmedipham	Herbicide	0.064
06/06/2007	Chloridazon	Herbicide	0.300
	Phenmedipham	Herbicide	0.100
	Ethofumesate	Herbicide	0.250
	Phenmedipham	Herbicide	0.048
07/06/2007	Pirimicarb	Insecticide	0.150
	Deltamethrin	Insecticide	0.008
08/08/2007	Difenoconazole	Fungicide	0.125
11/09/2007	Epoconazole	Fungicide	0.144

Additionally two soil column samplings were made on 20 August and 6 November to analyze NO_3^- content and pesticide concentration in the three pedological soil profiles initially observed. Pesticide concentration was also assessed in soil surface (top 0-1 cm) where pesticides keep initially adsorbed after reaching the soil.

5.3.3. Chemical analyses

Soil samples collected during sugar beet growing season were sampled using a manual drill, and divided into the three sections analysed (0-30, 30-60, 60-90 cm). Immediately after collection, soil samples were taken to the laboratory in dark plastic bags, air-dried at 20°C during 48 h, sieved separately to <2 mm, and subjected to physicochemical characterization according to Sparks et al. (1996): ammonium (NH₄⁺) and nitrate (NO₃⁻) soil content.

NO₃⁻ content in groundwater was assessed by HPLC chromatography (DIONEX ICS-3000) equipped with a thermal conductivity detector. The packed column used was a CarboPac PA20 3 m×1/8 in. (Dionex). Operation conditions were as follows: column temperature 30 °C, detector temperature 30 °C, cell temperature 35 °C, and NaOH 17.5 mM as carrier fluid flowing at 1 mL min⁻¹.

The concentration of pesticides in groundwater samples was analysed by GC-MS (6890 model) equipped with a 5973 inert mass spectrometry selective detector from Agilent Technologies (Palo Alto, CA). The concentration of pesticide residues was quantified through two successive extractions with acetonitrile (firstly) and isopropanol (secondly) followed by GC-MS analysis as described in Muñoz-Leoz et al. (2012).

5.3.4. Model description

LEACHM (Leaching Estimation And Chemistry Model) version 3.0, developed by Hutson and Wagenet (1992), is a process-based deterministic model that describes the one-dimensional water flux and solute movement, transformation, plant uptake and chemical reactions in vertically layered unsaturated soils to a maximum depth of 2 m. LEACHM has several components models, each of which describes a different class of chemicals. In the present work we used LEACHN and LEACHP which simulate nitrogen compounds and pesticide fate and transport respectively. The water flow module, which is common to all components, applies numerical solution techniques to the Richard's water flow equation (Hutson, 1983):

$$\frac{\delta\theta}{\delta t} = \frac{\delta}{\delta z} \left(K(\theta) \frac{\delta H}{\delta z} \right) \pm U(z, t) \quad (5.1)$$

where θ is the volumetric soil moisture content ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$), H the hydraulic head (m), t the time (s), K the hydraulic conductivity (m s^{-1}), z the soil depth (m), and U the rate of plant root extraction of water (s^{-1}).

In LEACHN model, the main processes involved for the transport of nitrogen in the soil are convection or the mass flow of the soil solution; and molecular or ionic diffusion due to concentration gradient. In the development of the LEACHN model the following assumptions have been made: (i) nitrification process occurs in a single step (*i.e.* $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$) rather than two-step process ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$), (ii) net change in the organic N content is small and the rate of nitrogen mineralization as well as immobilization is extremely slow, and finally, (iii) denitrification of nitrate in the soil is a function of the degree of soil water saturation only and oxygen diffusion under soil profile was not considered. The major N transformation processes modelled by LEACHN are: The rate constants of nitrogen mineralization (k_{mi}), nitrification (k_{nit}), denitrification (k_{denit}) and ammonium volatilization (k_{volat}) are adjusted for temperature and water content effects (Johnsson et al., 1987).

Pesticide dynamics modelled by LEACHP are based on the water flow equation in combination with the convection-dispersion equation (CDE):

$$\frac{\partial c}{\partial t}(\theta + \rho k_d) = \frac{\partial}{\partial z} \left(\theta D \frac{\partial c}{\partial z} - qc \right) - \mu c(\theta + \rho k_d) \quad (5.2)$$

where c is the pesticide concentration in soil solution (kg m^{-3}), q the Darcy's velocity (m s^{-1}), ρ the soil bulk density (kg m^{-3}), k_d the partition/distribution coefficient ($\text{m}^3 \text{kg}^{-1}$), D the sum of molecular diffusion and mechanical dispersion of the pesticide ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), μ the pesticide's first-order degradation rate constant (s^{-1}).

Main inputs to the model include soil and crop data, soil surface boundary conditions, N-cycle related microbial activity rates and pesticide physical-chemical characteristics (Table 5.3., 5.4. and 5.5.).

There are some important limitations in LEACHM. The model is not valid when considering profiles with unequal depth increments and can not be used to predict crop yield or to simulate solute transport in 2 and 3 dimensional flux patterns. Moreover, the model does not take into account preferential macropore or runoff water fluxes effects.

Table 5.3. Common input parameter for LEACHN and LEACHP models

Parameters	Units	Values	Source
<i>Crop management</i>			
Plant N uptake	kg N ha ⁻¹	157	Malnou et al. (2006)
Nitrogen uptake		To harvest	Shepherd and Lord (1996)
Relative root depth	Adimensional	0.9	Measured
Crop cover fraction	Adimensional	1	Measured
Date of:			
Germination		23/04/07	Estimated
Emerging		12/06/07	Estimated
Maturity of root		30/07/07	Estimated
Maturity of cover		08/09/07	Estimated
<i>Soil</i>			
Molecular diffusion coefficient	mm ² day ⁻¹	120	Singh and Sondhi (2001)
Dispersion coefficient	Mm	200	Singh and Sondhi (2001)
Minimum root potential	kPa	-3000	Hutson and Wagenet (1992)
Wilting point	kPa	-1500	Hutson and Wagenet (1992)

Table 5.4. Specific input parameters for LEACHN model

Parameters	Units	Values	Source
Partition coefficient for:			
Urea	L kg ⁻¹	1.0	Lotse et al. (1992)
NH ₄ ⁺	L kg ⁻¹	3.0	Lotse et al. (1992)
NO ₃ ⁻	L kg ⁻¹	0.0	Lotse et al. (1992)
Maximum NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ ratio in solution	Adimensional	8	Johnsson et al. (1987)
Synthesis efficiency factor	Adimensional	0.5	Johnson et al. (1999)
Humification fraction	Adimensional	0.2	Johnson et al. (1999)
C/N ratio for biomass and humus	Adimensional	10	Johnson et al. (1999)
Rate of:			
Humus-N Mineralization	Day ⁻¹	3.0·10 ⁻⁴	Acutis et al. (2000)
NH ₄ ⁺ volatilization	Day ⁻¹	0.4	Lotse et al. (1992)
Nitrification	Day ⁻¹	0.01	Acutis et al. (2000)
Denitrification	Day ⁻¹	0.1	Ng et al. (2000)
Q10 temperature factor	Adimensional	2	Johnson et al. (1999)
Denitrification half saturation constant	mg L ⁻¹	10	Johnsson et al. (1987)

Table 5.5. Physical-chemical properties of pesticides simulated with LEACHP model

Pesticide	Solubility (mg dm ⁻³)	Vapour density (mg dm ⁻³)	K _{oc} ^a (mL g ⁻¹)	K _{foc} ^b (mL g ⁻¹)	1/n ^c	K ^d (d ⁻¹)
Chloridazon	422	8.95·10 ⁻¹¹		199	0.85	2.00·10 ⁻²
Deltamethrin	0.0002	2.53·10 ⁻⁰⁹	1.02·10 ⁷			3.30·10 ⁻²
Desmedipham	7	4.97·10 ⁻⁰⁹	1500			8.66·10 ⁻²
Difenoconazole	15.0	5.47·10 ⁻⁰⁹		600	0.74	8.15·10 ⁻³
Epoxiconazole	7.1	1.33·10 ⁻⁰⁶		280	0.91	5.78·10 ⁻³
Ethofumesate	50	7.52·10 ⁻⁰⁵		97.4	96	1.24·10 ⁻²
Metamitron	1770	6.08·10 ⁻⁰⁸		303	0.67	6.24·10 ⁻²
Pirimicarb	3100	4.14·10 ⁻⁰⁵		730	0.83	7.70·10 ⁻²
Phenmedipham	1.8	8.49·10 ⁻¹¹	1072			3.85·10 ⁻²

^a K_{oc}: linear soil adsorption coefficient. ^b K_{foc}: soil adsorption coefficient of Freundlich isotherm. ^c 1/n: exponent of Freundlich isotherm. ^d K: degradation rate constant assessed from field DT50 values assuming a first order degradation kinetic. All data were obtained from PPDB data base (© University of Hertfordshire, 2011)

5.3.5. Model evaluation

These models were evaluated by both graphical and statistical methods. In the graphical approach, the measured and simulated values of NO₃⁻ and selected pesticides composition of leachings were plotted against time. The response of the models can, therefore, be visually quantified. Also models performance was evaluated using three statistical criteria defined in Smith et al. (1996), namely model efficiency (EF), mean error (ME) and root mean square error (RMSE). The mathematical expressions which describe these measures of analysis are:

$$EF = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (P_i - O_i)^2}{\sum_{i=1}^n (O_i - \bar{O})^2} \quad (5.3.)$$

$$ME = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (O_i - P_i); \quad ME\% = \left(\frac{ME}{\bar{O}} \right) \times 100 \quad (5.4.)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (O_i - P_i)^2}; \quad RMSE\% = \left(\frac{RMSE}{\bar{O}} \right) \times 100 \quad (5.5.)$$

where P_i is the predicted value, O_i the observed value, \bar{O} the mean of observed data, and n the number of samples. The EF value compares the simulated values to the average value of the measurements. A negative EF value indicates that the average value of the measurements gives a better estimate than the simulated values. RMSE is a good measure of model accuracy since it shows how much the simulation under or over estimate the measurements. For a perfect fit between observed and simulated data, values of EF, ME and RMSE should be equal to 1.0, 0.0 and 0.0 respectively.

5.4. Results and discussion

5.4.1. Model calibration

The LEACHN model was calibrated by selecting input parameters from the literature that fitted more accurately the simulated evolution of NO_3^- content in groundwater to measured data sampled in GAU-1 (Table 5.3. and 5.4.). Subsequently, the model was validated by comparing (i) predicted water drainage against measured piezometric level evolution, and (ii) simulated NO_3^- soil content data against measured values in soil profiles. Once that input parameters were validated in LEACHN, as the water flow module is common to all LEACHM components, they were used in LEACHP model to simulate pesticide dynamics in both soils and leachings.

5.4.2. NO_3^- dynamic simulation

Figure 5.1. shows NO_3^- content in groundwater measured in GAU-1 against simulations made at a daily scale by LEACHN of NO_3^- content in aqueous phase of soil at 90 cm. At the beginning of monitoring period NO_3^- content measured in groundwater (GAU-1) was above the maximum allowable concentration of nitrate of $50 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ established by EU Drinking Water Directive (2006/118/CE), situation which got worse after the first fertilizer application. Although NPK 8-15-15 was applied three days before sugar beet planting, as pre-plant fertilizer, eight days of persistent and continuous rainfall events induced a fast fertilizer solution and leaching, and thus, a rapid increase of NO_3^- content in groundwater reaching maximum measured and simulated values of $84 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ and $89 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ respectively.

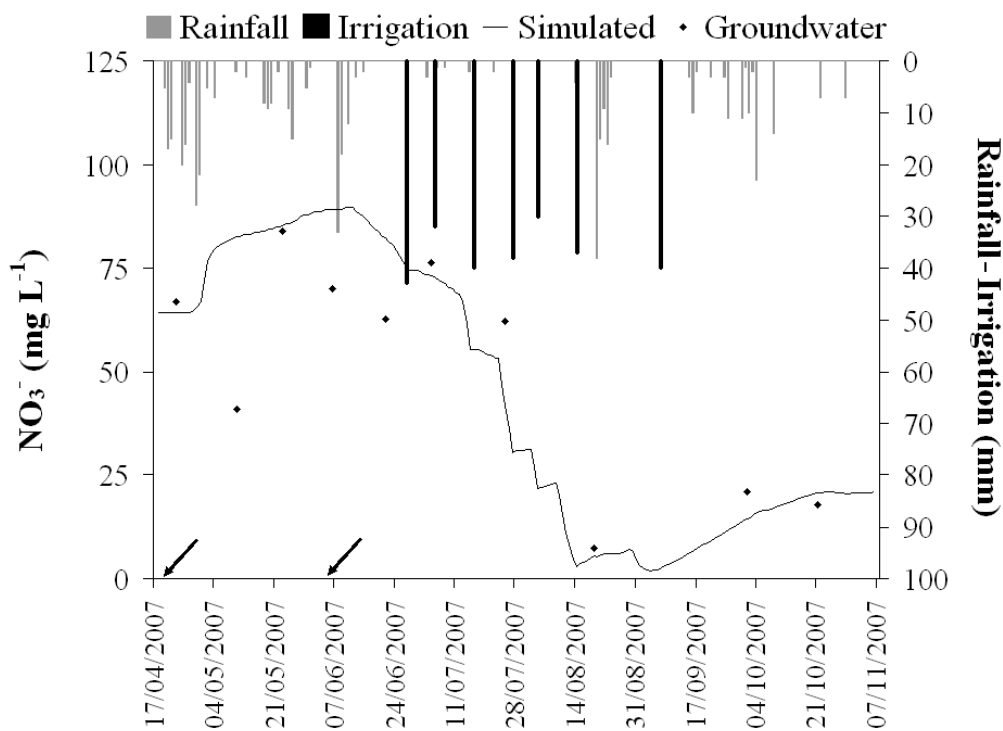


Figure 5.1. Evolution of daily NO_3^- content in groundwater simulated by LEACHN at 90 cm against NO_3^- content in groundwater measured in GAU-1. Arrows indicated the precise date of fertilizer applications

Two weeks after first fertilizer application (NPK), LEACHN predicted a fast increase of NO_3^- content in groundwater, in contrast with measured data in GAU-1, which showed a significant descend on 10 May. The initial period of intense rainfalls could lead to a phenomenon of groundwater NO_3^- dilution due to water draining through soil fractures and preferential channels prior to NO_3^- dragging from fertilizer solution (Martínez et al., 2009). Although the model predicted NO_3^- dragging, the absence of a subroutine to assess the influence of preferential macropore flows on water draining, prevented LEACHN from simulating the first phase of NO_3^- dilution.

A similar pattern of rainfall-induced dilution of groundwater was observed after second fertilization carried out on 4 June. Despite the application of a great amount of nitrogen by fertilizer ($118.8 \text{ kg N ha}^{-1}$ as Nac27), groundwater NO_3^- concentration descended gradually as result of rainfall events and the above mentioned water preferential draining through macropore channels. However, in this case the model did not predict a subsequent increase in groundwater NO_3^- concentration from fertilizer

dragging. By that time, sugar beet being in a more advanced vegetative stadium could assimilate a higher amount of nitrogen from fertilizer than 2 months before, which could lead to lower losses of nitrogen compounds from soil to groundwater, as predicted by the model and corroborated by measured data.

Actually, sugar beet crop is characterized by its ability to take up nitrogen from soil during longer period of time compared to other crops (Shepherd and Lord, 1996; Jegó et al., 2008). This fact, together with lower rainfall (only altered by periodical irrigations) and higher temperatures (higher evapotranspiration) typical of summer period, induced a very accused descend in NO_3^- leaching from 11 July. However, once that sugar beet reached its maturity (root and cover) by the end of August, the amount of nitrogen assimilated by the plant decreased significantly, resulting in higher concentrations of NO_3^- available in soil, not from fertilizer previously applied, but from organic nitrogen mineralization and its subsequent nitrification.

Finally, measured NO_3^- concentration in soil profiles was compared with estimations of LEACHN (Table 5.6.). Only data from soil sampling of 6 November could be used to assess, since NO_3^- content in soil profiles sampled on 20 August were much higher than could be expected, possibly due to the presence of undissolved fertilizer residue remaining which could pollute soil sample. Predictions made by the model were closed to measured NO_3^- content in the two upper soil profiles, while almost doubled the content of 60-90 cm soil profile. In comparison with other crops, remaining inorganic nitrogen in soil at the sugar beet harvest was low due to its higher nitrogen uptake and its ability to take up nitrogen during longer period of times, as above-mentioned (Shepherd and Lord, 1996; Jegó et al., 2008).

Table 5.6. Nitrate content in soil profiles simulated by LEACHN and measured at two sampling times

Soil depth (cm)	20/08/2007		06/11/2007	
	NO_3^- simulated (mg kg^{-1})	NO_3^- measured (mg kg^{-1})	NO_3^- simulated (mg kg^{-1})	NO_3^- measured (mg kg^{-1})
0-30	1.85	37.04	0.88	0.55
30-60	4.22	216.86	2.55	2.11
60-90	2.54	3.30	1.65	0.90

All data expressed as dry weight soil

5.4.3. Drainage simulation

Drainage is an important factor determining the amount of nitrogen and pesticides leached from an agricultural plot (Arregui and Quemada, 2006; Mantovi et al., 2006). Therefore, we studied the capacity of the model to predict drainage evolution during a sugar beet growing season. Figure 5.2. shows daily-scale drainage events simulated by LEACHN at 90 cm against hourly-scale variations in piezometric level recorded by CTD-Diver of GAU-1 (m below ground surface). During summer, high temperatures and the absence of rainfalls only interrupted by periodical irrigations events, induced higher evapotranspiration rates and a general trend of piezometric level descend, until reaching minimum values of 1.86 m in 20 August. It was not until 23 August and 4 October, when two persistent rainfall events led to significant piezometric level rises. The good correlation among aquifer recharge events (rise of piezometric level) and simulated drainage events induced by both rainfall and irrigation would show the reliability of LEACHN to predict variations in piezometric level.

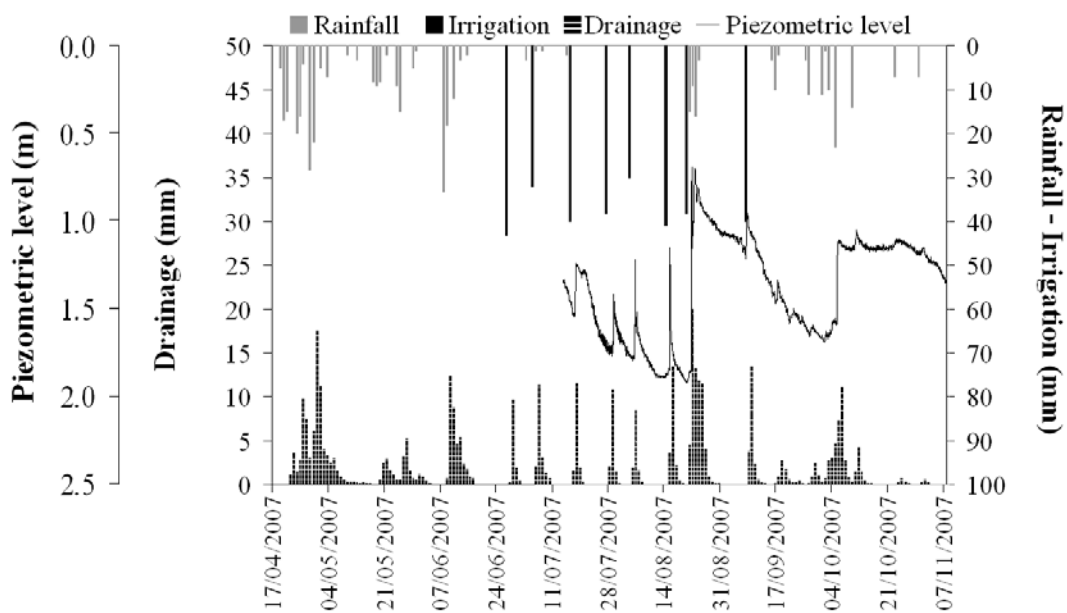


Figure 5.2. Evolution of daily drainage events simulated by LEACHN at 90 cm against hourly measured piezometric level.

5.4.4. LEACHN evaluation

Although LEACHN was originally designed to simulate nitrogen dynamics in corn (Hutson and Wagenet, 1992), a correct model calibration varying initial input values let us adapt the model for sugar beet growing. However, model accuracy evaluation can not be assessed by a simple graphical fitting among measured and predicted values. According to statistical criteria assessed, LEACHN performance was acceptable. Although LEACHN predictions gave a better estimation than the average value of the measurement (EF = 0.551; ME = 9.62 %), the model had a tendency to overestimate NO_3^- groundwater concentration (RMSE = 33.97 %), possibly due to the above mentioned limitation of the model to simulate groundwater dilution by water macropore draining after rainfall events.

5.4.5. Pesticide dynamic simulation

Once that LEACHN model has been calibrated and satisfactorily validated with measured data from drainage and NO_3^- concentration in groundwater, the same input data for soil and crop characteristics were used in LEACHP together with physical-chemical properties of pesticides used during sugar beet growing season (Table 5.5.). Unfortunately, simulations of pesticide dynamics in both soil and leachings could not be compared in extent to measured data like previously done with NO_3^- dynamics, because limited field measurements were available.

5.4.5.1. Herbicides

Herbicides were the pesticides most widely used during the sugar beet growing season. They were applied periodically to agricultural soils (Table 5.2.) to avoid the development of undesirable plants which could compete with sugar beet for the great pool of available nutrients in soil from fertilizers applied. LEACHP simulated for the five herbicides a fast increase of their concentration in soil surface (0-1 cm) immediately after their application (Figures 5.3. and 5.4.), with maximum values of $2,305 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $1,205 \mu\text{g kg}^{-1}$ simulated for metamilon and chloridazon respectively, due to their higher application rates in contrast with the rest of herbicides.

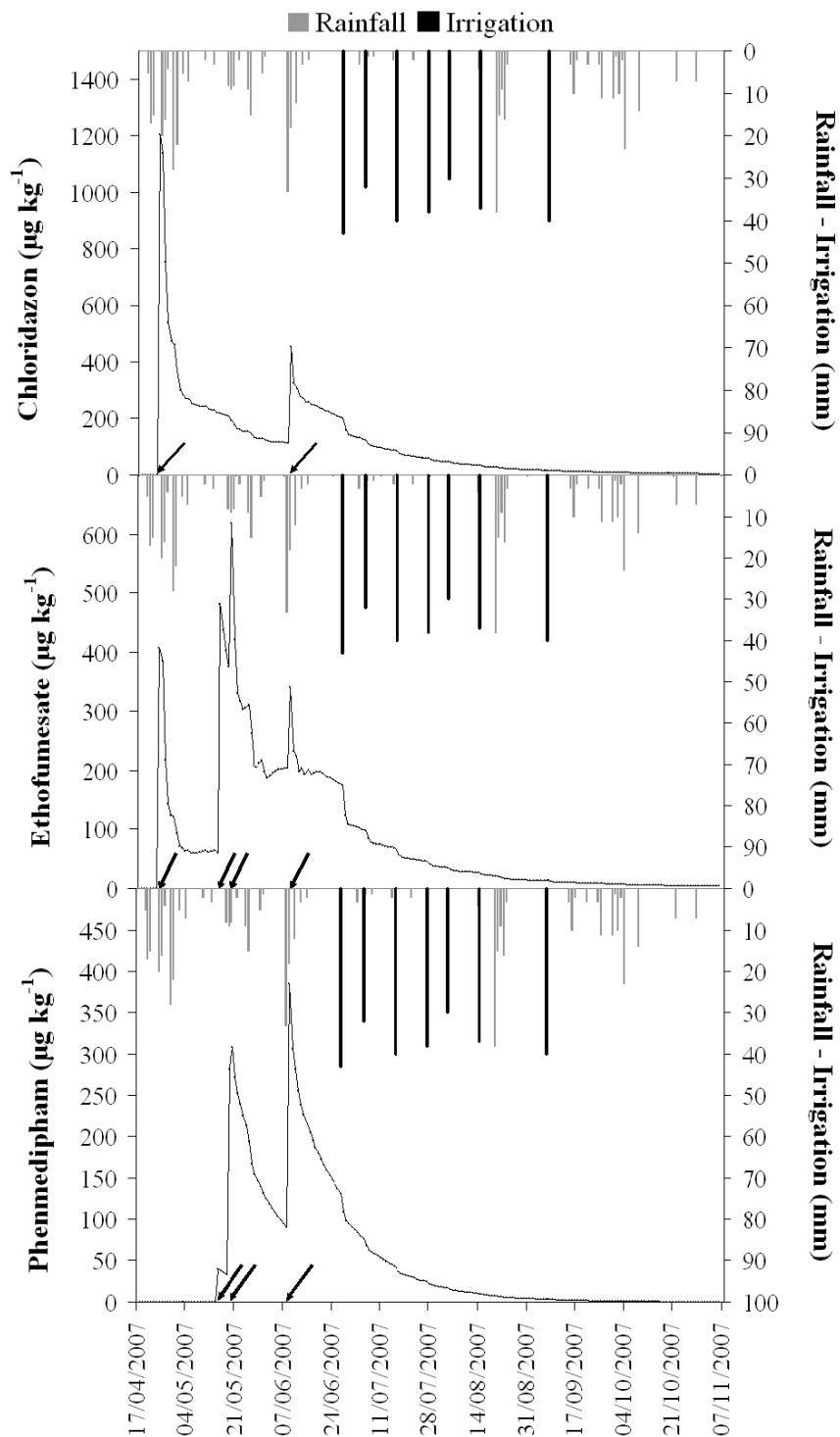


Figure 5.3. Evolution of daily chloridazone, ethofumesate and phenmedipham concentration in upper 1 cm of soil simulated by LEACHP. Arrows indicated the precise date of their application. Data expressed as dry weight soil.

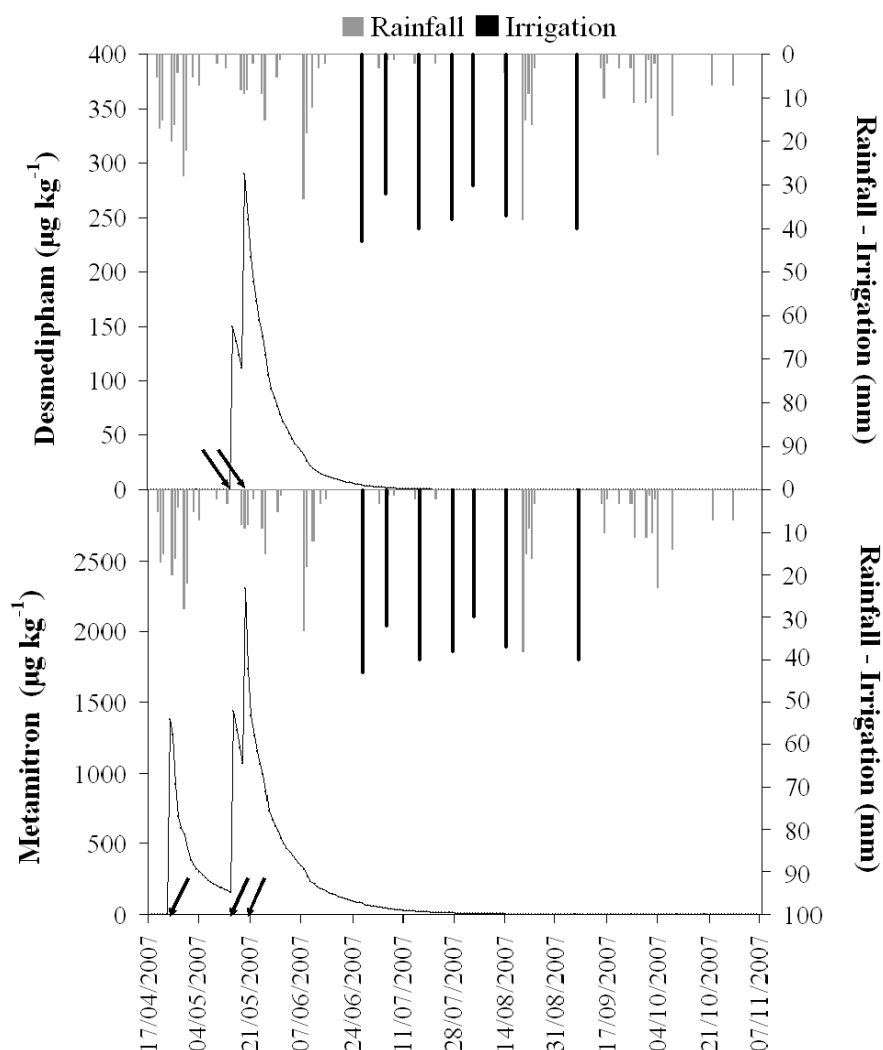


Figure 5.4. Evolution of daily desmedipham and metamitron content in upper 1 cm of soil simulated by LEACHP. Arrows indicated the precise date of their application. Data expressed as dry weight soil.

After reaching the soil, LEACHP simulated fast dissipation kinetics for the five herbicides, especially after rainfall and irrigation events. Given that herbicides have high water solubility, this pattern could suggest the influence of pesticide leaching as the mechanism responsible of herbicide dissipation from soil surface. However, while LEACHP simulated for all of them their presence in the first 30 cm of soil (Table 5.7.), ethofumesate was the only herbicide which the model predicted to be in the three soil profiles at significant concentrations.

Table 5.7. Pesticide content in soil profiles simulated by LEACHP and measured at two sampling times

Pesticide	Soil depth (cm)	20/08/2007		06/11/2007	
		Simulated ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Measured ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Simulated ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Measured ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
<i>Herbicides</i>					
Chloridazon	0-1	27.85	<D.L.	4.46	<D.L.
	0-30	35.14	<D.L.	5.78	<D.L.
	30-60	1.73	<D.L.	1.15	<D.L.
	60-90	0	<D.L.	0	<D.L.
Desmedipham	0-1	0.02	<D.L.	0	<D.L.
	0-30	0.01	<D.L.	0	<D.L.
	30-60	0	<D.L.	0	<D.L.
	60-90	0	<D.L.	0	<D.L.
Ethofumesate	0-1	21.52	92.6	5.29	43.2
	0-30	37.92	76.3	7.56	9.1
	30-60	22.67	0	9.55	0
	60-90	1.42	0	2.76	0
Metamitron	0-1	2.16	<D.L.	0.02	<D.L.
	0-30	0.98	<D.L.	0.01	<D.L.
	30-60	0	<D.L.	0	<D.L.
	60-90	0	<D.L.	0	<D.L.
Phenmedipham	0-1	7.41	<D.L.	0.26	<D.L.
	0-30	3.1	<D.L.	0.2	<D.L.
	30-60	0	<D.L.	0	<D.L.
	60-90	0	<D.L.	0	<D.L.
<i>Insecticides</i>					
Deltamethrin	0-1	0.18	<D.L.	0.28	<D.L.
	0-30	0	<D.L.	0	<D.L.
	30-60	0	<D.L.	0	<D.L.
	60-90	0	<D.L.	0	<D.L.
Pirimicarb	0-1	0.52	<D.L.	0	<D.L.
	0-30	0.03	<D.L.	0	<D.L.
	30-60	0	<D.L.	0	<D.L.
	60-90	0	<D.L.	0	<D.L.
<i>Fungicides</i>					
Difenoconazole	0-1	234.71	135.8	61.41	32.5
	0-30	0	23.4	2.53	<D.L.
	30-60	0	<D.L.	0	<D.L.
	60-90	0	<D.L.	0	<D.L.
Epoconazole	0-1	Not applied		69.26	48.9
	0-30	Not applied		24.89	21.7
	30-60	Not applied		0	<D.L.
	60-90	Not applied		0	<D.L.

< D.L.: measured pesticide content in soil under detection limit.

Data expressed as dry weight soil.

These results were in accordance with simulations made by LEACHP regarding pesticide presence in groundwater (Figure 5.5.). The model simulated a significant ethofumesate leaching from 10 June, two months after its first application, to then progressively increased until reaching maximum concentrations of $4.77 \mu\text{g L}^{-1}$ on 28 August, which suggests a slow dynamic of this herbicide through soil profiles until reaching groundwater. Additionally, predicted data by LEACHP were similar to groundwater ethofumesate concentrations measured in GAU-1 at two sampling dates: 5 July (S1: $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) and on 4 September (S2: $5.3 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figure 5.5.), values which clearly exceeded the maximum allowable concentration (MAC) for drinking water established by the EEC in $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ for individual pesticides (2006/118/CE). Although ethofumesate has lower solubility in water compared to other herbicides (50 mg L^{-1} versus 422 and 1770 mg L^{-1} from chloridazon and met amitron respectively) (Table 5.5), its lower adsorption to soil organic matter and lower soil degradation rate could explained its higher potential to be leached.

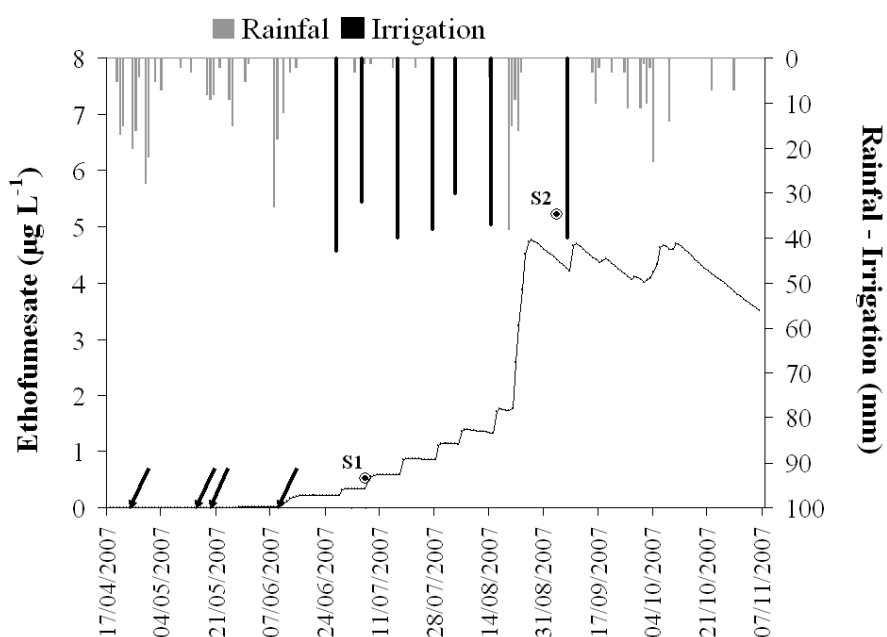


Figure 5.5. Evolution of daily ethofumesate concentration in groundwater simulated by LEACHP at 90 cm against ethofumesate concentration in groundwater measured in GAU-1. Arrows indicated the precise date of fertilizer applications

Since leaching could not explain the dissipation of the rest of the herbicides from soil, and pesticide volatilization was not of significant relevance (in general vapour

density values were very low), the other possible mechanisms responsible of pesticide disappearance which could be simulated by the model was microbial degradation. In fact, soil microorganisms have been generally reported to play a key role in pesticide removal from soils conditioning its persistence and susceptibility to leaching (Aislabie and Lloyd-Jones, 1995; Bending et al., 2006). With microbial activity being highly dependent on pesticide bioavailability (Pesaro et al., 2004), higher theoretical degradations rates could be expected for herbicides after rainfall and irrigation events, when their solubilization and diffusion to the aqueous phase could led to higher availability to soil microorganisms rather than adsorbed to soil.

5.4.5.2. Insecticides

Since insecticides were only used once during sugar beet growing season, and at lower application rates compared to herbicides (see Table 5.2.), concentration of deltamethrin and pirimicarb in soil was lower according to LEACHP simulations (Figure 5.6.). The model predicted two different dynamics in soil for each of the insecticides studied in function of their physical-chemical characteristics. Although both insecticides were applied simultaneously, according to model simulations, precipitations taking place during their application dragged much faster pirimicarb from sugar beet foliar surfaces reaching maximum concentrations in soil of $304 \mu\text{g kg}^{-1}$ immediately after being applied. Deltamethrin, by contrast, was simulated to be progressively dissolved by water from irrigation and rainfall during a longer period of time due to its lower solubility, and therefore its concentration in soil increased gradually until reaching maximum values of $0.84 \mu\text{g kg}^{-1}$ 77 days after its application.

Finally, the model did not predict a significant transport of both insecticides to lower soil profiles which kept mostly retained in soil surface (see Table 5.7.) due to their high adsorption coefficients, in agreement with no insecticide presence detected in groundwater from GAU-1. In this respect, deltamethrin had the highest adsorption coefficient among the pesticides tested. This parameter reduces not only its potential to leach, but also its bioavailability to soil microorganisms responsible of its degradation (Lee et al., 2004), fact which could explain its long persistence in soil, despite its low concentration in soil surface, as predicted by the model

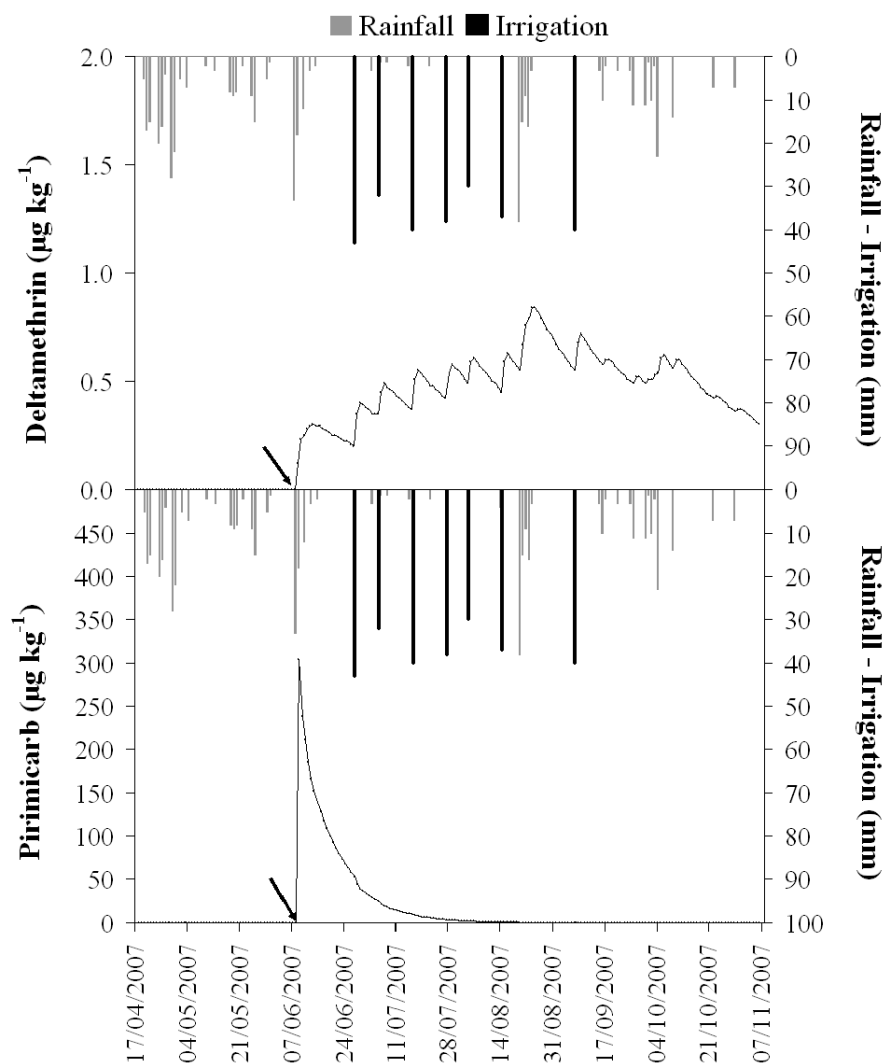


Figure 5.6. Evolution of daily deltamethrin and pirimicarb concentration in upper 1 cm of soil simulated by LEACHP. Arrows indicated the precise date of their application. Data expressed as dry weight soil.

5.4.5.3. Fungicides

Similarly to insecticides, fungicides were only used once during sugar beet growing season (Table 5.2.). LEACHP simulated for difenoconazole and epoxiconazole their maximum concentration in soil immediately after their application (266.7 and 361 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively) (Figure 5.7.), and then a slower dissipation compared to herbicides and insecticides being predicted by the model the highest residual concentrations in soil by the end of simulation period. Although fungicides have an intermediate solubility in water, and their adsorption coefficients are similar to the rest of pesticides, their low

degradation rate constants (one order of magnitude lower) condition their persistence in soils, as suggested by the model. In fact, fungicides act against fungi, and thus, their harmful effects on the rest of soil microbial communities are more probable than those of insecticides and herbicides (Lupwayi et al., 2001; Monkiedje et al., 2002). This fact could explain their lower degradation rates, and therefore, their higher persistence in soil as compared with herbicides and insecticides, even being applied at lower rates.

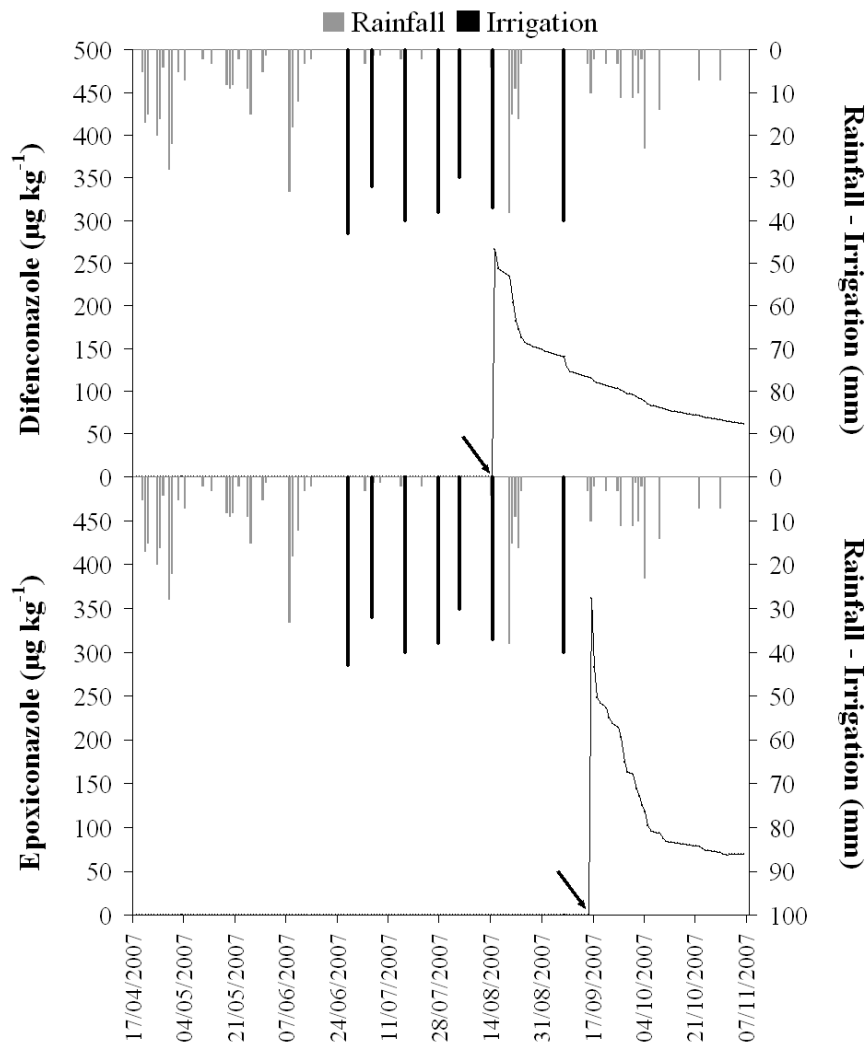


Figure 5.7. Evolution of daily difenoconazole and epoxiconazole concentration in upper 1 cm of soil simulated by LEACHP. Arrows indicated the precise date of their application.

In contrast with ethofumesate, LEACHP did not simulate difenoconazole leaching during the whole growing season. Although difenoconazole had lower

solubility and higher adsorption coefficient than ethofumesate, its presence in groundwater was detected in groundwater sampled from GAU-1 on 4 September ($1.1 \mu\text{L}^{-1}$). Epoxiconazole, by contrast being applied at higher rates than difenoconazole and having similar physical-chemical characteristics could not be detected. This fact could suggest that difenoconazole dynamics in soil could be highly conditioned by macropore transport, phenomenon which can not be simulated by LEACHP as above mentioned.

5.4.6. LEACHP evaluation

Measured pesticide content in soil profiles was compared with those simulated by LEACHP (Table 5.7.). The low number of field measures prevented us from using statistical indexes previously assessed to evaluate LEACHN accuracy in modelling NO_3^- evolution in groundwater, so discussion must be based on a simple analysis of differences among simulated and measured values.

The model predicted significant residual concentration in soil for all the pesticides tested, while according to measured data from two soil samplings, only ethofumesate, difenoconazole and epoxiconazole could be detected. Highest concentrations in soil were simulated for the herbicides most widely applied (i.e. metamitron, chloridazon and ethofumesate), however their dissipation in soil was predicted to be fast due to their high solubility and lower adsorption to soil compared to the rest of pesticides. Additionally, no residual pesticide presence was detected in deeper soil profiles (30-60 cm and 60-90 cm) in contrast with predictions made by the model. Surprisingly, no ethofumesate neither difenoconazole presence was detected in soil profiles at lower than 30 cm although their presence in groundwater could suggest their presence throughout the whole soil profile (as simulated by the model for ethofumesate).

This tendency of the model to overestimate pesticide content in soil profiles for all the pesticides tested, (except for ethofumesate), could be explained by their inherent limitation to calculate the effect of preferential macropore transport and other mechanisms responsible of pesticide dissipation from soil other than pesticide volatilization, microbial degradation or plant absorption. In fact, measured pesticide dissipation in soil was faster than predicted by the model according to higher values of

pesticide content simulated by LEACHP, as previously reported for other pesticides simulated with this model (Dust et al., 2000; Asare et al., 2001). The model ignores important factors such as pesticide photodegradation, the influence of soil pH on pesticide hydrolysis and microbial degradation variation in function of organic matter and temperature, factors all of them which could contribute to enhance pesticide dissipation in soil, and thus, in lower measured contents of pesticide in soil than predicted by the model (Ng et al., 2000). Also must be taken into account that while fertilizer and pesticides were simulated independently, under real field conditions they can co-exist, resulting in possible synergistic or antagonistic interactions among them which led to higher degradation rates than expected (Barriuso et al., 1997; Moorman et al., 2001, Muñoz-Leoz et al, 2012)

5.5. Conclusions

Although LEACHN did not performed to perfectly simulate the absolute values of nitrate concentration in soil and groundwater, the trends and range of variations in NO_3^- concentration in groundwater were satisfactorily simulated by the model. Additionally, a significant correlation was found among measured piezometric level evolution and water drainage events predicted by the model, which were controlled by rainfall and excess of irrigation. LEACHP, by contrast, had a tendency to overestimate residual pesticide concentration in soil. This model showed his accuracy to simulate ethofumesate leaching (but not for difenoconazole), predicting concentrations of the herbicide in groundwater in reasonably agreement with those measured in GAU-1 piezometer. Deviations between LEACHP predictions and experimental data must be due to simplifying limitations inherent in the model (*e.g.* influence of preferential macropore flows). The close matching of measured and model predictions regarding nitrogen cycle and ethofumesate, suggests the capability of LEACHN and LEACHP to be used for preliminary assessment of nitrate and ethofumesate leaching, resulting from targeted irrigation management strategies.

5.6. References

- Acutis, M., Ducco, G., Grignani, C., 2000. Stochastic use of the LEACH model to forecast nitrate leaching in different maize cropping systems. *European Journal of Agronomy*, 13, 191-206.
- Aislabie, J., Lloyd-Jones, G., 1995. A review of bacterial degradation of pesticides. *Australian Journal of Soil Research* 33, 925-942.
- Allison, F.E., 1996. The fate of nitrogen applied to soils. *Advances in Agronomy* 18, 219-258.
- Arrate, I., 1994. Estudio hidrogeológico del acuífero cuaternario de Vitoria-Gasteiz (Araba, País Vasco). Ph.D. Thesis. Department of Geodynamics. University of the Basque Country-Euskal Herriko Unibertsitatea, p. 251.
- Arrate, I., Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., Vadecillo, M.A., Iribar, V., Ruiz, M., 1997. Groundwater pollution in quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, Spain). *Environmental Geology* 30, 257-265.
- Arregui, L., Quemada, M., 2006. Drainage and nitrate leaching in a crop rotation under different N-fertilizer strategies: application of capacitance probes. *Plant Soil* 288, 57-69.
- Asare, D.K., Sammis, T.W., Smeal, D., Zhang, H., Sitze, D.O., 2001. Modeling an irrigation management strategy for minimizing the leaching of atrazine. *Agricultural Water Management* 48, 225-238.
- Barriuso, E., Houot, S., Serra-Wittling, C., 1997. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pesticide Science* 49, 65-75.
- Bending, G.D., Lincoln, S.D., Edmondson, R.N., 2006. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution* 139, 279-287.
- Dust, M., Baran, N., Errera, G., Hutson, J.L., Mouvet, C., Schäfer, H., Vereecken, H., Walker, A., 2000. Simulation of water and solute transport in field soils with the LEACHP model. *Agricultural Water Management* 44, 225-245.
- García, C., Martínez, M., Antigüedad, I., Sánchez-Pérez, J.M., 2005. Nitrate time-evolution in the waters of the quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, Spain); influence of wetlands. In: *Nitrate in Groundwaters (IAH Selected Papers Series. SP5)* (Eds: L. Razowska, A. Sadurski), 15-25.
- Hutson, J. L., 1983. Estimating hydrological properties of South African soils. Ph.D. Thesis. University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa
- Hutson, J.L., Wagenet, R.J., 1992. Leaching estimation and chemistry model (LEACHM): a process-based model of water and solute movement, transformations, plant uptake and chemical reactions in the unsaturated zone. Version 3. Department of

Soil, Crop and Atmospheric Sciences, Research Series No. 92-3. New York State College of Agricultural and Life Sciences, Cornell University, Ithaca, New York.

- Jegó, G., Martínez, M., Antigüedad, I., Launay, M., Sánchez-Pérez, J.M., Justes, E., 2008. Evaluation of the impact of various agricultural practices on nitrate leaching under the root zone of potato and sugar beet using the STICS soil-crop model. *Science of the Total Environment* 394, 207-221.
- Johnsson, H., Bergström, L., Jansson, P., Paustian, K., 1987. Simulated nitrogen dynamics and losses in a layered agricultural soil. *Agricultural Ecosystem and Environment* 18, 333-356.
- Johnson A.D., Cabrera, M.L., Mc Cracken D.V., Radcliffe D.E., 1999. LEACHN Simulations of nitrogen dynamics and water drainage in an Ultisol. *Agronomy Journal* 91, 597-606.
- Kanwar, R.S., Baker, J.L., Baker, D.G., 1988. Tillage and split N-fertilization effects on subsurface drainage water quality and crop yields. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 31, 453-460.
- Lee, S., Gan, J., Kim, J.S., Kabashima, J.N., Crowley, D.E., 2004. Microbial transformation of pyrethroid insecticides in aqueous and sediment phases. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1-6.
- Lotse, E.G., Jabro, J.D., Simmons, K.E., Baker, D.E., 1992. Simulation of nitrogen dynamics and leaching from arable soils. *Journal of Contaminant Hydrology* 10, 183-186.
- Lupwayi, N.Z., Arshad, M.A., Rice, W.A., Clayton, G.W., 2001. Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. *Applied Soil Ecology* 16, 251-261.
- Mahmood, B., 2005. Analysis of a LEACHN-based management technique in 'predictive mode'. *Agricultural Water Management* 75, 25-37.
- Malnou, C.S., Jagaard, K.W., Sparkles, D.L., 2006. A canopy approach to nitrogen fertilizer recommendations for the sugar beet crop. *European Journal of Agronomy* 25, 256-263.
- Mantovi, P., Fumagalli, L., Beretta, G.P., Guermandi, M., 2006. Nitrate leaching through the unsaturated zone following pig slurry applications. *Journal of Hydrology* 316, 195-212.
- Martínez, M., Martínez de Sabando, M., Justes, E., Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., 2009. Aplicación del modelo STICS para la determinación de la lixiviación de nitratos en la zona vulnerable de Vitoria-Gasteiz bajo cultivo de remolacha azucarera y trigo. *Estudios en la Zona no Saturada del Suelo Vol. IX.* 401-408.
- Monkiedje, A., Ilori, M.O., Spiteller, M., 2002. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1939-1948.

- Moorman, T.B., Cowan, J.K., Arthur, E.L., Coats, J.R., 2001. Organic amendments to enhance herbicide biodegradation in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 541-545.
- Muñoz-Leoz, B., Garbisu, C., Antigüedad, I., Ruiz-Romera, E., 2012. Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities *Soil Biology and Biochemistry* 48, 125-134.
- Ng, H.Y.F., Drury, C.F., Serem, V.K., Tan, C.S., Gaynor, J.D., 2000. Modeling and testing of the effect of tillage, cropping and water management practices on nitrate leaching in clay loam soil. *Agricultural Water Management* 43, 111-131.
- Pesaro, M., Nicollier, G., Zeyer, J., Widmer, F., 2004. Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. *Applied Environmental Microbiology* 70, 2577-2587.
- Pesticide Properties Data Base-PPDB, 2011. Agriculture & Environment Research unit. University of Hertfordshire. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>
- Peterson, G.A., Power, J.F., 1991. Soil, crop, and water management. p. 189–198. In R.F. Follett et al. (ed.) *Managing nitrogen for groundwater quality and farm profitability*. Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Pimentel, D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 8, 17-29.
- Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., Arrate, I., García-Linares, C., Morell, I., 2003. The influence of nitrate leaching through unsaturated soil on groundwater pollution in an agricultural area of the Basque Country: a case of study. *Science of the Total Environment* 317, 173-187.
- Shepherd, M.A., Lord, E.I., 1996. Nitrate leaching from a sandy soil; the effect of previous crop and post-harvest soil management in an arable rotation. *Journal of Agricultural Science* 127, 215-229.
- Singh, K.G., Sondhi, S.K., 2001. Validation of a fertilizer nitrogen model during crop production. *Journal of Agricultural Engineering Research* 78, 317-324.
- Smith, J., Smith, P., Addiscott, T.M., 1996. Quantitative methods to evaluate and compare soil organic matter (SOM) models. In: Powlson, D., Smith, P., Smith, J., editors. *Evaluation of soil organic matter models*. Berlin: Springer-Verlag, pp 181-199.
- Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., 1996. *Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America Book Series, Madison, WI.
- Vink, J.P.M., Gottesbüren, B., Diekkrüger, B., van der Zee, S.E.A.T.M., 1997. Simulation and model comparison of unsaturated movement of pesticides from a large clay lysimeter. *Ecological Modelling* 105, 113-127.

Williams, J.R., Kissel, D.E., 1991. Water percolation: an indicator of nitrogen leaching potential. p. 59–84. In R.F. Follett et al. (ed.). Managing nitrogen for groundwater quality and farm profitability. Soil Science Society of America, Madison, WI.

6

- 6.1. Abstract
- 6.2. Introduction
- 6.3. Materials and methods
- 6.4. Results and discussion
- 6.5. Conclusions
- 6.6. References

Results and discussion II:

**Nitrogen transformations and
greenhouse gas emissions from a
riparian wetland soil: an
undisturbed soil column study**

*“Soy de los que piensan que la ciencia
tiene una gran belleza. Un científico en su
laboratorio no es sólo un técnico: es
también un niño colocado ante fenómenos
naturales que le impresionan como un
cuento de hadas”*

Marie Curie (1867 - 1934)

6. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions from a riparian wetland soil: an undisturbed soil column study

Published in: Science of the Total Environment 409, 763-770 (2011).

6.1. Abstract

Riparian wetlands bordering intensively managed agricultural fields can act as biological filters that retain and transform agrochemicals such as nitrate and pesticides. Nitrate removal in wetlands has usually been attributed to denitrification processes which in turn imply the production of greenhouse gases (CO₂, N₂O). Denitrification processes were studied in the Salburua wetland (northern Spain) by using undisturbed soil columns which were subsequently divided into three sections corresponding to A-, Bg- and B2g-soil horizons. Soil horizons were subjected to leaching with a 200 mg NO₃⁻ L⁻¹ solution (rate: 90 mL day⁻¹) for 125 days at two different temperatures (10 and 20 °C), using a new experimental design for leaching assays which enabled not only to evaluate leachate composition but also to measure gas emissions during the leaching

process. Column leachate samples were analyzed for NO_3^- concentration, NH_4^+ concentration, and dissolved organic carbon. Emissions of greenhouse gases (CO_2 and N_2O) were determined in the undisturbed soil columns. The A horizon at 20 °C showed the highest rates of NO_3^- removal ($1.56 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$) and CO_2 and N_2O production ($5.89 \text{ mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$ and $55.71 \text{ } \mu\text{g N-N}_2\text{O kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$). For the Salburua wetland riparian soil, we estimated a potential nitrate removal capacity of $1012 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$, and potential greenhouse gas emissions of $5620 \text{ kg CO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ and $240 \text{ kg N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$.

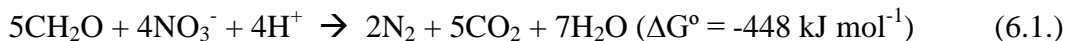
6.2. Introduction

The extensive use of agricultural chemicals has led to contamination of surface water and groundwater with pesticides, nitrogen compounds, etc. Nitrate (NO_3^-), the principal N-bearing constituent of groundwater (Pauwels and Talbo, 2004), has been reported as a cause of methaemoglobinaemia in humans (Höring and Chapman, 2004) and eutrophication in aquatic ecosystems (Galloway et al., 2008).

Riparian wetlands bordering intensively managed agricultural fields can act as biological filters that retain and transform chemicals (*e.g.*, NO_3^-) as groundwater passes through these transition zones between terrestrial and aquatic ecosystems (Casey et al., 2004; Ranalli and Macalady, 2010). In fact, significant reductions in groundwater NO_3^- concentration have been reported in riparian wetlands (Casey et al., 2004; Hefting et al., 2006; Zhao et al., 2009). Processes responsible for this NO_3^- removal from groundwater include plant uptake, denitrification, microbial assimilative NO_3^- reduction, etc. (Rivett et al., 2008). Nonetheless, in riparian wetland soils receiving large amounts of N, denitrification appears to be the most important process for NO_3^- removal (as compared to upland soils, riparian wetland soils are usually wetter and have higher contents of organic C, conditions which favour denitrification) (Ranalli and Macalady, 2010).

Denitrification, a microbial process that takes place in soil under anaerobic water-saturated conditions, involves the reduction of NO_3^- to N_2 (with NO_2^- , NO , and N_2O as intermediates) and the oxidation of organic matter, as described by Jørgensen et al. (2004):

6. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions from a riparian wetland soil



A priori denitrification appears desirable as it can remove NO_3^- from polluted ecosystems but, on the other hand, it can generate significant amounts of greenhouse gases such as CO_2 and, above all, N_2O (Liu and Greaver, 2009). In riparian soils, the rate of emission of greenhouse gases can be a highly spatial variable: these gases are often produced in soil microsites around particles of decaying organic matter which is unevenly distributed in the soil profile (Hill et al., 2000). Likewise, N_2O and CO_2 emissions often follow a strong temporal pattern depending on environmental conditions (*e.g.*, temperature, rainfall, water table, etc.) (Hefting et al., 2004).

Previous studies have shown that the physicochemical properties of the Salburua wetland riparian soil are highly conducive to denitrification, *i.e.* a noteworthy clay cover, a very low hydraulic gradient, and a high organic matter content (García-Linares et al., 2003). Indeed, nitrate concentrations exceeding 50 mg L^{-1} in groundwater entering the wetland are less than 10 mg L^{-1} at the outlet. The capacity of Salburua wetland riparian soil to remove NO_3^- has already been reported by Sánchez-Pérez et al. (2003) by means of denitrification potential assays. In Salburua soils, the rate of denitrification is higher in the upper soil profile (with potential denitrification rates between 18.7 and $20.3 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$) and then decreases, together with the content of organic matter, with increasing depth to denitrification rates of 0.1 - $1.1 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$ at deeper soil profiles (Sánchez-Pérez et al., 2003). In any case, short-term microcosm tests usually overestimate denitrification capacity as they are carried out under optimal conditions (no carbon or nitrate limitation) and do not simulate the natural conditions of the soil under study (Groffman et al., 2006).

Soil column experiments have been widely used to monitor the fate and mobility of pollutants (*e.g.* nitrate), as well as to evaluate soil hydrogeological properties and to study the kinetics of soil microbial communities (Jørgensen et al., 2004; Egiarte et al., 2006; Lewis and Sjöström, 2010). Undisturbed column leaching assays allow testing of soil which is as close to actual field conditions as possible. However, traditionally, leaching assays have been designed to monitor leachate composition. Here, we proposed a new experimental design for leaching assays using undisturbed soil columns, which enables not only to evaluate leachate composition but also to measure

gas emissions resulting from groundwater flow simulation under different environmental conditions.

The objectives of this work were to study under laboratory conditions: (i) the relative importance of different microbial processes involved in NO_3^- removal as groundwater passes through the Salburua wetland riparian soil; (ii) the rate of NO_3^- removal and greenhouse gases (CO_2 and N_2O) emissions; and (iii) the effect of temperature and soil organic carbon (C_{org}) on these processes.

6.3. Materials and methods

6.3.1. Study site

The study was carried out in the Salburua wetland, a riparian zone of the Alegría river (within the catchment of the Ebro river) surrounded by a large area of intensive agriculture. It is located within the East Sector of the Quaternary Aquifer of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, northern Spain), which was declared in 1999 as Vulnerable Zone to the pollution by nitrates of agricultural origin according to Nitrates Directive 91/676/EEC. The thickness of the quaternary deposits in the area surrounding the wetland varies between 2 and 4 m, but can reach up to 10 m coinciding with the appearance of a furrow in the marly impermeable substratum. The quaternary deposits form a spatially heterogeneous sequence composed, over the marls, of gravel (bottom), sand, and clay (top), which appears homogenous in the order but not in the thicknesses. The presence of a top thick layer (up to 2 m) of clay results in an aquifer of semi-confined character. The main water entering the Salburua wetland (a natural discharge zone for the quaternary aquifer) comes from the various ditches that drain the croplands lying to the south and from the aquifer itself; at the eastern sector of the wetland, where this study was carried out, the only water entering the wetland is groundwater (García-Linares et al., 2003). In this area, the concentration of NO_3^- in the water entering the wetland usually exceeds $50 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, but is less than $10 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ (usually below detection limit) in the water leaving the wetland.

6.3.2. Undisturbed soil column design

Nine undisturbed soil columns (1 m deep) were collected from the riparian zone located in the eastern sector of the Salburua wetland, an area characterized by high levels of NO_3^- in the groundwater entering the wetland. Before sampling, the vegetation was manually removed from the soil surface. Soil columns were sampled in PVC pipes (1 m length, 45 mm inner diameter) using a percussion hammer (HM 1800 model, Eijkelkamp). Immediately after sampling, the top and bottom of the columns were sealed with plastic lids to avoid drying. Columns were kept at 4 °C and without delay transported to the laboratory.

Undisturbed soil columns were found to have 3 different soil profile layers (horizons): (i) A-horizon: superficial (0-20 cm), of brownish-black colour, clay-sandy texture, and abundant fine size roots; (ii) Bg-horizon: sub-superficial (20-70 cm), of grayish-brown colour, clayey texture, presence of oxide reduction bands of iron and manganese, and calcareous nodules; and (iii) B2g-horizon: sub-superficial (70-100 cm), of obscure brownish-red colour, clayey-silty texture, and abundant oxide reduction stains of great size.

Three of the columns were divided into three sections, corresponding to the three soil horizons (*i.e.*, A, Bg, B2g), sieved separately to <2 mm, air dried at 20 °C for 48 h, and finally subjected to physicochemical characterization according to Sparks et al. (1996): pH, organic carbon (C_{org}), total nitrogen (N), ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-) contents, and clay mineralogy (Table 6.1.).

The other six columns were used for the leaching assays: for each incubation temperature (10 °C *versus* 20 °C), three undisturbed soil columns were divided into their three constituent horizons (*i.e.*, three A-horizons; three Bg-horizons; three B2g-horizons). Then, for each soil horizon, a column leaching assay was carried out according to the scheme shown in Figure 6.1.: the bottom of each leaching column had a PVC adapter sealed with an inflow connection (22 cm silicone pipe) to a 12 channel peristaltic pump; the top of each leaching column was sealed with a 650 mL chamber made of PVC pipe (45 mm inner diameter) and PVC adapters. The top of the chamber was connected to a polypropylene gas bag in order to compensate for the overpressure resulting from leachate accumulation as well as to collect gas samples. At the bottom of

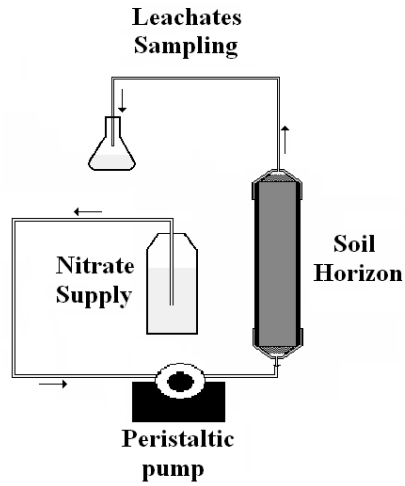
the chamber, a rubber septum sealed silicone pipe was placed so that leachates could be collected, using a polypropylene syringe, at each sampling time. The top and bottom of the leaching columns were filled with 5 cm of a washed sea sand layer and glass wool, in order to minimize losses of soil as well as to avoid contamination of leachates with soil and sand particles.

Table 6.1.: *Physicochemical properties of the soil.*

	Horizon		
	A	Bg	B2g
Depth (cm)	0-20	20-70	70-100
C _{org} (g C _{org} kg ⁻¹ DW soil)	18.3	9.2	5.0
N (g N kg ⁻¹ DW soil)	2.3	1.2	0.9
NO ₃ ⁻ (mg N kg ⁻¹ DW soil)	0.55	0.24	0.12
NH ₄ ⁺ (mg N kg ⁻¹ DW soil)	0.85	0.39	0.39
pH	7.98	8.37	8.39
Texture			
Clay (%)	28	35	17
Silt (%)	41	32	53
Sand (%)	31	33	29
DW, dry weight.			

The entire column set-up was placed in darkness inside an incubator (half of the leaching columns at 10 °C and the other half at 20 °C). As seen in Figure 6.1., columns were operated during 125 days in a vertical position with rising flow (in order to simulate the natural flow of water coming up from the groundwater towards the wetland) from the NO₃⁻ solution reservoir: a constant flow of 90 mL day⁻¹ (equivalent to 46 mm day⁻¹ of water discharged during an irrigation event on surrounding crop fields) of a helium flushed aqueous solution of 200 mg NO₃⁻ L⁻¹ was used (*i.e.*, the groundwater nitrate content that, from the beginning of the 80s to the early 90s, was frequently measured in the East Sector of the aquifer) (Arrate et al., 1997), in an attempt to reproduce the worst environmental conditions faced by the wetland.

A) Traditional design



B) New design proposed

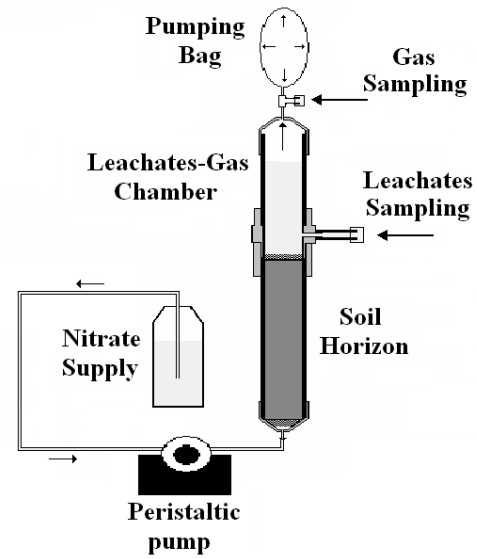


Figure 6.1. Design of leaching assay with undisturbed soil columns.

6.3.3. Leachates analysis

Leachates were collected in the upper chamber of the column, filtered (0.45 µm Whatman filter) and stored at 4 °C in plastic vials until analysis. The following parameters were analysed thrice a week for 18 weeks: NO₃⁻ concentration, NH₄⁺ concentration, and dissolved organic carbon (DOC) according to APHA (2005). Rates of NO₃⁻ removal were calculated according to the following equation:

$$NR = \frac{V \cdot [N_I - N_E] \cdot 0.226}{T \cdot SW} \quad (6.2.)$$

where *NR* = rate of NO₃⁻ removal (mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ DW soil day⁻¹); *V* = volume of leachate sampled at each time; *N_I* = influent nitrate concentration (200 mg NO₃⁻ L⁻¹); *N_E* = effluent NO₃⁻ concentration (mg NO₃⁻ L⁻¹); *T* = time (days); *SW* = soil dry weight (kg); 0.226 = nitrate to nitrogen-nitrate conversion factor.

6.3.4. CO₂ and N₂O emissions

CO₂ and N₂O were determined during the leaching assays (N₂O is an intermediate product of denitrification that can be easily quantified and has more interest than N₂ from an environmental point of view). Gas samples were collected in the upper chamber of the leaching columns with a 1 mL crystal syringe (Supelco) and then CO₂ and N₂O gas composition was analyzed, at the same time than leachates, throughout the experiment with a gas chromatograph (KNK 3000 HRGC; TCD thermal conductivity detector). The packed column used was a Porapak Q 80/100 3 m x 1/8" (Sugelabor). Operation conditions were as follows: column temperature 25 °C, injection temperature 25 °C, detector temperature 150 °C, and He as carrier gas flowing at 16 mL min⁻¹. The amount of CO₂ and N₂O dissolved in the liquid phase was calculated using Henry's Law and then corrected for temperature (Tiedje, 1982).

6.3.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software (SPSS 12 Inc., 2003). A two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare means of the parameters measured here among incubation conditions (10 and 20 °C) and soil horizons. Fisher's PLSD-test was used to establish the significance of the differences among means. Values were considered to be significantly different at a 95% confidence level (P <0.05). Pearson correlation analyses were used to study the relationships between rates of NO₃⁻ removal, and CO₂ and N₂O emissions.

6.4. Results and discussion

6.4.1. Nitrate removal

A considerable removal of NO₃⁻ was observed in all tested columns (Figure 6.2.). Higher rates of NO₃⁻ removal were found in the A-horizon, as compared to Bg- and B2g-horizons, specially during the first 15 days of the leaching assay, indicating a positive relationship between C_{org} and rate of NO₃⁻ removal. Indeed, highest values of NO₃⁻ removal were observed in the A-horizon: 3.99 (8th day) and 2.14 (10th day) mg N-

6. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions from a riparian wetland soil

NO_3^- kg^{-1} DW soil day^{-1} at 20 and 10 °C, respectively. Higher rates of NO_3^- removal were found at 20 than at 10 °C. This NO_3^- removal could in theory be linked with the increase in soil NO_3^- content observed after leaching in all soil horizons (Table 6.2.), owing to physical retention of the input nitrate solution in the soil matrix itself: the original interstitial soil water with a low NO_3^- content would be replaced by the high NO_3^- content ($200 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) input solution. In any event, this phenomenon appears to be somewhat relevant only for B2g-horizons: in B2g-horizons, the observed increase in soil NO_3^- content was equivalent to 11 and 29% of the total amount of NO_3^- removed during the leaching assay at 10 and 20 °C, respectively. Nevertheless, nitrate (a very soluble compound with a negative charge which hinders its adsorption to soil particles) is easily leached with moving water; thus, this physical phenomenon of nitrate attenuation in groundwater is not a nitrate removal mechanism *per se*, but just a temporary nitrate retention in the soil.

Another possible reason for the observed NO_3^- removal could be microbial NO_3^- assimilation (Davidsson et al., 1997). Unfortunately, this phenomenon cannot be properly quantified when using undisturbed soil columns, as the soil contains many roots and other organic residues (>2 mm) which were excluded during the determination of soil physicochemical properties (see Materials and Methods), resulting in a degree of uncertainty in relation to their contribution to the N balance. Apart from the A-horizons at 20 °C (Table 6.2.), the content of N decreased or remained constant in all tested columns, thus ruling out microbial NO_3^- assimilation as a process responsible for the observed NO_3^- removal. In consequence, in A-columns at 20 °C, where the values of N and C_{org} slightly increased (Table 6.2.), the mineralization of particulate organic matter present in the soil could be also providing N for the microbial community. Nevertheless, apart from situations where microbial biomass development is extensive (*e.g.*, following a release of readily biodegradable organic matter into the soil or during very active bioremediation), it is difficult to foresee many cases where soil microorganisms would take up an amount of nitrate that would result in significant changes in soil nitrogen content (Rivett et al., 2008)

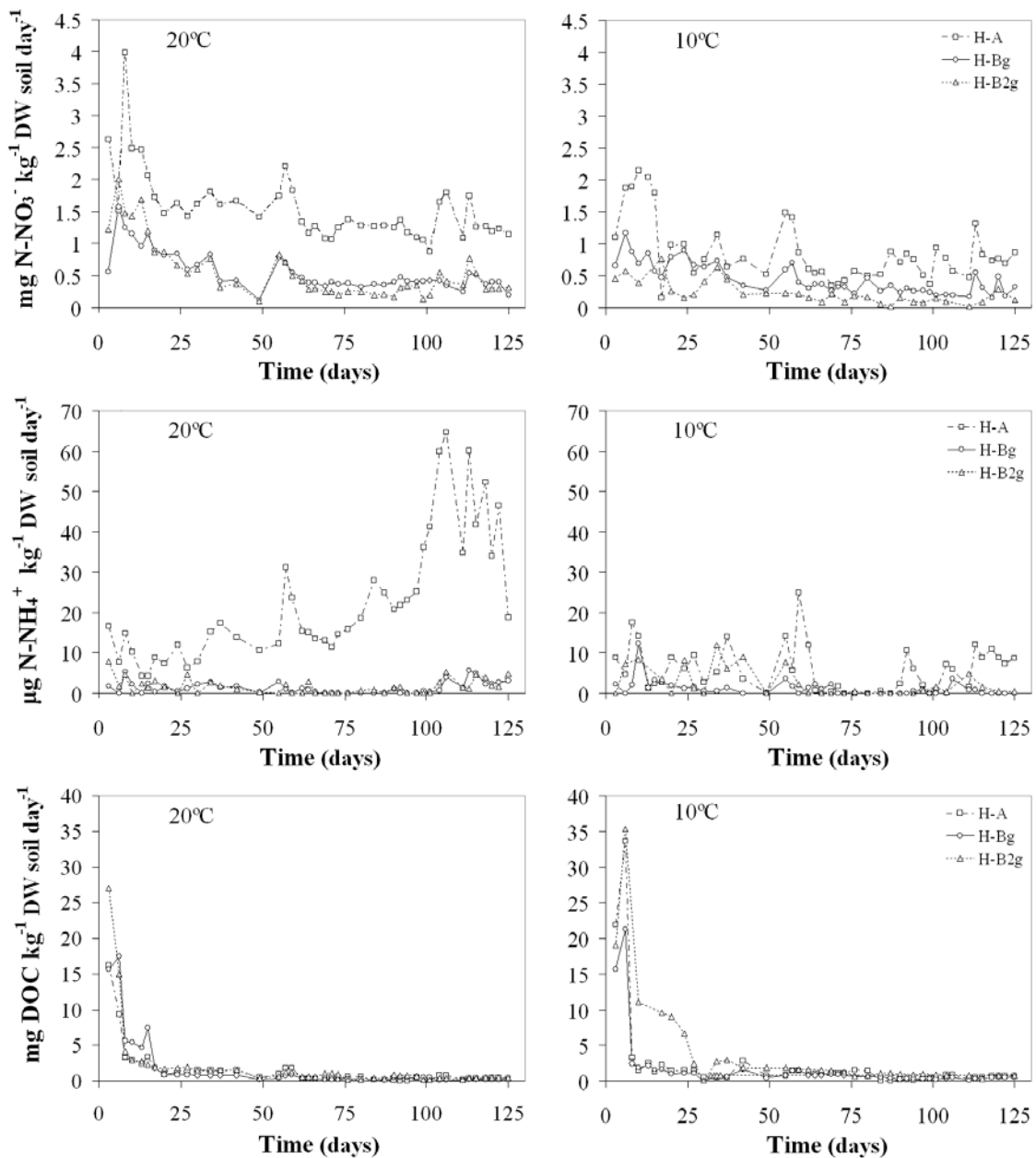


Figure 6.2. Evolution of NO_3^- removal rate, and leaching rates of NH_4^+ and DOC in the horizon leachates throughout the assay (incubation temperatures: 10 and 20 °C; soil horizons: A, Bg and B2g). Mean values ($n=3$) for each soil horizon at each sampling time.

On the other hand, dissimilatory reduction of NO_3^- to NH_4^+ can be carried out by fermentative bacteria that use NO_3^- as a source of electrons (Megoñigal et al., 2004). As a matter of fact, in the presence of abundant C_{org} , this dissimilatory reduction could occur jointly with denitrification under reducing environments. Nonetheless, Yin et al. (1998) reported values $<5\%$ for this dissimilatory reduction in paddy soils of China. In

6. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions from a riparian wetland soil

our study, the presence of NH_4^+ in the column leachates was only relevant in the A-horizons at 10 and 20 °C, as well as in the B2g-horizon at 10 °C (Figure 6.2.). In the A-horizon at 20 °C, a decrease in NH_4^+ leaching rate was observed for the first 15 days of the leaching assay, which might be due to leaching of the NH_4^+ originally present in the soil horizon, as reflected by the decrease in column soil NH_4^+ content (Table 6.2.). Later, in A-horizons at 20 °C, leachate NH_4^+ progressively increased until reaching a maximum value of $64.8 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$ (at 106th day), a fact that could be attributed, at least partially, to reduced use of NH_4^+ for bacterial growth due to scarcity of substrate by the end of the assay (Hefting et al., 2004).

Table 6.2. Increase (positive value) or decrease (negative value) in soil chemical properties at the end of the leaching assay.

Temperature	Horizon	C_{org} (g C_{org} kg^{-1} DW soil)	N (g N kg^{-1} DW soil)	NO_3^- (mg N kg^{-1} DW soil)	NH_4^+ (mg N kg^{-1} DW soil)
10 °C	A	0.15±0.02 ^a	0.00±0.03 ^a	5.97±0.15 ^a	-0.30±0.03 ^a
	Bg	-1.18±0.11 ^b	-0.20±0.00 ^b	6.61±0.21 ^b	-0.18±0.02 ^b
	B2g	-0.29±0.03 ^c	-0.20±0.02 ^b	8.26±0.25 ^c	-0.23±0.03 ^{ab}
20 °C	A	0.29±0.04 ^{a*}	0.20±0.05 ^{a*}	3.47±0.11 ^{a*}	-0.40±0.02 ^{a*}
	Bg	-0.35±0.02 ^{b*}	0.00±0.03 ^{b*}	4.86±0.13 ^{b*}	-0.14±0.01 ^b
	B2g	-0.47±0.05 ^{c*}	-0.30±0.03 ^{c*}	7.38±0.17 ^{c*}	-0.16±0.02 ^b

Mean values ± S.E. (n=3). Values followed by different letters or asterisks are significantly different ($P < 0.05$) according to Fisher's PLSD-test (letters: among soil horizons at the same incubation temperature; asterisks: among incubation temperatures for each soil horizon).

On the whole, highest values of NH_4^+ leaching rate were observed in A-horizons, as compared to Bg- and B2g-horizons, emphasizing the positive relationship between C_{org} and leachate NH_4^+ concentration. If all the NH_4^+ present in the column leachates were due to the abovementioned dissimilatory reduction, the amount of NH_4^+ found in leachates of A-horizon at 20 °C (highest rates of NH_4^+ leaching were detected in these columns) would be equivalent to only 1.39% of the NO_3^- removed from the 200 mg $\text{NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ input nitrate solution. Likewise, the NH_4^+ present in the column leachates could come from microbial ammonification (conversion of soil organic N to NH_4^+), which in theory should be higher in the A-horizon, as compared to Bg- and B2g-

horizons, thus making the contribution of dissimilatory reduction even less important (practically, negligible).

The production of CO₂ and N₂O gas was followed throughout the leaching assays (Figure 6.3.). Highest values of cumulative CO₂ production were observed in A-horizons: maximum values of cumulative CO₂ production of 736.2 and 315.9 mg CO₂ kg⁻¹ DW soil were found at 20 and 10 °C, respectively. In general, the pattern of CO₂ production followed the classical first-order kinetics (Monod, 1949): an initial phase of very active growth for the first 10 days (maximum slopes: 10.08 and 7.51 mg CO₂ kg⁻¹ DW soil day⁻¹ were found in A-horizons at 20 and 10 °C, respectively), followed by slower growth until reaching a plateau.

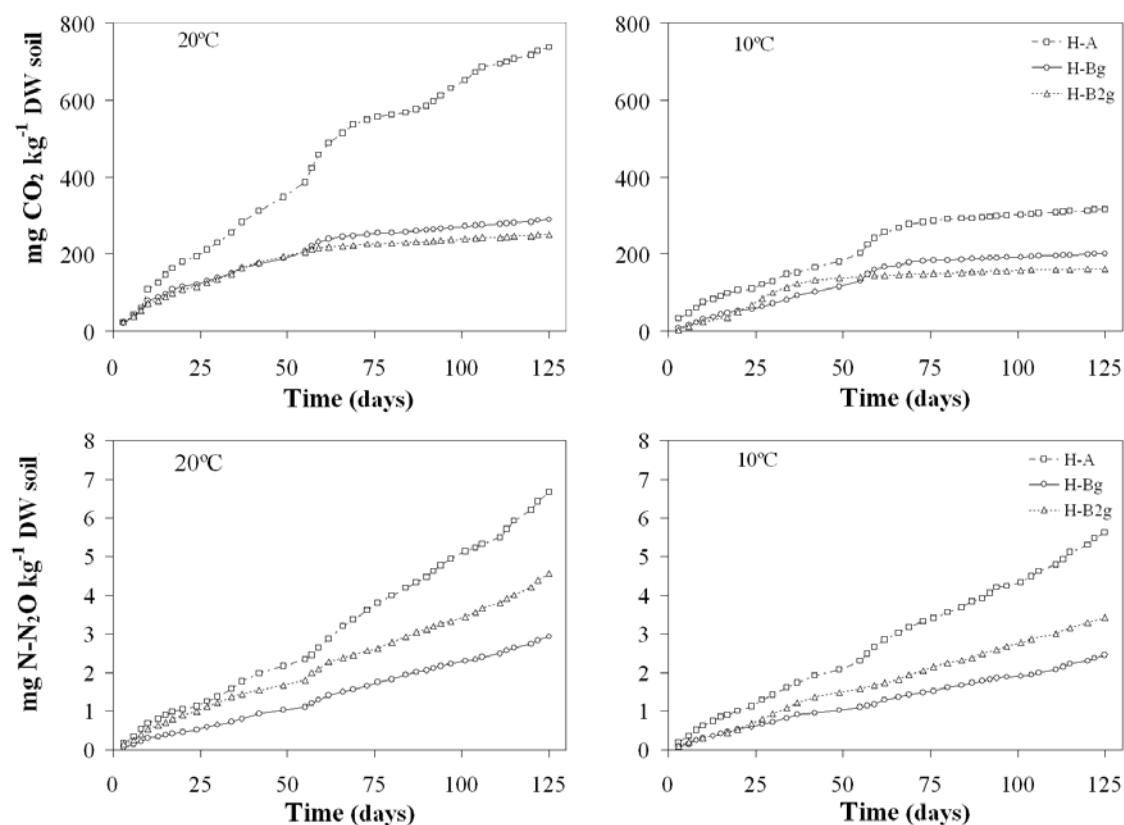


Figure 6.3. Cumulative production of CO₂ and N₂O throughout the leaching assay (incubation temperatures: 10 and 20 °C; soil horizons: A, Bg and B2g). Mean values ($n=3$) for each soil horizon at each sampling time.

On the contrary, cumulative N₂O production followed a linear pattern (Figure 6.3.) throughout the experimental period. Again, highest values of cumulative N₂O production were observed in A-horizons: maximum values of cumulative N₂O

6. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions from a riparian wetland soil

production of 6.67 and 5.63 mg N-N₂O kg⁻¹ DW soil were found at 20 and 10 °C, respectively.

Significant correlations were found between rate of NO₃⁻ removal and CO₂ and N₂O production (Table 6.3.). We carried out an stoichiometric mass balance according to equation “5CH₂O + 4NO₃⁻ + 4H⁺ → 2N₂ + 5CO₂ + 7H₂O”, in order to estimate the expected amount of CO₂ production assuming denitrification as the only cause of NO₃⁻ removal in our columns: estimated average CO₂ production values agreed very closely with those measured in our columns (99.31 and 95.59% of values measured at 20 and 10 °C, respectively). Although these estimations cannot be done for N₂O (as during denitrification NO₃⁻ may end up as both N₂O and N₂), taking into account N₂O/N₂ ratios previously reported (Well et al., 2003; Ruser et al., 2006) and according to our observed values of N₂O production, we estimated a conversion of NO₃⁻ to N₂ of 64 and 78% for columns incubated at 20 and 10 °C, respectively.

Table 6.3. Linear correlation coefficients (*r*) between rates of NO₃⁻ removal, and CO₂ and N₂O emission.

	NO ₃ ⁻	CO ₂	N ₂ O
NO ₃ ⁻	1		
CO ₂	0.767*	1	
N ₂ O	0.686*	0.753*	1

* Significant at 0.05 level of probability; n= 43 measures; NO₃⁻, NO₃⁻ removal rate; CO₂, CO₂ emission rate; N₂O, N₂O emission rate.

Rates of denitrification calculated from values of observed N₂O production were lower than those previously reported for the Salburua wetland by Sánchez-Pérez et al. (2003). However, Sánchez-Pérez et al. (2003) calculated potential denitrification rates using the acetylene blockage technique with no carbon or nitrate limitation for denitrifying communities, while in the present work actual rates of N₂O production were quantified. Our data are in agreement with those of Casey et al. (2004) for denitrification activity in macropores of a riparian wetland, and Davidsson and Ståhl (2000) in wetland soils.

6.4.2. Effect of temperature and C_{org} on denitrification

The activity of denitrifying microorganisms is known to strongly depend on the presence of available C_{org} . Actually, Dahl et al. (2007) proposed the utilization of soil C_{org} as an indicator of denitrification potential when other parameters, such as humidity and presence of NO_3^- , were not limiting. Similarly, the activity of denitrifying microorganisms is temperature-dependent (Dhondt et al., 2004). In our study, the only parameters varying between columns were soil C_{org} and incubation temperature. In this respect, for all soil horizons, during the first 2-3 weeks of leaching, values of DOC leaching rate, a parameter related to both soil C_{org} and incubation temperature, were higher at 10 than at 20 °C (Figure 6.2.). Maximum values of DOC leaching rate were found in B2g horizons: 35.41 and 27.09 mg DOC kg⁻¹ DW soil day⁻¹ at 10 and 20 °C, respectively. Then, unlike most parameters here measured, the higher the amount of C_{org} present in the soil horizon, the lower the DOC leaching rate. McCarty and Bremner (1992) attributed this phenomenon to DOC leaching from the topsoil to deeper soil layers (in our case, this phenomenon would have occurred in the wetland itself before soil column sampling). Regarding temperature, the higher values of DOC leaching rate at 10 *versus* 20 °C can be explained by lower microbial activity at lower temperature, as indicated by Zsolnay and Steindl (1991).

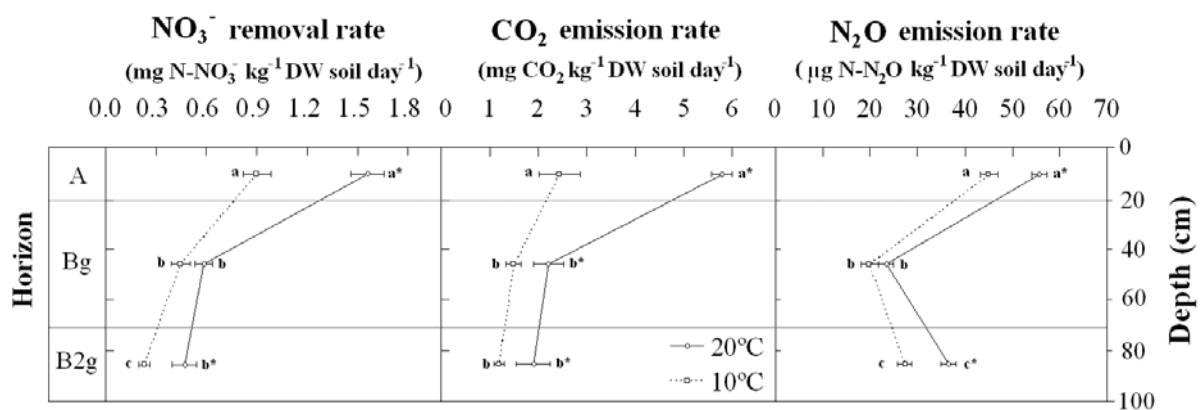


Figure 6.4. Effect of soil horizon on average rates of NO_3^- removal and CO_2 and N_2O emission rates. Mean values \pm S.E. ($n=43$) followed by different letters or asterisks are significantly different for each parameter ($P<0.05$) according to Fisher's PLSD-test (letters: among soil horizons at the same incubation temperature; asterisks: among incubation temperatures for each soil horizon).

6. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions from a riparian wetland soil

Likewise, the higher the amount of C_{org} present in the soil horizon, the higher the average rates of NO_3^- removal and CO_2 emission (Figure 6.4.). Highest and lowest average rates of N_2O emission were found in A- and Bg-horizon, respectively.

At 20 °C, the average rate of NO_3^- removal was 62 and 70% higher in A-horizons *versus* Bg- and B2g-horizons, respectively. At 10 °C, the average rate of NO_3^- removal was 50 and 74% higher in A-horizons *versus* Bg- and B2g-horizons, respectively. Finally, the average rate of NO_3^- removal was 42, 24 and 51% lower in A-, Bg- and B2g-horizons, respectively, at 10 *versus* 20 °C. Furthermore, it was found that the higher the average rate of NO_3^- removal, the lower the amount of soil NO_3^- content present in the column (Table 6.2.); this phenomenon was more accentuated at 10 than at 20 °C.

The effect of temperature was more pronounced in A-horizons, as compared to Bg- and B2g-horizons: average CO_2 emission rates were 57, 30 and 36% lower in A-, Bg-, and B2g-horizons, respectively, at 10 than at 20 °C.

Regarding N_2O , a different pattern was observed (Figure 6.4.): for instance, at 20 °C, average rates of N_2O emission in A-horizons were 58 and 35% higher than in Bg- and B2g-horizons, respectively. The low solubility of N_2O gas in water might negatively affect its diffusion and transport from the column soil to the leachate-gas chamber. Šimek et al. (2004) found that values of N_2O concentration in the pores of column soil were higher than values of N_2O emission, suggesting an accumulation of this gas in the soil pores. In our study, Bg-horizons were longer than A- and B2g-horizons (A-horizons: 20 cm; Bg-horizons: 50 cm; B2g-horizons: 30 cm) and, consequently, subjected *a priori* to more diffusion barriers, which could explain the lower values of N_2O emission in Bg-horizons *versus* B2g-horizons, despite having higher values of C_{org} and average NO_3^- removal rates. Besides, the solubility of N_2O in water is 25% higher at 10 than at 20 °C, which could also influence the observed values of N_2O production at 10 and 20 °C. Finally, some authors (Avalakki et al., 1995) have found that, during denitrification, the lower the temperature the higher the N_2O/N_2O+N_2 ratio, as the reduction of N_2O to N_2 has a higher activation energy than the production of N_2O .

6.4.3. Application to *Salburua wetland*

Our results are in agreement with the nitrate removal rates reported for *Salburua* by other authors (García-Linares et al., 2003; Sánchez-Pérez et al., 2003) and highlight the key role that denitrification plays in the NO_3^- removal observed in the *Salburua* riparian soil.

Considering the rate of NO_3^- removal observed in B2g-horizon at 10 °C (in our study area, average annual groundwater temperature is 10.2 °C; piezometric level = 85 cm), and a soil bulk density of 1200 kg m⁻³, we estimated a maximum nitrate removal capacity of 1011.8 kg N- NO_3^- ha⁻¹ year⁻¹, which is slightly higher than those previously reported by other authors for riparian soils (Leonardson et al., 1994; Hefting et al., 2006; Wang et al., 2009).

The groundwater nitrate loss taking place in *Salburua* indicates that the natural nitrate removal capacity of the wetland exceeds nitrate inputs; thus, despite NO_3^- content in the groundwater entering the wetland being > 50 mg NO_3^- L⁻¹, values of NO_3^- content in the water leaving the wetland are frequently below detection limit.

However, nitrate removal by denitrification results in the emission of significant amounts of greenhouse gases. According to rates for B2g-horizon at 10 °C, we estimated maximum emissions of 5620 kg CO₂ ha⁻¹ year⁻¹ and 240 kg N-N₂O ha⁻¹ year⁻¹. N₂O emissions agreed with those reported by Machefert et al. (2004) in two riparian ecosystems draining different agricultural fields. CO₂ emissions, however, were significantly lower than those observed by Tufekcioglu et al. (2004) in vegetated riparian buffer zones. In our study, N₂O emissions were one order of magnitude lower than CO₂ emissions. In terms of equivalent emissions of CO₂ and according to the N₂O-CO₂ conversion factor proposed by IPCC (2001), our N₂O emissions correspond to 113.07 t CO₂ equivalent ha⁻¹ year⁻¹.

These estimated greenhouse gas emission rates highlight the environmental interest of the *Salburua* wetland (and similar riparian wetlands): the riparian zone of the *Salburua* wetland removes, *via* denitrification, a considerable amount of NO_3^- from the polluted groundwater (NO_3^- pollution of agricultural origin) with a concomitant local beneficial effect on the quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz; unfortunately, during the process of NO_3^- removal, a significant production of greenhouse gases (CO₂ and N₂O)

does occur, with negative consequences at a global scale (*i.e.*, climate change). This represents a paradoxical example of how large-scale wetland and riparian restoration efforts to reduce NO_3^- delivery to water streams and improve water quality, may significantly affect regional and global CO_2 and N_2O budgets.

6.5. Conclusions

The new experimental design for leaching assays with undisturbed soil columns here proposed has proven most useful when groundwater flow (rising flow to simulate the natural flow of water coming up from the groundwater towards the wetland) wants to be simulated under different environmental conditions (temperature, soil C_{org}) and the composition of leachates and gases, as well as changes in soil physicochemical properties, needs to be determined.

It was concluded that the Salburua wetland riparian zone can remove considerable amounts of NO_3^- from polluted groundwater through denitrification. Higher denitrification rates were found at 20 than at 10 °C. It was observed that the higher the amount of C_{org} in the soil horizon, the higher the NO_3^- removal rate (higher values of NO_3^- removal were found in A-horizons *versus* Bg- and B2g-horizons). During denitrification, considerable amounts of N_2O and CO_2 were emitted to the atmosphere, with concomitant negative consequences for the environment. When considering the beneficial effect provided by Salburua wetland in terms of NO_3^- removal from polluted groundwater (NO_3^- pollution of agricultural origin) *via* denitrification, it is essential to always take into consideration the environmentally-negative emission of greenhouse gases coming from denitrification.

Further research on the transformation processes of pollutants of agricultural origin occurring in different ecosystems is needed. In this respect, more sustainable agricultural practices must be urgently promoted in an attempt to find a compromise between crop yield and environmental health.

6.6. References

- APHA (American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation). In: Eaton AE, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AE, editors. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (21st edition). American Public Health Association, Washington DC, 2005.
- Arrate, I., Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., Vallecillo, M.A., Iribar, V., Ruiz, M., 1997. Groundwater pollution in quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, Spain). *Environmental Geology* 30, 257-265.
- Avalakki, U.K., Strong, W.M., Saffigna, P.G., 1995. Measurement of gaseous emissions from denitrification of applied nitrogen⁻¹⁵. II. Effects of temperature and added straw. *Australian Journal of Soil Research* 33, 89-99.
- Casey, R.E., Taylor, M.D., Klaine, S.J., 2004. Localization of denitrification activity in macropores of a riparian wetland. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 563-569.
- Dahl, M., Nilsson, B., Langhoff, J.H., Refsgaard, J.C., 2007. Review of classification schemes and new multi-scale typology of groundwater-surface water interaction. *Journal of Hydrology* 344, 1-16.
- Davidsson, T.E., Stepanauskas, R., Leonardson, L., 1997. Vertical patterns of nitrogen transformations during infiltration in two wetland soils. *Applied Environmental Microbiology* 63, 3648-3656.
- Davidsson, T.E., Ståhl, M., 2000. The influence of organic carbon on nitrogen transformations in five wetland soils. *Soil Science Society of America Journal* 64, 1129-1136.
- Dhondt, K., Boeckx, P., Hofman, G., Van Cleemput, O., 2004. Temporal and spatial patterns of denitrification enzyme activity and nitrous oxide fluxes in three adjacent vegetated riparian buffer zones. *Biology and Fertility of Soils* 40, 243-251.
- Egiarte, G., Camps Arbestain, M., Ruíz-Romera, E., Pinto, M., 2006. Study of the chemistry of an acid soil column and of the corresponding leachates after the addition of an anaerobic municipal sludge. *Chemosphere* 65, 2456-2467.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bejunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A., 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320, 889-892.
- García-Linares, C., Martínez-Santos, M., Martínez-Bilbao, V., Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., 2003. Wetland restoration and nitrate reduction: the example of the peri-urban wetland of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, North Spain). *Hydrology and Earth System Science* 7, 109-121.
- Groffman, P.M., Altabet, M.A., Böhlke, J.K., Butterbach-Bahl, K., David, M.B., Firestone, M.K., Giblin, A.E., Kana, T.M., Nielsen, L.P., Voytek, M.A., 2006. Methods for

6. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions from a riparian wetland soil

measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications* 16, 2091-2122.

Hefting, M., Clément, J.C., Dowrick, D., Cosandey, A.C., Bernal, S., Cimpian, C., Tatur, A., Burt, T.P., Pinay, G., 2004. Water table elevation controls on soil nitrogen cycling in riparian wetlands along a European climatic gradient. *Biogeochemistry* 67, 113-134.

Hefting, M., Beltman, B., Karssenbergh, D., Rebel, K., Van Riessen, M., Spijke, M., 2006. Water quality dynamics and hydrology in nitrate loaded riparian zones in the Netherlands. *Environmental Pollution* 139, 143-156.

Hill, A.R., Devito, K.J., Campagnolo, S., Sanmugadas, K., 2000. Subsurface denitrification in a forest riparian zone: Interactions between hydrology and supplies of nitrate and organic carbon. *Biogeochemistry* 51, 193-223.

Höring, H., Chapman, D. Nitrates and Nitrites in Drinking Water. In: World Health Organization Drinking Water Series. London: IWA Publishing; 2004.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). *Climate Change 2001: the scientific basis*. In: Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, Van der Linden PJ, editors. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, United Kingdom and New York, 2001.

Jørgensen, P.T., Urup, J., Helstrup, T., Jensen, M.B., Eiland, F., Vinther, F.P., 2004. Transport and reduction of nitrate in clayey till underneath forest and arable land. *Journal of Contaminant Hydrology* 73, 207-226.

Leonardson, L., Bengtsson, L., Davidsson, T., Persson, T., Emmanuelsson, U., 1994. Nitrogen retention in artificially flooded meadows. *Ambio* 23, 332-341.

Lewis, J., Sjöström, J., 2010. Optimizing the experimental design of soil columns in saturated and unsaturated transport experiments. *Journal of Contaminant Hydrology* 115, 1-13.

Liu, L., Greaver, T.L., 2009. A review of nitrogen enrichment effects on three biogenic GHGs: the CO₂ sink may be largely offset by stimulated N₂O and CH₄ emission. *Ecology Letters* 12, 1103-1117.

Machefert, S.E., Dise, N.B., Goulding, K.W.T., 2004. Whitehead PG. Nitrous oxide emissions from two riparian ecosystems: key controlling variables. *Water Air and Soil Pollution: Focus* 4, 427-436.

McCarty, G.W., Bremner, J.M., 1992. Availability of organic carbon for denitrification of nitrate in subsoils. *Biology and Fertility of Soils* 14, 219-222.

Megonigal, J., Hines, M., Visscher, P. Anaerobic metabolism: linkages to trace gases and aerobic processes. In: Schlesinger WH, editor. *Biogeochemistry*. United Kingdom: Elsevier-Pergamon; 2004.

Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews of Microbiology* 3, 371-394.

- Pauwels, H., Talbo, H., 2004. Nitrate concentration in wetlands: assessing the contribution of deeper groundwater from anions. *Water Research* 38, 1019-1025.
- Ranalli, A.J., Macalady, D.L., 2010. The importance of the riparian zone and in-stream processes in nitrate attenuation in undisturbed and agricultural watersheds - A review of the scientific literature. *Journal of Hydrology* 389, 406-415.
- Rivett, M.O., Buss, S.R., Morgan, P., Smith, J.W.N., Bemment, C.D., 2008. Nitrate attenuation in groundwater: A review of biogeochemical controlling processes. *Water Research* 42, 4215-4232.
- Ruser, R., Flessa, H., Schilling, R., Beese, F., Munch, J.C., 2006. Effect of crop type-specific soil management and N fertilization on N₂O emissions from a fine-loamy soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 59, 177-191.
- Sánchez-Pérez, J.M., Iribar, A., Martínez, M., García-Linares, C., Antigüedad, I., Eliminación de nitratos por desnitrificación en la zona no saturada del suelo en un humedal del cinturón peri-urbano de Vitoria-Gasteiz. In: Álvarez-Benedí J, Marinero P, editors. *Estudios de la Zona no Saturada del Suelo VI*. Valladolid; 2003. p. 385-390.
- Šimek, M., Elhottová, D., Klimeš, F., Hopkins, D.W., 2004. Emissions of N₂O and CO₂, denitrification measurements and soil properties in red clover and ryegrass stands. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 9-21.
- Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnson, C.T., Sumner, M. *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*. Soil Science Society of America Book Series, Madison, WI; 1996.
- Tiedje, J.M., 1982. Denitrification. In Page AL, Miller RH, Keeney DR, editors. *Methods of Soil Analysis Part 2*. ASA and SSSA, Madison, WI. 1982. p. 1011-1026
- Tufekcioglu, A., Raich, J.W., Isenhardt, T.M., Schultz, R.C., 2004. Soil respiration within riparian buffers and adjacent crop fields. *Plant and Soil* 229, 117-124.
- Wang, X., Yang, S., Mannaerts, C.M., Gao, Y., Guo, J., 2009. Spatially explicit estimation of soil denitrification rates and land use effects in the riparian buffer zone of the large Guanting reservoir. *Geoderma* 150, 240-252.
- Well, R., Augustin, J., Meyer, K., Myrold, D.D., 2003. Comparison of field and laboratory measurement of denitrification and N₂O production in the saturated zone of hydromorphic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 783-799.
- Yin, S.X., Shen, Q., Tang, Y., Cheng, L.M., 1998. Reduction of nitrate to ammonium in selected paddy soils of China. *Pedosphere* 8, 221-228.
- Zhao, T., Xu, H., He, Y., Tai, C., Meng, H., Zeng, F., Xing, M., 2009. Agricultural non-point nitrogen pollution control function of different vegetation types in riparian wetlands: A case study in the Yellow River wetland in China. *Journal of Environmental Science* 21, 933-939.

6. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions from a riparian wetland soil

Zsolnay, A., Steindl, H., 1991. Geovariability and biodegradability of the water-extractable organic material in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 1077-1082.

7

- 7.1. Abstract
- 7.2. Introduction
- 7.3. Materials and methods
- 7.4. Results and discussion
- 7.5. Conclusions
- 7.6. References

Results and discussion III:

Deltamethrin degradation and soil microbial activity in a riparian wetland soil

“Aquel que duda y no investiga, se torna no sólo infeliz, sino también injusto”

Blaise Pascal (1623-1662)

7. Deltamethrin degradation and soil microbial activity in a riparian wetland soil

Published in Soil Science 174, 220-228 (2009).

7.1. Abstract

The effects of deltamethrin, in the presence and absence of nitrate, on soil microbial activity (as reflected by the rates of soil microbial basal respiration, denitrification and methanogenesis) were studied in a riparian wetland soil under both aerobic and anaerobic conditions. A microcosm study was carried out with soil collected from the vicinity of a wetland which was then artificially amended with 50, 125 and 250 mg deltamethrin kg⁻¹ DW soil, in the presence and absence of 20 mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ DW soil. Half-life values for deltamethrin degradation ranged from 27 to 291 days, depending on experimental conditions. Nitrates had an inhibitory effect on deltamethrin degradation. Deltamethrin, under anaerobiosis, had an inhibitory effect on soil respiration; this effect was reversed in the presence of nitrate. An antagonistic effect between deltamethrin degradation and denitrification activity was observed. In the

presence of nitrate, the activation of denitrifying bacteria led to competitive inhibition of methanogens. It was concluded that deltamethrin, designed to affect specific functions of its target organisms, also has an effect on non-target organisms, *i.e.* the soil microbial community. To our knowledge, this is the first report on the degradation and environmental impact of deltamethrin in a riparian wetland soil.

7.2. Introduction

The extensive use of agricultural chemicals is of great concern because of, among other reasons, the potential for contamination of surface water and groundwater, with concomitant negative effects on human health and the environment (Pavel et al., 1999). Certainly, the impact of agricultural practices on water quality is well-known, with nitrates and pesticides being highlighted as major contaminants (Ritter et al., 1990; Bernhard et al., 1992; Arrate et al., 1997; Böhlke et al., 2002). Likewise, the biogeochemical functioning of riparian wetlands in removing nitrates from waters has previously been reported (Burt et al., 1999; Mengis et al., 1999; Gold et al., 2001). In this respect, while the fate and retention of nutrients, such as phosphates and nitrates, in wetlands are reasonably well-understood, the same cannot be claimed for agrochemicals (Baker, 1993) with only a few published studies so far focusing on the potential of riparian wetlands to remove pesticides (Wolverton and Harrison, 1975; Kadlec and Hey, 1994). However, although pesticides are usually applied to well aerated agricultural fields, significant amounts can potentially end up in anaerobic habitats such as riparian wetlands (Pavel et al., 1999). Riparian wetlands bordering agricultural fields have been reported to be responsible for preserving water quality by acting as biological filters (Pavel et al., 1999).

Deltamethrin [(S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate] is a pyrethroid insecticide, largely used as an acaricide and scabicide, that impedes the proper functioning of sodium channels in cell membranes and interacts with gamma aminobutyric acid receptors, thus causing a disruption of nerve signals (Ecobichon, 1991). Deltamethrin's affinity for soils is relatively high, with a half-life in soil ranging from 11-72 days, according to conditions and temperature (Roberts, 1998; Zhu and Selim, 2002; Selim and Zhu, 2002). This

pyrethroid has been reported to be readily degraded by microorganisms in soil and its degradation products to be less toxic than deltamethrin itself (Ruzo et al., 1977).

The effect of pesticides, such as deltamethrin, on soil health is of paramount importance. After all, soils are one of our most valuable natural resources, whose health (defined as “the continued capacity of soil to function as a vital living system, within ecosystem and land-use boundaries, to sustain biological productivity, promote the quality of air and water environments, and maintain plant, animal and human health”) (Doran and Safley, 1997) is currently threatened by land use changes, unsustainable forms of agriculture, climate change, pollution, salinization, compaction and so forth. In this context, relevant indicators are urgently needed to assess and monitor soil health (Alkorta et al., 2003). Although to date, emphasis has been placed on physicochemical soil properties, biological indicators of soil health, especially those related to the activity, size and diversity of soil microbial communities, are becoming increasingly used due to their sensitivity, quick response, and capacity to provide information that integrates many environmental factors (Hernández-Allica et al., 2006; Mijangos et al., 2006). Microbial responses have been recommended as an early warning indicator of ecosystem stress because of quick response to changes in environmental conditions (e.g., toxicant exposure) (Burton, 1991).

Soil microbial activity can be measured through the determination of microbial basal respiration (ISO 16072 Norm, 2002). Likewise, bacterial denitrification is a process of considerable ecological importance in soil which involves the dissimilatory reduction of nitrate (NO_3^-) or nitrite (NO_2^-) to nitrous oxides (NO , N_2O) and dinitrogen gas (N_2) (Paine, 1981; Sáez et al., 2003). In turn, methanogenesis (the biological production of methane, CH_4 , carried out by a highly specialized group of obligate anaerobic Archaea, the methanogens) is also a process of considerable microbiological interest in many localized situations such as waterlogged soils in which anaerobic microbial metabolism is favoured. Although a few other substrates can be converted to CH_4 (e.g., methanol, formate, methyl mercaptan, acetate, methylamines), most methanogens use CO_2 as their terminal electron acceptor in anaerobic respiration, with generally hydrogen, H_2 , acting as the electron donor (Brock et al., 1994).

The main objective of the current study was to investigate (i) the degradation rate of different concentrations of deltamethrin in soil, under both aerobic and anaerobic conditions, and (ii) the effects of these deltamethrin concentrations on soil microbial activity, as reflected by the rates of soil microbial basal respiration, denitrification and methanogenesis, in a riparian wetland soil declared as Vulnerable Zone to pollution by nitrate of agricultural origin according to Nitrate Directive 91/676/EEC. The effect of nitrate on deltamethrin degradation and soil microbial activity was also studied. Although, in the literature, many studies can indeed be found on the degradation of pesticides in soil (Rice et al., 2002; Singh et al., 2002; Suzuki et al., 2006; Kodaka et al., 2007), to our knowledge, this is the first report on the degradation and environmental impact of deltamethrin in a riparian wetland soil.

7.3. Materials and methods

7.3.1. Soil characterization and experimental design

A short-term (2 months) microcosm study was carried out with a composite soil sample, prepared from 14 different sub-samples, collected from the top layer (0-20 cm) of a 200 m² area located in the vicinity of the Zurbano pool (Salburua wetland, Vitoria-Gasteiz, Spain). The Salburua wetland is located within the East Sector of the quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz (42° 51' 36.83'' N – 2° 37' 51.54'' W) and, in 1999, was declared by the Basque Government as Vulnerable Zone to pollution by nitrate of agricultural origin according to Nitrate Directive 91/676/EEC. This quaternary aquifer is a well documented example of degradation of water quality due to various land transformations and intensive agriculture (Arrate et al., 1997; García-Linares et al., 2003; Sánchez-Pérez et al., 2003), with the Salburua wetland acting as a riparian buffer zone most effective in reducing the concentration of nutrients (e.g., nitrates) in the water (Arrate et al., 1997; García-Linares et al., 2003). Previous studies have shown that the physicochemical characteristics of the Salburua wetland non-saturated soil are conducive to the activity of denitrifying bacteria, i.e. a noteworthy clay cover, a very low hydraulic gradient and, finally, a high content of soil organic matter (Sánchez-Pérez et al., 1995; Sánchez-Pérez et al., 2003).

The soils are of a Chernozem calcic character (FAO). Collected soil samples correspond to the A horizon, which has a brownish black colour, clay-sandy texture and abundant fine size roots. Immediately after collection, the soil was homogenized, sieved to <2 mm, air-dried at 20 °C for 48 h, and subjected to physicochemical characterization according to Sparks et al. (1996) (Table 7.1.). Likewise, the soil was analysed for presence of pesticides (Table 7.2.), finding out that all tested pesticides were below detection limits.

Table 7.1. Physicochemical properties of the soil.

Parameter	Units	Magnitude
pH _w (1:2.5 w/v; in water)	Adimensional	8.3
Org. C	(g kg ⁻¹)	1.7
Total N	(g kg ⁻¹)	2.6
C/N	Adimensional	7.5
Mineral N		
NO ₃ ⁻	(mg N kg ⁻¹)	0.55
NH ₄ ⁺	(mg N kg ⁻¹)	0.85
Olsen P	(mg kg ⁻¹)	28.8
Ca ²⁺	(mg kg ⁻¹)	6162
Mg ²⁺	(mg kg ⁻¹)	205.4
K ⁺	(mg kg ⁻¹)	347.7
Na ⁺	(mg kg ⁻¹)	23.2
Electrical conductivity	(dS m ⁻¹)	0.18
Active limestone	(%)	8.8
Total carbonates	(%)	27.1
Texture		
Sand	(%)	29.8
Clay	(%)	38.7
Silt	(%)	31.5

Subsequently, the soil was artificially amended with 50 (C1), 125 (C2) and 250 (C3) mg deltamethrin kg⁻¹ dry weight (DW) soil (deltamethrin solutions were prepared using hexane as solvent). In order to establish percentage recovery, deltamethrin (purity ≥ 99%, D+S Oabe, Orozko, Spain) concentration in the amended soil samples was determined, finding out a 79, 75 and 93% recovery for the 50, 125 and 250 mg deltamethrin kg⁻¹ amended soils, respectively, with a confidence interval of 99%

($P < 0.01$). Half of the soil samples were also amended with 20 mg $\text{N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ DW soil as KNO_3 . Control non-amended soils were also included in the experiment.

Table 7.2. Pesticide active ingredients analysed in the soil.

Detection limit ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Compound
3.0	simazine
	nuarimol
	pyridaphenthion
	bromopropylate
	terbutilazine
	deltamethrin
	metylparathion
	kresoxim-methyl
	fludioxinil
	phenitrothion
	malathyon
	ethylparathion
	cyprodinil
	penconazole
	procymidone
pyrifenox	
5.0	lindane
	clorpyrifos-methyl
	vinclozolin
10.0	fenhexamide

7.3.2. Soil microbial parameters

Under aerobic conditions, the rate of soil microbial basal respiration was measured using 500 mL airtight glass jars, containing 25 g DW soil (distilled water was added until reaching 75% of the soil's water holding capacity), which were hermetically closed and incubated in the dark at 20 °C, according to ISO 16072 Norm (2002). Within the jars, a beaker containing 10 mL of 0.2 N NaOH was placed in order to trap the

evolving CO₂. At sampling times (after 2, 15, 28 and 58 days of incubation), the remaining NaOH in the beaker was titrated with 0.1 N HCl.

Under anaerobic conditions, the rates of soil microbial basal respiration, denitrification and methanogenesis were determined. For this purpose, 120 mL airtight serum glass vials containing 25 g DW soil (as above, distilled water was added until reaching 75% of the soil's water holding capacity) were initially flushed with helium gas during 15 minutes to ensure complete removal of oxygen from the vials (oxygen concentration in the vials was below detection limits at time 0) and then incubated in the dark at 20 °C. At sampling times (after 2, 15, 28 and 58 days of incubation), the gas phase composition (CO₂, N₂O, N₂ and CH₄) inside the vials was measured by gas chromatography (KNK 3000 HRGC) using a thermal conductivity detector and a Porapak Q 80/100 3 m x 1/8" (Sugelabor) packed column. Operation conditions were as follows: column temperature 25 °C; injection temperature 25 °C; detector temperature 150 °C; helium as carrier gas at a flow rate of 16 mL min⁻¹.

Two sets of 48 soil samples (one set in 500 mL airtight glass jars for aerobic conditions; the other set in 120 mL airtight serum glass vials for anaerobic conditions) were used in this study. As abovementioned, half of the soil samples contained 20 mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ DW soil. Therefore, four treatments were included in this study (24 soil samples per treatment): (1) aerobic without nitrate; (2) aerobic with nitrate; (3) anaerobic without nitrate; and (4) anaerobic with nitrate. Within each treatment, 4 different deltamethrin concentrations were used (*i.e.*, 6 replicates per treatment and deltamethrin concentration): 0 (control), C1, C2 and C3 (see above). Data on gas phase composition within the vials after 2 and 15 days of incubation correspond to mean values from these 6 replicates. In the second, third and fourth sampling times (*i.e.*, after 15, 28 and 58 days of incubation), immediately after analysis of gas phase composition, two soil samples per treatment and deltamethrin concentration were used for the determination of pesticide concentration in soil. Consequently, data on gas phase composition after 28 and 58 days of incubation correspond to mean values from 4 and 2 replicates, respectively.

7.3.3. Statistical analysis

Under aerobic and anaerobic conditions, differences among treatments were analyzed by two-ways analysis of variance (ANOVA) with SPSS 16.0 software (SPSS Inc, 2008), verifying the main effects of deltamethrin concentration, nitrate amendment, and their corresponding two-way interactions. Fisher's PLSD-test was used to establish the significance of the differences among means. All tests were performed at a 95% confidence level ($P < 0.05$). Mean values \pm standard error ($n = 6$ at 2 and 15 days of incubation; $n = 4$ at 28 days of incubation; $n = 2$ at 58 days of incubation) of soil microbial parameters from data on gas phase composition are shown in Tables 7.4.-7.7. Mean values \pm standard error ($n = 2$) of soil deltamethrin concentration are shown in Figure 7.1.

7.4 Results and discussion

7.4.1 Deltamethrin degradation

For the three concentrations here used (C_1 , C_2 , C_3), deltamethrin degradation curves, under both aerobic and anaerobic conditions, in the absence and presence of nitrate, are shown in Figure 7.1. Biodegradation models are frequently based on saturation kinetics (Monod, 1949; Copeland, 1996; Kovárová-Kovar and Egli, 1998).

In Baskaran et al. (1999), data on pyrethroids degradation rates were fitted to a classical first-order rate equation [i.e., $DC(t) = DC(t_0) e^{-kt}$, where $DC(t)$ = pesticide concentration at t time; $DC(t_0)$ = pesticide concentration at t_0 time, and k = kinetic constant]. Rates of pesticide degradation in soil, however, do not always follow simple first-order kinetics (mono-phasic or one-compartment kinetics), but show a bi-phasic (two-compartment) pattern where, after an initial rapid decline, soil pesticide concentration decreases slowly, persisting at low levels for a very long time. A number of empirical non-linear equations and mechanistic models to describe bi-phasic degradation patterns can be found in the literature. In this respect, Leake et al. (1995) compared the results of a variety of curve fitting tools and models used to estimate pesticide half-life, finding out large differences among them. Some approaches to describe non-linear declines of pesticide concentration in soil include bi-exponential

7. Deltamethrin degradation and soil microbial activity in a riparian wetland soil

kinetics [i.e., $DC(t) = Ae^{-k_1t} + Be^{-k_2t}$, where $DC(t)$ = pesticide concentration at t time; A and B = constants; k_1 and k_2 = kinetic constants for the first and second component of the curve, respectively; and t = time].

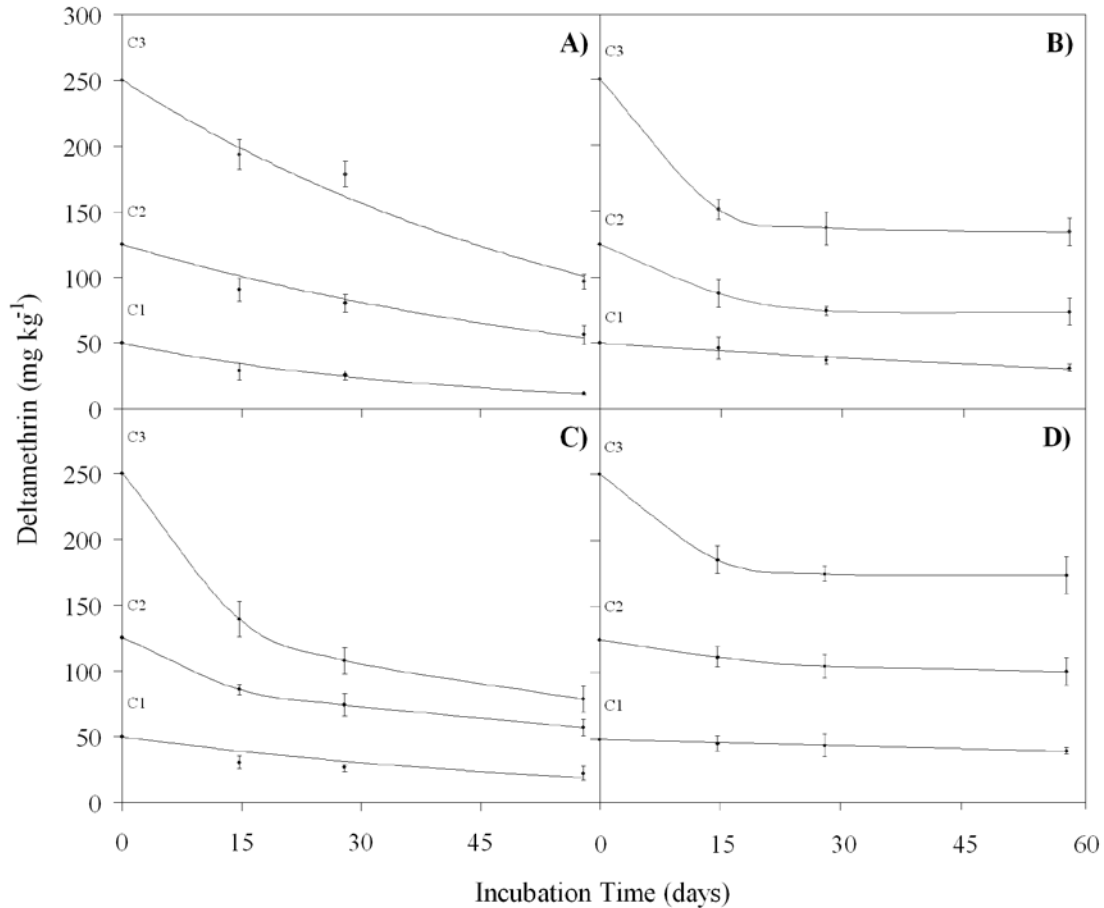


Figure 7.1. Deltamethrin degradation curves: (A) aerobic without nitrate; (B) aerobic with nitrate; (C) anaerobic without nitrate; and (D) anaerobic with nitrate.

As seen in Figure 7.1., rates of deltamethrin degradation were faster at the beginning of the experiment and then decreased as the incubation progressed, probably due to decreasing availability of deltamethrin as time passed. Then, the bi-exponential kinetics model fitted more accurately to data points on soil deltamethrin degradation, as compared to the classical first-order rate equation which proved suitable only for data on aerobic deltamethrin degradation without nitrate and for C1 under aerobic conditions with nitrate (Table 7.3.).

Table 7.3. Kinetic parameters of deltamethrin degradation, in the absence and presence of nitrate, under both aerobic and anaerobic conditions.

Deltamethrin concentration	Aerobic Conditions					
	Without nitrate		With nitrate			
	kinetic	$t_{1/2}$ (days)	r^2	kinetic	$t_{1/2}$ (day s)	r^2
C ₁	$DC(t) = 50 \cdot \exp^{-0.0254t}$	27.4	0.972	$DC(t) = 50 \cdot \exp^{-0.0086t}$	80.6	0.978
C ₂	$DC(t) = 125 \cdot \exp^{-0.0145t}$	47.8	0.957	$DC(t) = 89.1 \cdot \exp^{-0.0037t} + 35.9 \cdot \exp^{-31.67t}$	95.9	0.981
C ₃	$DC(t) = 250 \cdot \exp^{-0.0156t}$	44.4	0.975	$DC(t) = 151.4 \cdot \exp^{-0.0023t} + 98.6 \cdot \exp^{-82.09t}$	83.5	0.998

Deltamethrin concentration	Anaerobic Conditions					
	Without nitrate		With nitrate			
	kinetic	$t_{1/2}$ (days)	r^2	kinetic	$t_{1/2}$ (day s)	r^2
C ₁	$DC(t) = 31.2 \cdot \exp^{-0.0061t} + 18.8 \cdot \exp^{-16.33t}$	37.5	0.977	$DC(t) = 49.0 \cdot \exp^{-0.0029t} + 1.0 \cdot \exp^{-17.62t}$	210	0.986
C ₂	$DC(t) = 100.2 \cdot \exp^{-0.0096t} + 93.4 \cdot \exp^{-32.10t}$	49.3	0.989	$DC(t) = 30.8 \cdot \exp^{-0.0371t} + 95.2 \cdot \exp^{-0.0003t}$	253	0.965
C ₃	$DC(t) = 167.8 \cdot \exp^{-0.0135t} + 82.2 \cdot \exp^{-31.83t}$	21.8	0.998	$DC(t) = 188.0 \cdot \exp^{-0.0014t} + 62.0 \cdot \exp^{-96.61t}$	291	0.994

Similar results were obtained by Lee et al. (2004) in their study on the microbial degradation of pyrethroids in aqueous and sediment phases, where degradation of bifenthrin (which belongs to the same chemical group as deltamethrin) consisted of a rapid initial phase and a slow or stagnant second phase. The authors attributed this progressive decrease in the degradation rate to different adsorption sites or increased sorption over time after bifenthrin was added, with microorganisms being able to use the pesticide as carbon source for growth only at the beginning of the experiment, when a fraction of the added bifenthrin was in the dissolved phase and/or weakly adsorbed (Lee et al., 2004). In our study, this phenomenon was more accentuated under anaerobic conditions and, above all, in the presence of nitrate.

According to observed values of pesticide half-life in soil ($t_{1/2}$ values ranged from 27.4 to 291.1 days) (Table 7.3.), rates of deltamethrin degradation in our riparian wetland soil are in accordance with those previously published: values of half-life for deltamethrin in soil of 11-72 days, depending on conditions and temperature, were reported by Roberts (1998). The high content of clay present in our soil (28%) might have caused a decrease in the rates of deltamethrin degradation, as previously reported (Hongxia, 2002). Increases in clay concentration have been reported to generally decrease the rate of pesticide mineralization (Weber and Coble, 1968; Subba-Rao and Alexander, 1982). Several researchers have shown that biodegradation of organic compounds in soil can be limited by strong adsorption to, or slow desorption from, the different soil components (Pignatello, 1989; Al-Bashir et al., 1994).

Likewise, in our study, as previously described (Pawlisz et al., 1998), rates of pesticide degradation were in general faster under aerobic than anaerobic conditions (except for the value corresponding to C₃ in the absence of nitrate) (Table 7.3.). Under aerobic conditions, in agreement with Khalil et al. (2005), the presence of nitrate appeared to have an inhibitory effect on deltamethrin degradation rates (Figures 7.1.A and 7.1.B, and Table 7.3.), probably due to nitrate addition resulting in a lower C/N ratio not optimal for pesticide degradation. This inhibitory effect of nitrate on deltamethrin degradation was much more pronounced under anaerobic conditions (Figures 7.1.C and 7.1.D, and Table 7.3.). Apart from the abovementioned C/N ratio not optimal for pesticide degradation, in this case, the inhibitory effect of nitrates might also

be due to competition within the soil microbial community. After all, under anaerobic conditions, in the presence of nitrate, denitrifying soil bacteria (*i.e.*, facultative heterotrophic bacteria such as *Pseudomonas*, *Bacillus*, etc.) are known to use this anion for energy generation) (Johnsen et al., 2001).

Regarding the effect of deltamethrin concentration on pesticide degradation rates, under aerobic conditions and in the absence of nitrate, highest deltamethrin degradation rates were found in C1 (lowest deltamethrin concentration) soil samples (Table 7.3.). This was most likely due to the fact that at higher pesticide concentrations a certain degree of inhibition of microbial activity might have occurred, in agreement with Chen et al. (2001) and Johnsen et al. (2001). At lowest values of deltamethrin concentration, the fastest rates of deltamethrin degradation probably resulted from enhanced soil microbial activity derived from the immediate mineralization of the pesticide after its incorporation to the soil, as previously suggested (Das and Mukherje, 2000). In any case, this effect was not observed in the presence of nitrate under aerobic conditions (Table 7.3.), *i.e.* in this case, C1 and C3 soil samples showed similar rates of deltamethrin degradation.

By contrast, under anaerobic conditions, in the absence of nitrate, fastest degradation rates were found at the highest deltamethrin concentration here used (C₃). It is plausible that the anaerobic microbial community of our riparian wetland soil is more tolerant to the presence of high concentrations of deltamethrin than the aerobic microbial community. Actually, in the absence of nitrates, at C₃, the rate of deltamethrin degradation was higher under anaerobic than aerobic conditions. However, in the presence of nitrate, higher values of deltamethrin concentration resulted in lower rates of pesticide degradation, suggesting a possible toxic effect on the soil microbial community.

7.4.2. Microbial basal respiration

Soil microbial activity was assessed by means of quantifying the rates of soil microbial basal respiration (Tables 7.4. and 7.5.). Under aerobic conditions (Table 7.4.), in the absence of nitrate, significantly higher ($P < 0.05$) rates of soil microbial basal respiration were observed after 2, 15 and 28 days of incubation in the presence of

deltamethrin, as compared to those found in control non-amended soils. This effect was also observed in the presence of nitrate at the highest deltamethrin concentration (C₃) (although the differences were statistically significant, $P < 0.05$, only for sampling times of 2, 15 and 28 days) (Table 7.4.). On the contrary, in the presence of nitrate, no stimulatory effect on the rates of soil microbial basal respiration was observed for C₁ and C₂ soils as compared to control non-amended soils (Table 7.4.). Other authors have also reported higher rates of soil microbial activity at higher levels of pesticide exposure (Pell et al., 1998; Widenfalk et al., 2004). Pell et al. (1998) concluded that a pesticide-induced toxic response in microorganisms might cause an increased uptake of energy or an uncoupling of energy-yielding processes, resulting in higher levels of microbial activity.

Table 7.4. Effect of deltamethrin concentration on the rates of soil microbial basal respiration (units: $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$) under aerobic conditions, in the absence and presence of nitrate.

Without nitrate				
Incubation (days)	Control	C ₁	C ₂	C ₃
2	652.7 ± 5.7 ^{aA}	846.5 ± 62.0 ^{aB}	730.7 ± 26.2 ^{aC}	741.2 ± 14.3 ^{aC}
15	143.1 ± 6.8 ^{bA}	212.9 ± 8.0 ^{bB}	234.4 ± 4.5 ^{bC}	226.6 ± 20.3 ^{bC}
28	135.5 ± 2.7 ^{bA}	163.4 ± 11.6 ^{cb}	163.7 ± 4.7 ^{cb}	161.8 ± 7.7 ^{cb}
58	63.8 ± 1.7 ^{cA}	127.9 ± 1.5 ^{dB}	88.0 ± 2.4 ^{dC}	93.2 ± 3.1 ^{dC}
With nitrate				
Incubation (days)	Control	C ₁	C ₂	C ₃
2	767.9 ± 6.5 ^{aA*}	743.60 ± 26.5 ^{aA}	713.5 ± 10.7 ^{aA}	964.5 ± 214.2 ^{aB}
15	171.1 ± 3.2 ^{bA*}	193.27 ± 37.5 ^{bA}	186.0 ± 11.1 ^{bA*}	439.7 ± 195.9 ^{bB*}
28	135.6 ± 13.2 ^{cA}	132.57 ± 10.2 ^{cA*}	119.5 ± 11.2 ^{cA*}	346.1 ± 203.3 ^{bB}
58	68.0 ± 0.9 ^{dA*}	59.58 ± 7.7 ^{dA*}	58.4 ± 6.1 ^{dA*}	112.4 ± 72.3 ^{cA}

Numbers followed with different letters or asterisks are significantly different ($P < 0.05$ or lower) according to Fisher's PLSD-test (lower case letters: among sampling times; upper case letters: among treatments; asterisks: with versus without nitrate)

Under anaerobic conditions (Table 7.5.), in the absence of nitrate, in general, the presence of deltamethrin had a significant ($P < 0.05$) inhibitory effect on the rates of soil microbial basal respiration observed at the second and third sampling times (15 and 28 days). This was probably due to a deltamethrin-induced toxic effect on the soil microbial community which, as abovementioned, appears to mostly affect the activity of denitrifying bacteria. This inhibition indicates that deltamethrin, an insecticide designed to affect specific functions of its target organisms, has an effect on nontarget organisms, as previously reported (Widenfalk et al., 2004).

Table 7.5. Effect of deltamethrin concentration on the rates of soil microbial basal respiration (units: $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$) under anaerobic conditions, in the absence and presence of nitrate.

Without nitrate				
Incubation (days)	Control	C ₁	C ₂	C ₃
2	75.3 ± 2.7 ^{aA}	74.4 ± 4.6 ^{aA}	65.4 ± 4.9 ^{aA}	68.2 ± 3.5 ^{aA}
15	45.8 ± 3.9 ^{bA}	38.9 ± 5.2 ^{bB}	29.6 ± 1.2 ^{bC}	28.4 ± 1.2 ^{bC}
28	32.0 ± 1.6 ^{cA}	33.3 ± 6.8 ^{bA}	22.8 ± 1.0 ^{cB}	20.5 ± 1.0 ^{cB}
58	17.7 ± 2.3 ^{dA}	22.0 ± 3.2 ^{bA}	18.4 ± 7.6 ^{cA}	12.7 ± 0.4 ^{dA}
With nitrate				
Incubation (days)	Control	C ₁	C ₂	C ₃
2	38.4 ± 2.7 ^{aA*}	39.2 ± 1.6 ^{aA*}	41.6 ± 1.6 ^{aA*}	37.3 ± 2.4 ^{aA*}
15	31.4 ± 3.9 ^{aA*}	32.8 ± 3.9 ^{aA*}	29.1 ± 2.6 ^{bA}	31.7 ± 5.0 ^{aA}
28	26.5 ± 1.1 ^{bA*}	24.1 ± 4.0 ^{bA}	21.3 ± 5.5 ^{cA}	23.6 ± 2.1 ^{bA}
58	12.5 ± 2.8 ^{cA*}	11.5 ± 7.1 ^{cA}	12.6 ± 2.6 ^{dA}	10.3 ± 2.9 ^{cA}

Numbers followed with different letters or asterisks are significantly different ($P < 0.05$ or lower) according to Fisher's PLSD-test (lower case letters: among sampling times; upper case letters: among treatments; asterisks: with versus without nitrate)

In contrast, no inhibitory effect of deltamethrin on soil microbial basal respiration rates, as compared to those values found in control non-amended soils, was observed in the presence of nitrate under anaerobic conditions (Table 7.5.). In this case,

the stimulatory effect caused in deltamethrin-amended soils by the addition of nitrate on the activity of denitrifying bacteria (see below, Table 7.6.) probably compensates for the abovementioned pesticide-induced toxic effect. Finally, when interpreting data on soil microbial respiration, one should always remember that respiration itself is a quite unspecific endpoint to quantify effects of pollution on soil microbial communities (after all, a decrease in the respiration rate of some microbial groups can be masked by an increased respiration rate by other more tolerant groups).

As seen in Table 7.4., in soils amended with the highest deltamethrin concentration (C_3), the presence of nitrate under aerobic conditions had a stimulatory effect ($P < 0.05$) on the rate of soil microbial basal respiration (although the differences were statistically significant only for the first sampling time). On the contrary, in soils amended with the intermediate deltamethrin concentration (C_2), the presence of nitrate under aerobic conditions had a statistically significant ($P < 0.05$) inhibitory effect on the rate of soil microbial basal respiration (Table 7.4.). This inhibitory effect was also observed at the lowest deltamethrin concentration (C_1), although in this case the differences were statistically significant ($P < 0.05$) only for the second and third sampling times. In control non-amended soils, after 2 and 15 days of incubation, the presence of nitrate under aerobic conditions resulted in a statistically significant ($P < 0.05$) stimulatory effect on the rates of soil microbial basal respiration (Table 7.4.).

By contrast, in control non-amended soils, the presence of nitrate, under anaerobic conditions (Table 7.5.), had a statistically significant ($P < 0.05$) inhibitory effect on the rates of soil microbial basal respiration that could be explained by an alteration of the optimal C/N ratio. This inhibitory effect of nitrate was also observed at the lowest deltamethrin concentration (C_1), although the differences were statistically significant ($P < 0.05$) only for the first sampling time (Table 7.5.). The activation of denitrifying bacteria derived from the addition of nitrate (see below, Table 7.6.) might result in a certain competitive inhibition of anaerobic non-denitrifying heterotrophs, which might be more efficient in using deltamethrin as a carbon and energy source, with the concomitant decreased levels of soil microbial basal respiration. Finally, under anaerobic conditions, no clear effect of nitrate on the rates of soil microbial basal respiration was observed at C_2 and C_3 .

7.4.3. Denitrification

The addition of nitrate had a statistically significant ($P < 0.05$) stimulatory effect on denitrification rates in all deltamethrin-amended soils (Table 7.6.). By contrast, this nitrate-induced stimulatory effect was not observed in control non-amended soils, possibly due to the community of denitrifying bacteria being C-limited in the absence of deltamethrin. In these control non-amended soils, after 2 and 15 days of incubation, the addition of nitrate led to significantly lower rates of denitrification (*i.e.*, 53.24 ± 6.87 versus 30.86 ± 2.68 mg N₂ kg⁻¹ DW soil day⁻¹, in the absence and presence of nitrate, respectively). Out of all the samples tested under anaerobic conditions for denitrification products (CO₂, N₂O, N₂), gaseous N₂O was only detected in control non-amended soils supplemented with nitrate at the first sampling time.

Table 7.6. Effect of deltamethrin concentration on the rates of denitrification (units: mg N₂ kg⁻¹ DW soil day⁻¹) under anaerobic conditions, in the absence and presence of nitrate.

Without nitrate				
Incubation (days)	Control	C ₁	C ₂	C ₃
2	53.2 ± 6.8 ^{aA}	39.8 ± 2.5 ^{aB}	84.7 ± 10.3 ^{aC}	128.4 ± 44.7 ^{aC}
15	168.9 ± 7.5 ^{bA}	81.3 ± 4.7 ^{bB}	16.2 ± 4.5 ^{bC}	16.1 ± 4.1 ^{bC}
28	124.9 ± 5.9 ^{cA}	72.6 ± 6.1 ^{bB}	9.2 ± 1.8 ^{bC}	8.8 ± 0.8 ^{cC}
58	71.1 ± 3.8 ^{dA}	46.9 ± 4.1 ^{cB}	9.8 ± 1.4 ^{bC}	4.8 ± 0.0 ^{cD}
With nitrate				
Incubation (days)	Control	C ₁	C ₂	C ₃
2	30.9 ± 2.7 ^{aA*}	30.8 ± 1.8 ^{aA*}	159.2 ± 15.6 ^{aB*}	132.3 ± 2.5 ^{aB}
15	150.9 ± 9.1 ^{bA*}	102.0 ± 8.8 ^{bB*}	42.1 ± 3.1 ^{bC*}	100.0 ± 8.6 ^{bB*}
28	133.8 ± 10.3 ^{bA}	119.4 ± 17.5 ^{bA*}	62.4 ± 5.4 ^{cB*}	96.1 ± 7.6 ^{bC*}
58	67.2 ± 3.7 ^{dA}	60.0 ± 10.2 ^{cA*}	35.9 ± 4.2 ^{bB*}	34.5 ± 4.6 ^{cB*}

Numbers followed with different letters or asterisks are significantly different ($P < 0.05$ or lower) according to Fisher's PLSD-test (lower case letters: among sampling times; upper case letters: among treatments; asterisks: with *versus* without nitrate)

Interestingly, in these very same soils, if one adds the amount of N-N₂O produced at 15-days sampling time (i.e., 13.52 ± 3.09 mg N-N₂O) and the amount of N₂ produced also at 15-days sampling time (i.e., 150.91 ± 9.07 mg N₂), the result closely resembles the amount of N₂ produced by control non-amended soils in the absence of nitrates after 15 days of incubation (i.e., 168.93 ± 7.46 mg N₂), suggesting that the addition of nitrate probably led to decreased rates of conversion of N₂O into N₂ and thus higher N₂O/N₂ ratios, as previously reported (Firestone et al., 1979; Weier et al., 1993). Šimek et al. (2002) reported that at soil pH values above 7, such as ours, N₂ is a much more important denitrification product than N₂O.

While control and C1 samples showed maximum denitrification rates after 15 and 28 of incubation, maximum values in C2 and C3 samples (which were also higher) were observed after only 2 days of incubation. These maximum values of denitrification rate found in C2 and C3 samples at the beginning of the experiment were followed by a sudden drop, reaching values much lower than those registered in control and C1 samples.

In the absence of nitrates, soils amended with deltamethrin showed significantly ($P < 0.05$) lower values of denitrification rate than control non-amended soils (in fact, it was observed that the higher the deltamethrin concentration the lower the denitrification rate) (Table 7.6.), probably due to a pesticide-induced toxic effect. In a study on growth and nitrite and nitrous oxide accumulation of *Paracoccus denitrificans* in the presence of pesticides, Sáez et al. (2003) also observed that the addition of organochlorinated and organophosphorous pesticides led to inhibition of denitrification and accumulation of NO₂⁻. The accumulation of NO₂⁻ in soil has major harmful effects as this anion causes well-known environmental impacts such as soil acidification (Bohloul et al., 1992), which in turn has been reported to negatively affect the rates of denitrification/N₂ production (Šimek et al., 2002). Bollag and Kurek (1980) also found that the application of the organochlorinated insecticide chlordaneform to soil had an inhibitory effect on denitrification.

In the presence of nitrates, although denitrification rates were also significantly ($P < 0.05$) lower in deltamethrin amended versus control non-amended soils, the differences were not always statistically significant (they were statistically significant,

$P < 0.05$, for all cases except for C_1 at 28 and 58 days of incubation). In the presence of nitrates, highest and lowest values of denitrification activity in deltamethrin-amended soils were found for C_1 and C_2 , respectively (Table 7.6.). Widelfalk et al. (2004), in their study on the effects of captan, deltamethrin, isoproturon and pirimicarb on the microbial community of a freshwater sediment, also found lowest rates of denitrification at an intermediate deltamethrin concentration.

Under anaerobic conditions, both in the absence and presence of nitrate, an antagonistic effect between deltamethrin degradation and denitrification rate (Table 7.3. and 7.6.) appears to occur, as previously reported (Johnsen et al., 2001). This effect was more pronounced in the presence of nitrate when denitrifying bacteria are more active. Nevertheless, other studies have reported higher rates of denitrification in the presence of pesticides (Yeomans and Bremner, 1985; Pell et al., 1998), probably owing to death and cellular lysis of organisms caused by the pesticide, resulting in the release of readily degradable energy sources for denitrifying bacteria (Pell et al., 1998). Alternatively, some microorganisms can have a competitive advantage in the presence of pesticides due to (i) their capacity to use them as energy sources (El-Fantruossi et al., 1999) and (ii) decreased competition for energy/nutrients and nutrient release from decaying microorganisms (Chen et al., 2001; Johnsen et al., 2001).

Finally, as abovementioned for soil microbial basal respiration, when interpreting data on denitrification activity, one should always remember that a lack of an observed effect on denitrification rates does not necessarily mean that the pesticide has not affected such biological process, since denitrification is a general process that can be carried out by many different bacterial species (Petersen et al., 2004).

7.4.4. Methanogenesis

As previously reported (Bollag and Czlonkowski, 1973; Klüber & Conrad, 1998a, b), in the presence of nitrate, no CH_4 was detected under anaerobic conditions in our riparian wetland soils. The activation of denitrifying bacteria caused by the presence of nitrate probably led to competitive inhibition of the methanogenic community. This phenomenon can also be detected, under anaerobic conditions, in the absence of nitrate (in this case, highest rates of denitrification were observed at the first and second

sampling times when denitrifying bacteria were using the nitrate already present in the soil; by contrast, in the absence of nitrate, the rates of methanogenesis were highest at the third and fourth sampling times, when denitrifiers were probably N-limited and the conditions were more favourable for methanogens) (Tables 7.6. and 7.7.). Nitrate has previously been reported to reduce methanogenesis in waterlogged soils, due to substrate competition, redox changes or enzyme poisoning (Bollag and Czlonkowski, 1973; Westerman and Ahring, 1987).

Table 7.7. Effect of deltamethrin concentration on the rates of methanogenesis (units: $\text{mg CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ DW soil day}^{-1}$) under anaerobic conditions, in the absence of nitrate.

Incubation (days)	Control	C ₁	C ₂	C ₃
2	-	-	-	-
15	0.24 ± 0.05 ^{aA}	0.25 ± 0.12 ^{aA}	0.34 ± 0.06 ^{aA}	0.13 ± 0.03 ^{aB}
28	2.80 ± 0.67 ^{bA}	3.42 ± 0.66 ^{bA}	5.53 ± 0.14 ^{bB}	2.72 ± 0.28 ^{bA}
58	3.13 ± 0.27 ^{cA}	2.71 ± 0.56 ^{bA}	3.83 ± 0.92 ^{cB}	5.39 ± 0.20 ^{cC}

Numbers followed with different letters or asterisks are significantly different ($P < 0.05$ or lower) according to Fisher's PLSD-test (lower case letters: among sampling times; upper case letters: among treatments)

Methane production was clearly detected in the absence of nitrate under anaerobic conditions (Table 7.7.). Lowest rates of methanogenesis were found for the first sampling time versus the second and third sampling times. In the third sampling time, the rates of CH_4 production were significantly higher in C₂ and C₃ soils (but not in C₁ soils), as compared to control non-amended soils (Table 7.7.). This might be due to the fact that the activity of denitrifying bacteria was more inhibited at C₂ and C₃ than at C₁ (Table 7.6.), with the concomitant competitive advantage for methanogens. Actually, in terms of the total amount of methane produced, i.e. rate of production \times time of incubation (data not shown), it was observed that the higher the concentration of deltamethrin the higher the total amount of methane produced.

7.5. Conclusions

The Salburua wetland is surrounded by intensively managed agricultural fields where pesticides, such as deltamethrin, are regularly applied to maximize crop production. Since pesticides can potentially have a negative effect on soil health, in the present study, we investigated the degradation rate of deltamethrin in our riparian wetland soil as well as its impact on soil microbial activity.

Deltamethrin degradation was faster under aerobic than anaerobic conditions, while the presence of nitrate had an inhibitory effect on deltamethrin degradation rates, probably due to: (i) under aerobic conditions, the addition of nitrate resulted in a lower C/N ratio not optimal for pesticide degradation; and (ii) under anaerobic conditions, the presence of nitrate induced denitrification activity, leading to a less effective deltamethrin degradation with concomitant longer times of pesticide presence in soil and higher environmental impact.

Under aerobic conditions, the presence of deltamethrin stimulated soil microbial activity, as reflected by higher values of soil microbial basal respiration. By contrast, under anaerobic conditions, lower values of soil microbial basal respiration were observed in deltamethrin-amended soils. Although nitrate addition did not cause a significant effect on soil microbial basal respiration under anaerobic conditions, in the presence of oxygen, in general, nitrate decreased the rates of this parameter indicative of overall microbial activity, which could be correlated with the lower rates of deltamethrin degradation observed as a result of the addition of nitrate.

Under anaerobic conditions, the presence of deltamethrin had an inhibitory effect on the rates of soil microbial basal respiration, an effect that was reversed in the presence of nitrate due to the activity of denitrifying bacteria probably compensating for the pesticide-induced toxic effect. Our data indicate that, under anaerobic conditions, an antagonistic effect between deltamethrin degradation and denitrification activity occurs. The addition of nitrate had a stimulatory effect on denitrification rates in all deltamethrin-amended soils, an effect not observed in control non-amended soils, possibly due to the community of denitrifying bacteria being C-limited in the absence of deltamethrin. The effects of pesticides on denitrification activity are of the utmost importance as they can lead to negative consequences on soil fertility. Finally, in the

presence of nitrate, no CH₄ was detected under anaerobic conditions because the activation of denitrifying bacteria probably led to competitive inhibition of the methanogenic community. It was concluded that deltamethrin, designed to affect specific functions of its target organisms, also has an effect on nontarget organisms such as the soil microbial community.

7.6. References

- Al-Bashir, B., Hawari, J., Samson, R., Leduc, R. 1994. Behavior of nitrogen substituted naphthalenes in flooded soil-Part III: effect of bioavailability on biodegradation kinetics. *Water Research* 28, 1827-1833.
- Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amezaga, I., Garbisu, C. 2003. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Reviews on Environmental Health* 18, 65-73.
- Arrate, I., Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., Vallecillo, M.A., Iribar, V., Ruiz, M. 1997. Groundwater pollution in quaternary aquifer of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, Spain). *Environmental Geology* 30, 257-265.
- Baker, L.A. 1993. Introduction to nonpoint source pollution and wetland mitigation. In: Olson, R.K., Marshall, K. (Eds), *Created and Natural Wetlands for Controlling Nonpoint Source Pollution*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 12-45.
- Baskaran, S., Kookana, R.S., Naidu, R. 1999. Degradation of bifenthrin, chlorpyrifos and imidacloprid in soil and bedding materials at termiticidal application rates. *Pesticide Science* 55, 1222-1228.
- Bernhard, C., Carbiener, R., Cloots, A.R., Froehlicher, R., Schenk, C., Zilliox, L. 1992. Nitrate pollution of groundwater in the Alsatian plain (France). A multidisciplinary study of an agricultural area: the central ried of the Ill river. *Environmental Geology and Water Sciences* 20, 125-137.
- Böhlke, J.K. 2002. Groundwater recharge and agricultural contamination. *Hydrogeology Journal* 10, 153-179.
- Bohlool, B.B., Ladha, J.K., Garrity, D.P., George, T. 1992. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective. *Plant and Soil* 14, 1-11.
- Bollag, J.M., Czlonkowski, S.T. 1973. Inhibition of methane formation in soil by various nitrogen containing compounds. *Soil Biology and Biochemistry* 5, 673-678.
- Bollag, J.M., Kurek, E.J. 1980. Nitrite and nitrous oxide accumulation during denitrification in the presence of pesticides derivatives. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 845-849.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1994. *Biology of Microorganisms*, 7th Edition. Prentice-Hall International, Englewood Cliffs, NJ.

- Burt, T.P., Matchett, L.S., Goulding, W.T., Webster, C.P., Haycock, N.E. 1999. Denitrification in riparian buffer zones: the role of floodplain hydrology. *Hydrological Processes* 13, 1451-1463.
- Burton, G.A. 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 1585-1627.
- Chen, S.K., Edwards, C.A., Subler, S. 2001. Effects of the fungicides benomyl, captan, and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1971-1980.
- Copeland, R.A. 1996. *Enzymes: a Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. VCH Publishers, New York, NY.
- Das, A.C., Mukherjee, D. 2000. Soil application of insecticides influences microorganisms and plant nutrients. *Applied Soil Ecology* 14, 55-62.
- Doran, J.W., Safley, M. 1997. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In: Pankhurst C.E., Double B.M., Gupta V.V.S.R. (Eds), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 1-28.
- Ecobichon, D.J. 1991. Toxic effects of pesticides. In: Amdur, M.O., Doull, J., Klaassen, C.D. (Eds), *Toxicology – The Basic Science of Poisons*, 4th Ed. McGraw-Hill, New York, NY. pp. 565-622.
- El-Fantruossi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M. 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 982-988.
- EPA, 2000. *Ultrasonic Extraction. Test Methods for Evaluating Solid Waste. Method 3550C, Revision 3*, US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Firestone, M.K., Smith, M.S., Firestone, R.B., Tiedje, J.M. 1979. The influence of nitrate, nitrite, and oxygen on the composition of gaseous products of denitrification in soils. *Soil Science Society of America Journal* 43, 1140-1144.
- García-Linares, C., Martínez-Santos, M., Martínez-Bilbao, V., Sánchez-Pérez, J. M., Antigüedad, I. 2003. Wetland restoration and nitrate reduction: the example of the peri-urban wetland of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, North Spain). *Hydrological and Earth System Science* 7, 109-121.
- Gold, A.J., Groffman, P.M., Addy, K., Kellogg, D.Q., Stolt, M., Rosenblatt, A.E. 2001. Landscape attributes as controls on ground water nitrate removal capacity of riparian zones. *Journal of American Water Resources Association* 37, 1457-1464.
- Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Zarate, O., Garbisu, C., 2006. Assessment of the efficiency of a metal phytoextraction process with biological indicators of soil health. *Plant and Soil* 281, 147-158.
- Hongxia, Z. 2002. *Retention and movement of reactive chemicals in soils*. PhD Thesis. Louisiana State University. USA.

- ISO 16072, 2002. Soil Quality - Laboratory Methods for Determination of Microbial Soil Respiration. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Johnsen, K., Jacobsen, C.S., Torsvik, V., Sorensen, J. 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils. A review. *Biology and Fertility of Soils* 33, 443-453.
- Kadlec, R.H., Hey, D. L. 1994. Constructed wetlands for river water quality improvement. *Water Science Technology* 29, 159-168.
- Khalil, M.I., Hossain, M.B., Schmidhalter, U. 2005. Carbon and nitrogen mineralization in different upland soils of the subtropics treated with organic materials. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1507-1518.
- Klüber, H.D., Conrad, R. 1998a. Effects of nitrate, nitrite, NO, N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiological Ecology* 25, 301-319.
- Klüber, H.D., Conrad, R. 1998b. Inhibitory effects of nitrate, nitrite, NO, N₂O on methanogenesis, Methanosarcina barkeri and Methanobacterium bryantii. *FEMS Microbiological Ecology* 25, 331-339.
- Kodaka, R., Suzuki, Y., Sugano, T., Katagi, T. 2007. Aerobic metabolism and adsorption of pyrethroid insecticide metofluthrin in soil. *Journal of Pesticide Science* 32, 393-401.
- Kovárová-Kovar, K., Egli, T. 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 646-666.
- Leake, C.R., Humphreys SP, Austin, D.J. 1995. Factors influencing the modelling of pesticide degradation in soil and the estimation of half-life (DT50) and DT90 values. In: Walker A., et al. (Eds) BCPC Monograph No. 62. British Protection Council, Farnham, Surrey, UK, pp 217-222.
- Lee, S., Gan, J., Kim, J.S., Kabashima, J.N., Crowley, D.E. 2004. Microbial transformation of pyrethroid insecticides in aqueous and sediment phases. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1-6.
- Mengis, M., Schiff, S.L., Harris, M., English, M.C., Aravena, R., Elgood, R.J., MacLean, A. 1999. Multiple geochemical and isotopic approaches for assessing ground water NO₃⁻ elimination in a riparian zone. *Ground Water* 37, 448-457.
- Mijangos, I., Pérez, R., Albizu, I., Garbisu, C. 2006. Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 100-106.
- Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews of Microbiology* 3, 371-394.
- Niklinska, M., Maryanski, M. and Laskowski R., 1999. Effect of temperature on humus respiration rate and nitrogen mineralization: Implications for global climate change. *Biogeochemistry* 44, 239-257.
- Paine, W.J., 1981. Denitrification. John Wiley, New York, NY.

- Pavel, E.W., López, A.R., Berry, D.F., Smith, E.P., Reneau, R.B., Mostaghimi, S. 1999. Anaerobic degradation of dicamba and metribuzin in riparian wetland soils. *Water Research* 33, 87-94.
- Pawlisz, A.V., Busnarda, J., McLaughlin, A., Cauz, P.Y., Kent, R.A. 1998. Canadian water quality guidelines for deltamethrin. *Environmental Toxicology and Water Quality* 13, 175-210.
- Pell, M., Stenberg, B., Torstensson, L. 1998. Potential denitrification and nitrification tests for evaluation of pesticide effects in soil. *Ambio* 1, 24-28.
- Petersen, D.G., Dahllöf, I., Nielsen, L.P. 2004. Effects of zinc and copper pyrythione on microbial community function and structure in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 921-928.
- Pignatello, J.J. 1989. Sorption dynamics of organic compounds in soils and sediments. In: Sawhney, B.L., Brown, K. (Eds), *Reactions and Movements of Organic Chemicals in Soils*. Soil Science Society of America, Madison, WI. pp. 45-80.
- Rice, P.J., Anderson, T.A., Coats, J.R. 2002. Degradation and persistence of metolachlor in soil: effects of concentration, soil moisture, soil depth, and sterilization. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2640-2648.
- Ritter, W.F., Chirnside, A.E.M., Scarborough, R.H. 1990. Soil nitrate profile under irrigation on coastal plain soils. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering* 116, 738-750.
- Roberts, T. 1998. *Metabolic Pathways for Agrochemicals-Part II: Insecticides and Fungicides*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
- Ruzo, L.O., Holmstead, R.L., Casida, J.E. 1977. Pyrethroid photochemistry: decamethrin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 25, 1385-1394.
- Sáez, F., Pozo, C., Gómez, M.A., Rodelas, B., González-López, J. 2003. Growth and nitrite and nitrous oxide accumulation of *Paracoccus denitrificans* ATCC 19367 in the presence of selected pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1993-1997.
- Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., Arrate, I., García-Linares, C., Morell, I. 2003. The influence of nitrate leaching through unsaturated soil on groundwater pollution in an agricultural area of the Basque country: a case study. *Science of the Total Environment* 317, 173-187.
- Selim, H.M., Zhu, H. 2002. Retention and mobility of deltamethrin in soils : 2. Transport 1. *Soil Science* 167, 580-589.
- Šimek, M., Jísová, L., Hopkins, D.W. 2002. What is the so-called optimum pH for denitrification in soil? *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1227-1234.
- Singh, B.K., Walker, A., Wright, D.J. 2002. Degradation of chlorpyrifos, fenamiphos, and chlorothalonil alone and in combination and their effects on soil microbial activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2600-2605.

- Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnson, C.T., Sumner, M. 1996. *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*. Soil Science Society of America Book Series, Madison, WI.
- Subba-Rao, R.V., Alexander, M. 1982. Effect of sorption on mineralization of low concentration of aromatic compounds in lake water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 659-668.
- Suzuki, Y., Yoshimura, J., Katagi, T. 2006. Aerobic metabolism and adsorption of pyrethroid insecticide imiprothrin in soil. *Journal of Pesticide Science* 31, 322-328.
- Weber, J.B., Coble, H.D. 1968. Microbial decomposition of diquat adsorbed on montmorillonite and kaolinite clays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 16, 475-478.
- Weier, K.L., Doran, J.W., Power, J.F., Walters, D.T. 1993. Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate. *Soil Science Society of America Journal* 57, 66-72.
- Westerman, P., Ahring, B.K. 1987. Dynamics of methane production, sulphate reduction, and denitrification in a permanently waterlogged alder swamp. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2554-2559.
- Widenfalk, A., Svensson, J.M., Goedkoop, W. 2004. Effects of the pesticides captan, deltamethrin, isoproturon, and pirimicarb on the microbial community of a freshwater sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1920-1927.
- Wolverton, B.C., Harrison, D.D. 1975. Aquatic plants for removal of mevinphos from the aquatic environment. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences* 19, 84-88.
- Yeomans, J.C., Bremner, J.M. 1985. Denitrification in soils: effects of insecticides and fungicides. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 453-456.
- Zhu, H., Selim, H. M. 2002. Retention and mobility of deltamethrin in soils: 1. Adsorption-Desorption 1. *Soil Science* 167, 513-523.

8

- 8.1. Abstract
- 8.2. Introduction
- 8.3. Materials and methods
- 8.4. Results
- 8.5. Discussion
- 8.6. Conclusions
- 8.7. References

Results and discussion IV:

**Tebuconazole application
decreases soil microbial biomass
and activity**

*“Poco conoce el mundo acerca de cuantas
ideas que han pasado por la mente del
científico han sido aplastadas en silencio
por un resultado adverso y su propia
crítica exigente”*

Michael Faraday (1791-1867)

8. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity

Published in Soil Biology & Biochemistry 43, 2176-2183 (2011).

8.1. Abstract

A short-term mesocosm experiment was conducted to ascertain the impact of tebuconazole on soil microbial communities. Tebuconazole was applied to soil samples with no previous pesticide history at three rates: 5, 50 and 500 mg kg⁻¹ DW soil. Soil sampling was carried out after 0, 7, 30, 60 and 90 days of incubation to determine tebuconazole concentration and microbial properties with potential as bioindicators of soil health [i.e., basal respiration, substrate-induced respiration, microbial biomass C, enzyme activities (urease, arylsulfatase, β -glucosidase, alkaline phosphatase, dehydrogenase), nitrification rate, and functional community profiling]. Tebuconazole degradation was accurately described by a bi-exponential model (degradation half-lives varied from 9 to 263 days depending on the concentration tested). Basal respiration,

substrate-induced respiration, microbial biomass C and enzyme activities were inhibited by tebuconazole. Nitrification rate was also inhibited but only during the first 30 days. Different functional community profiles were observed depending on the tebuconazole concentration used. It was concluded that tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity.

8.2. Introduction

The intensive use of pesticides is a common practice in modern agriculture all around the world (Yang et al., 2007). Several studies have estimated that less than 0.3% of the pesticide reaches its target pest (Pimentel, 1995); the remaining 99.7% is released to the environment, representing a potential hazard for non-target organisms including humans. A significant proportion of the pesticide frequently ends up in the soil where it undergoes biological and physicochemical transformations (Bending et al., 2006). In this respect, microbial degradation is the main route of pesticide removal in soils, conditioning its persistence and susceptibility to leaching (Aislabie and Lloyd-Jones, 1995; Bending et al., 2006). However, pesticides can exert non-target effects on soil microbial communities, negatively affecting soil health (Monkiedje et al., 2002; Lupwayi et al., 2010). Some specific soil microorganisms, such as nitrifying bacteria, are very sensitive to pesticides (Ahtiainen et al., 2003). On the other hand, soil microbial properties, particularly those related to the biomass, activity and diversity of soil microbial communities, can be most useful indicators of the impact of disturbances on soil health (Hernández-Allica et al., 2006; Mijangos et al., 2006, 2009).

Tebuconazole [(*RS*)-1-*p*-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol], a broad-spectrum triazole fungicide used agriculturally for disease control in fruit, nut, cereal and vegetable crops worldwide, has a relatively high soil organic carbon-water binding coefficient and a half-life in soil of 49 to 610 days under aerobic conditions (Strickland et al., 2004). Although this relatively new fungicide is being widely used due to its effectiveness against soilborne and foliar fungal diseases, few studies on its degradation in soil (Bromilow et al., 1999; White et al., 2010) and, in particular, its non-target effects on soil microbial communities (Strickland et al., 2004; Cycoń et al., 2006; Bending et al., 2007) have been published.

To prevent potential tebuconazole-induced adverse effects on the soil ecosystem, more research is needed for a better understanding of its degradation in soil and a more accurate assessment of its impact on soil microbial communities.

The main goal of this study was (i) to quantify dissipation kinetics of tebuconazole in a soil with no previous known history of pesticide application when added at three different rates (5, 50 and 500 mg kg⁻¹), (ii) to assess tebuconazole impact on soil microbial communities, and (iii) to monitor the recovery of soil health after tebuconazole application. To evaluate tebuconazole-induced non-target effects on soil microbial communities and soil health, we determined a variety of soil microbial properties which provide information on the biomass, activity and diversity of soil microbial communities simultaneously (i.e., basal and substrate-induced respiration, microbial biomass C, ecophysiological indices, enzyme activities, nitrification rate, and functional community profiling). To our knowledge, no studies have evaluated the impact of tebuconazole on soil microbial communities and soil health using measures of microbial biomass, activity and diversity simultaneously.

8.3. Materials and methods

8.3.1. Soil characterization

Soil (top 0-25 cm) was collected from the riparian zone of the Salburua wetland (Vitoria-Gasteiz, northern Spain), an area with no previous known history of pesticide application. Immediately after collection, soil samples were taken to the laboratory in dark plastic bags, homogenized, air-dried at 25 °C during 48 h, sieved to <2 mm, and subjected to physicochemical characterization according to Sparks et al. (1996). The soil is of a Chernozem calcic character (FAO) with a clay-sandy texture, a pH of 8.3 (1:2.5 w/v in water), 17.0 g organic C kg⁻¹ dry weight (DW), 2.3 g total N kg⁻¹ DW, a C/N ratio of 7.8, and an electrical conductivity of 0.18 dS m⁻¹.

8.3.2. Experimental design

A three-month mesocosm study was carried out following a modification of the method by Monkiedje et al. (2002). For each tebuconazole concentration, a set of three replicated mesocosms was prepared by transferring subsamples of 8 kg DW soil to 10 L plastic trays, resulting in a soil layer of approximately 10 cm depth. Each subsample was artificially contaminated by spiking 100 mL of a tebuconazole (purity $\geq 99\%$, DTS Olabe, Spain) solution (in methanol) at calculated concentrations to give a final concentration of 5, 50 and 500 mg tebuconazole kg^{-1} DW soil (T5, T50 and T500, respectively). T5 corresponds approximately to the highest recommended field application dose for wheat crops ($0.5 \text{ kg active ingredient ha}^{-1}$), assuming a soil bulk density of 1 g cm^{-3} and an effective soil depth of 1 cm (Strickland et al., 2004). T50 and T500 were chosen following standard ecotoxicological practice for establishing possible negative effects of a substance in the environment (Chen and Edwards, 2001; Cycoń et al., 2006). Subsamples were thoroughly mixed with a rotary mixer (Philips handmixer, HR1570) to assure uniform fungicide distribution and then kept for 24 h in a well aerated dark room to allow evaporation of the methanol. An equal volume of pure methanol (100 mL) was added to tebuconazole-free controls (C). Soil moisture content was adjusted to 60% water holding capacity (WHC). To avoid tebuconazole photodegradation and evaporative losses of water from soil, trays were covered with perforated polypropylene sheets and incubated in the dark at $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Throughout the incubation, water content was held constant by daily addition of deionised water. From each mesocosm, a subsample of 250 g fresh weight (FW) soil was taken at 0, 7, 30, 60 and 90 days of incubation, sieved to $<2 \text{ mm}$, and stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis.

8.3.3. Soil microbial parameters

Soil basal respiration (R_B : an indicator of soil microbial activity) and substrate-induced respiration (SIR: an indicator of potentially active microbial biomass) were determined following ISO 16072 Norm (2002) and ISO 17155 Norm (2002), respectively. For basal respiration, the CO_2 released by soil samples incubated in airtight jars for 3 days at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ was trapped in vials containing 0.2 N NaOH and titrated with 0.1 N HCl. Substrate-induced respiration was determined by adding 10,000 mg C

(as glucose) kg^{-1} DW soil to soil samples and then measuring CO_2 evolution after 6 h of incubation as abovementioned for basal respiration. Substrate-induced respiration, developed to measure the response of the 'metabolically active' component of the soil microbial community (Anderson and Domsch, 1985), reflects the size of the potentially active microbial biomass since it evaluates the maximum potential respiratory activity, not the actual activity (Schomberg and Steiner, 1997). Microbial biomass C (C_{mic} : an indicator of the overall size of the soil microbial community) was quantified by the fumigation-incubation method (Vance et al., 1987) using a conversion factor of 2.64 (Voroney et al., 1991). From these three parameters (basal respiration, substrate-induced respiration, microbial biomass C), ecophysiological indices which reflect environmental stress in soil microbial populations and communities (Anderson and Domsch, 1985) and, concomitantly, soil health were calculated, i.e. microbial metabolic quotient ($q\text{CO}_2$), or the ratio of basal respiration to microbial biomass C ($q\text{CO}_2 = R_B / C_{\text{mic}}$) and respiratory quotient Q_R , or the ratio of basal respiration to substrate-induced respiration ($Q_R = R_B / \text{SIR}$).

Urease activity was determined according to Kandeler and Gerber (1988) as described in Rodríguez-Loinaz et al. (2008). Arylsulfatase, β -glucosidase, alkaline phosphatase and dehydrogenase activities were determined according to Dick (1997) and Taylor et al. (2002) as described in Epelde et al. (2008) and Rodríguez-Loinaz et al. (2008). For the study of nitrifying communities, nitrate (N-NO_3^-) and ammonium (N-NH_4^+) concentrations were determined following Sparks et al. (1996).

Functional community profiling was obtained with Biolog EcoPlatesTM according to Epelde et al. (2008). Average well colour development (AWCD) was determined by calculating the mean of every well's absorbance value after 48 h of incubation, which corresponded to the time of maximal microbial growth in the Biolog EcoPlatesTM. The number of utilized substrates (i.e., the number of substrates with an absorbance value >0.25 ; this value marked the beginning of the exponential phase in the Biolog EcoPlatesTM), equivalent to species richness, S , was calculated at 48 h incubation time. Shannon's diversity index ($H' = - \sum p_i \log_2 p_i$), where p_i is the ratio of the absorbance of a particular well to the sum of absorbances of all microplate wells, was calculated, considering absorbance values at each well as equivalent to species abundance.

8.3.4. Tebuconazole concentration

Tebuconazole concentration in soil was determined using a validated analytical method based on an ultrasonic assisted extraction procedure according to EPA method 3550C (EPA, 2007) with subsequent analytical determination by GC-MS. Chromatographic analyses were carried out in an Agilent 6890N Gas Chromatograph interfaced to an Agilent 5973 Mass Selective Detector. The column used was a HP-5MS (30 m length x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness). The carrier gas was helium at a flow of 1.6 mL min^{-1} . Temperature was applied as follows: 100 $^{\circ}\text{C}$ as initial temperature for 2 min, ramped at 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 150 $^{\circ}\text{C}$, then raised at 30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 250 $^{\circ}\text{C}$ and, finally, ramped at 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 290 $^{\circ}\text{C}$ (this temperature was kept for 5 min). The injection (2 μL) was achieved in splitless mode, setting the injector and ion source at 250 $^{\circ}\text{C}$, the transfer temperature at 300 $^{\circ}\text{C}$, and the detector voltage at 1200V. Acquisition was made in time scheduled SIM mode.

8.3.5 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software (SPSS 18, Inc., 2010). Data on soil properties were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with tebuconazole concentration and incubation time as factors. Differences between means for a given tebuconazole concentration and incubation time were compared using one-way ANOVA and Fisher's PLSD post-hoc test. Values were considered to be significantly different at a 95% confidence level. Values in figures and tables correspond to the average of triplicate data ($n = 3$) \pm standard deviations (SD). Pearson's correlations coefficients (r) and Principal Component Analysis (PCA) were performed to establish relationships between soil microbial properties. STATISTICA 6.0 software (Statsoft, Inc., 2004) was used to fit experimental data on tebuconazole degradation to a bi-exponential model.

8.4. Results

8.4.1. Tebuconazole degradation

Tebuconazole degradation was faster during the first 30 days of incubation (Figure 8.1.). The observed biphasic pattern of degradation fits more accurately to a bi-exponential kinetic model [$TC(t) = A \cdot e^{-k_1 t} + B \cdot e^{-k_2 t}$, where $TC(t)$ = tebuconazole concentration at t time; A and B = constants; k_1 and k_2 = degradation kinetic constants for the first and second component of the curve; and t = time] than to classical first-order models (Muñoz-Leoz et al., 2009). Rates of degradation were dependent on tebuconazole concentration, with half-lives of 9, 74 and 263 days for T5, T50 and T500, respectively (Table 8.1.). After 90 days of incubation, 25, 47 and 59% of the initial tebuconazole concentration remained in the soil for T5, T50 and T500, respectively.

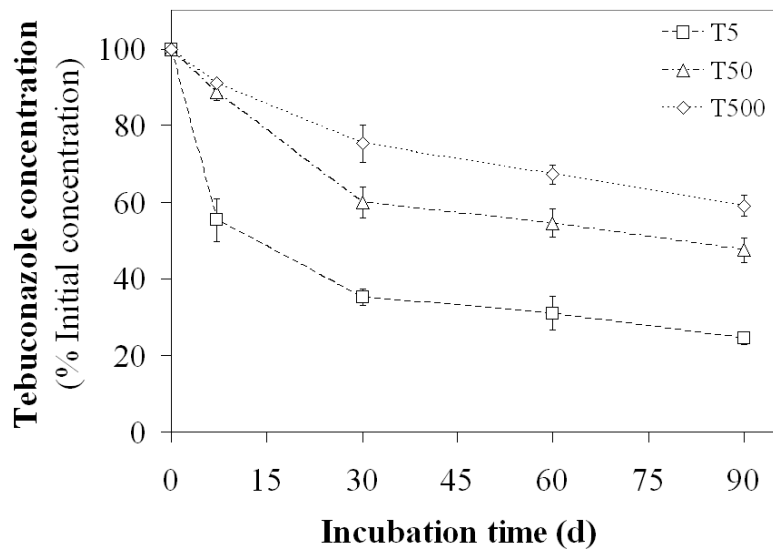


Figure 8.1. Dynamics of tebuconazole degradation in soil (tebuconazole concentration at a given sampling time is expressed as % of initial tebuconazole concentration). Mean values ($n=3$) \pm S.D.

Table 8.1. Kinetic parameters of tebuconazole degradation in soil at three different initial concentrations: 5, 50 and 500 mg tebuconazole kg⁻¹ DW soil (T5, T50 and T500, respectively).

Tebuconazole concentration	A	k1 (d ⁻¹)	B	k2 (d ⁻¹)	t _{1/2} (d)	r ²
T5	2.1	0.0058	2.9	0.1969	9.0	0.9998
T50	22.4	0.0528	28.1	0.0018	74.2	0.9958
T500	310.4	0.0008	186.1	0.0296	262.5	0.9972

Tebuconazole degradation in soil was described by the bi-exponential model [$TC(t) = A \cdot e^{(-k_1 \cdot t)} + B \cdot e^{(-k_2 \cdot t)}$], where TC (t) = soil tebuconazole concentration at t time; A, B = constants; k1, k2 = degradation kinetic constants for the first and second component of the curve; t = time]. t_{1/2} = half-life or time required for a 50% dissipation of the initial tebuconazole concentration.

8.4.2 Tebuconazole impact on soil microbial biomass and activity

Tebuconazole-treated soils showed lower values of microbial biomass C than controls (Figure 8.2.). In fact, at day 30, values of microbial biomass C in T500 soils were 94.6% lower than in control soils. In general, values of microbial biomass C in tebuconazole-treated soils did not recover during the incubation period.

Regarding basal respiration, at day 7 and 30, values were lower in tebuconazole-treated soils compared to controls (on average, values were 24.3 and 17.6% lower in tebuconazole-treated soils than in controls at day 7 and 30, respectively) (Figure 8.2.). The effect of tebuconazole on basal respiration was independent of its concentration (no significant differences were found among T5, T50 and T500 soils) (Table 8.2.).

Substrate-induced respiration was lower in tebuconazole-treated soils than in controls (Figure 8.2.). At day 7, it was found that the higher the tebuconazole concentration, the lower the substrate-induced respiration (11.6, 7.6 and 5.1 mg CO₂-C kg⁻¹ DW soil h⁻¹ at T5, T50 and T500, respectively).

8. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity

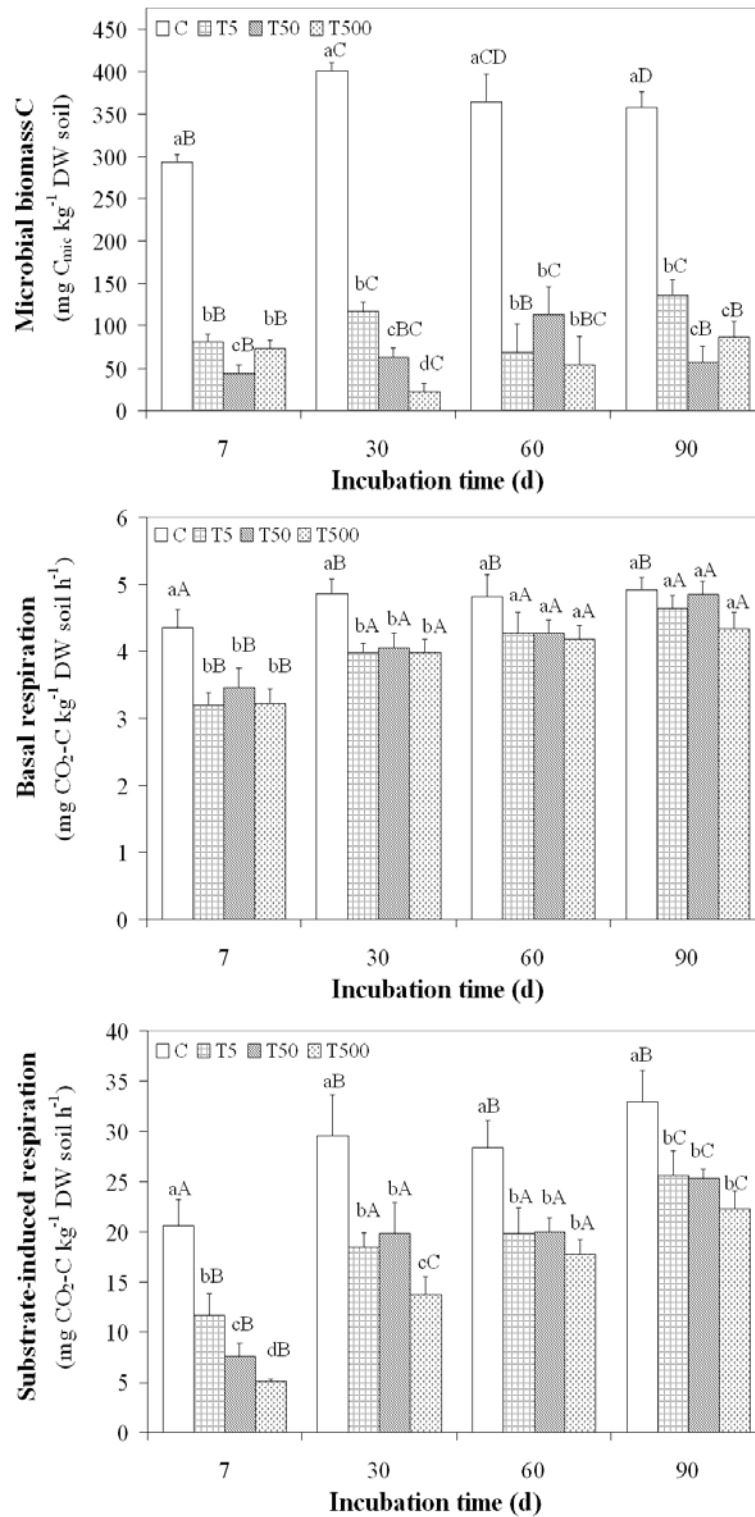


Figure 8.2. Effect of tebuconazole on soil microbial biomass C, basal respiration, and substrate-induced respiration. Mean values ($n=3$) \pm S.D. followed by different letters are significantly different according to Fisher's PLSD test ($P<0.05$). Lower case: among tebuconazole concentrations; upper case: among incubation times. Initial values at $t = 0$ days were (see figure for units) = microbial biomass C: 251.6 ± 8.2^{aA} ; basal respiration: 4.10 ± 0.22^{aA} ; substrate-induced respiration: 17.54 ± 1.43^{aA} .

Table 8.2. Two-way ANOVA for soil microbial properties as affected by tebuconazole concentration (C), incubation time (T) and their interaction (Conc x Time). Marked values (*) indicate significance at $P < 0.05$.

Factor	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	URE	GLU	PHO	ARYL	DEH
C	.002*	<.001*	.086	.279	.076	.088	.401
T	<.001*	<.001*	<.001	.095	<.001*	.013*	<.001*
C x T	.001*	.002*	.171	.464	.196	.633	<.001*

N-NH₄⁺, ammonium concentration; N-NO₃⁻, nitrate concentration; URE, urease activity; GLU, β -glucosidase activity; PHO, alkaline phosphatase activity; ARYL, arylsulfatase activity; DEH, dehydrogenase activity.

Factor	R _B	SIR	qCO ₂	Q _R	C _{mic}	AWCD	S	H'
C	.175	.002*	.065	<.001*	.063	.001*	<.001*	.001*
T	<.001*	<.001*	.850	<.001*	.478	.299	<.001*	<.001*
C x T	.766	.387	.041*	<.001*	.130	.266	.061	.167

R_B: basal respiration; SIR: substrate-induced respiration; qCO₂: metabolic quotient; Q_R: respiratory quotient; C_{mic}: microbial biomass C; AWCD: average well colour development; S: species richness; H': Shannon's diversity index.

Pertaining to ecophysiological indices, tebuconazole-treated soils showed higher values of qCO₂ than controls (Figure 8.3.). At day 30, it was observed that the higher the tebuconazole concentration, the higher the qCO₂ value (according to two-way ANOVA, a significant interaction was found between tebuconazole concentration and incubation time) (Table 8.2.). In turn, tebuconazole concentration had a significant effect on Q_R values (Table 8.2.). At day 7, tebuconazole-treated soils showed higher values of Q_R than controls: again, it was found that the higher the tebuconazole concentration, the higher the Q_R value. By contrast, at day 90, no differences were found between tebuconazole-treated soils and controls.

8. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity

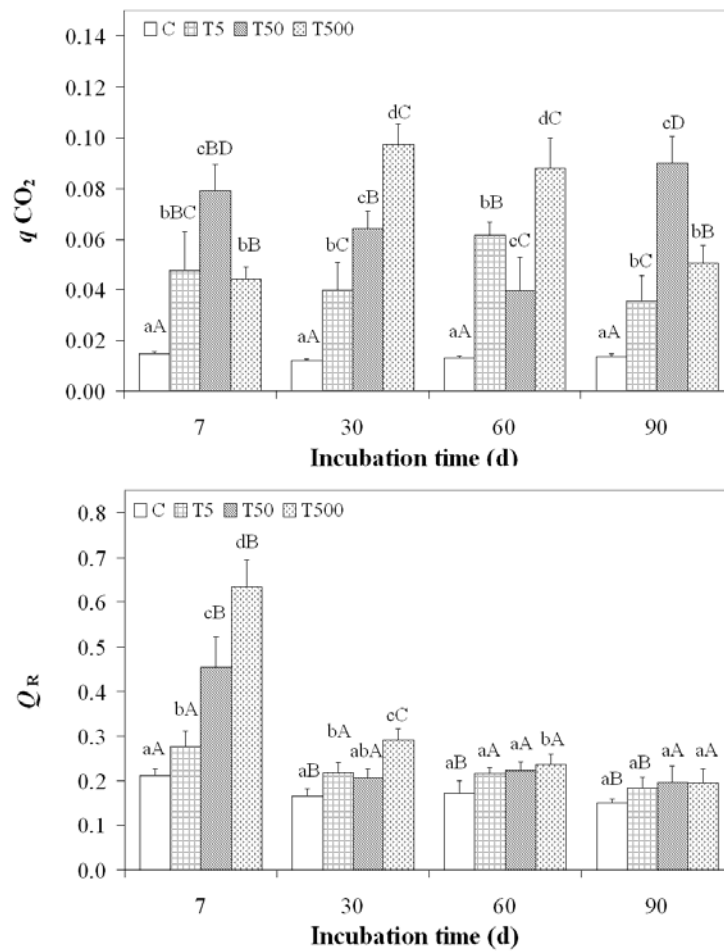


Figure 8.3. Effect of tebuconazole on metabolic ($q\text{CO}_2$) and respiratory (Q_R) quotients. Mean values ($n=3$) \pm S.D. followed by different letters are significantly different according to Fisher's PLSD test ($P<0.05$). Lower case: among tebuconazole concentrations; upper case: among incubation times. Initial values at $t = 0$ days were (see figure for units) = $q\text{CO}_2$: $0.016 \pm 0.002^{\text{aA}}$; Q_R : $0.23 \pm 0.01^{\text{aA}}$.

Values of N-NH_4^+ concentration in tebuconazole-treated soils increased up to day 7, remained relatively constant from day 7 to day 30, and then progressively decreased until day 90 to values similar to those obtained in control soils (Figure 8.4.). In tebuconazole-treated soils, values of N-NO_3^- concentration remained constant up to day 30, to then progressively increased until day 90.

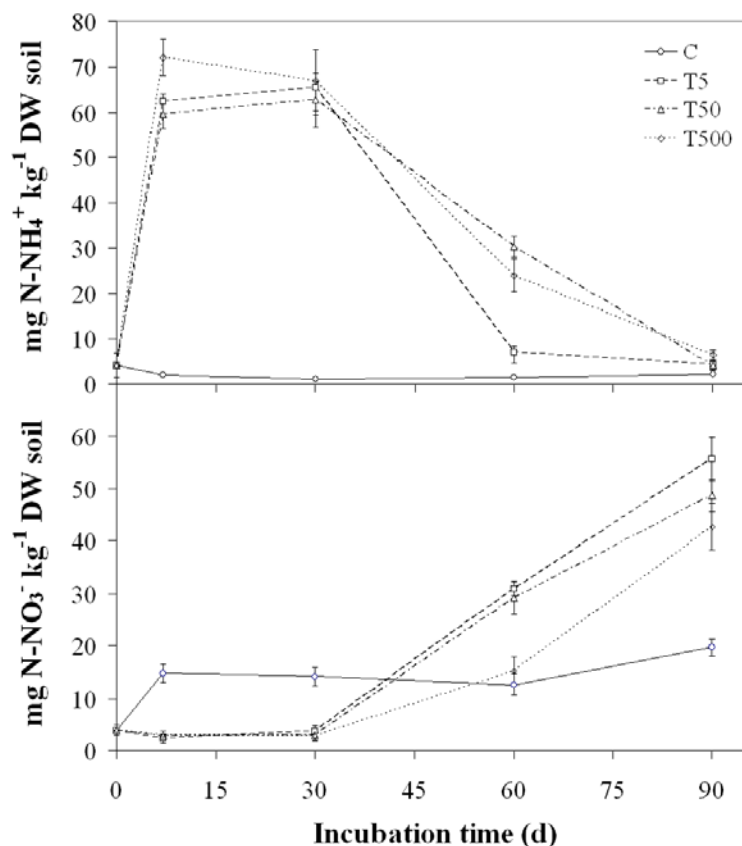


Figure 8.4. Effect of tebuconazole on soil $N-NH_4^+$ and $N-NO_3^-$ concentration. Mean values ($n=3$) \pm S.D.

At all incubation times, lower values of urease, arylsulfatase and β -glucosidase activity were found in tebuconazole-treated soils than in controls (Table 8.3.). At day 90, on average, values were 93.3, 87.1 and 69.5% lower in tebuconazole-treated soils *versus* controls for urease, arylsulfatase and β -glucosidase activity, respectively, showing no significant differences among tebuconazole concentrations (Table 8.2.).

Lower values of alkaline phosphatase were found in tebuconazole-treated soils *versus* controls at day 30, 60 and 90 (on average, 33.0, 44.4 and 48.8% lower, respectively). From day 7 onwards, alkaline phosphatase values increased in control soils. The opposite trend was found in tebuconazole-treated soils. Finally, no clear trend was observed regarding dehydrogenase activity.

Table 8.3. Effect of tebuconazole on soil enzyme activities at three different initial concentrations: 5, 50 and 500 mg tebuconazole kg⁻¹ DW soil (T5, T50 and T500, respectively).

Incubation time (d)	Tebuconazole concentration			
	Control	T5	T50	T500
Urease (mg NH₄⁺ kg⁻¹ DW soil 2 h⁻¹)				
7	114.4 ± 11.3 ^{aA}	11.1 ± 4.3 ^{bB}	7.8 ± 2.1 ^{bB}	1.4 ± 1.9 ^{cB}
30	136.7 ± 8.1 ^{aB}	2.3 ± 1.5 ^{bC}	1.4 ± 0.9 ^{bC}	2.5 ± 0.9 ^{bB}
60	139.4 ± 12.7 ^{aB}	3.4 ± 2.0 ^{bC}	2.6 ± 1.4 ^{bC}	1.2 ± 1.5 ^{bB}
90	182.1 ± 21.1 ^{aC}	11.3 ± 2.3 ^{bB}	14.2 ± 5.7 ^{bB}	11.1 ± 2.2 ^{bC}
Arylsulfatase (mg 4-PNP kg⁻¹ DW soil h⁻¹)				
7	307.6 ± 20.8 ^{aA}	22.4 ± 8.6 ^{bB}	28.6 ± 9.9 ^{bB}	24.5 ± 8.7 ^{bB}
30	301.2 ± 14.4 ^{aA}	37.1 ± 9.1 ^{bBC}	22.3 ± 3.1 ^{cB}	24.2 ± 10.1 ^{bcB}
60	339.3 ± 27.7 ^{aAB}	44.2 ± 8.1 ^{bBC}	30.3 ± 10.5 ^{bB}	30.9 ± 11.3 ^{bB}
90	342.0 ± 11.8 ^{aB}	54.2 ± 7.7 ^{bC}	39.0 ± 7.7 ^{bB}	40.2 ± 11.4 ^{bB}
β-Glucosidase (mg 4-PNP kg⁻¹ DW soil)				
7	211.1 ± 19.8 ^{aB}	65.2 ± 9.4 ^{bB}	71.1 ± 5.9 ^{bB}	65.5 ± 11.1 ^{bB}
30	193.5 ± 19.0 ^{aAB}	81.5 ± 13.0 ^{bB}	70.3 ± 10.8 ^{bB}	81.1 ± 5.1 ^{bB}
60	200.1 ± 21.1 ^{aAB}	88.8 ± 10.8 ^{bB}	79.9 ± 6.9 ^{bB}	69.2 ± 12.6 ^{bB}
90	267.9 ± 32.3 ^{aC}	89.2 ± 7.9 ^{bB}	74.1 ± 8.5 ^{bB}	82.2 ± 9.4 ^{bB}
Alkaline phosphatase (mg 4-PNP kg⁻¹ DW soil h⁻¹)				
7	597.8 ± 37.2 ^{aB}	518.5 ± 29.3 ^{bB}	607.9 ± 38.4 ^{aB}	648.0 ± 32.1 ^{aB}
30	742.1 ± 57.6 ^{aC}	489.0 ± 35.1 ^{bBC}	468.3 ± 27.8 ^{bC}	533.4 ± 16.4 ^{bC}
60	804.1 ± 40.5 ^{aC}	440.4 ± 31.3 ^{bC}	418.8 ± 16.5 ^{bD}	481.1 ± 53.8 ^{bCD}
90	830.3 ± 63.9 ^{aC}	424.7 ± 27.3 ^{bC}	403.7 ± 35.8 ^{bD}	447.7 ± 29.2 ^{bD}
Dehydrogenase (mg INTF kg⁻¹ DW soil 20 h⁻¹)				
7	171.0 ± 20.2 ^{aB}	147.3 ± 10.7 ^{aB}	177.1 ± 11.6 ^{aB}	272.2 ± 10.5 ^{bB}
30	143.2 ± 16.8 ^{aB}	61.2 ± 7.3 ^{bC}	90.0 ± 8.4 ^{cA}	71.1 ± 12.5 ^{bcB}
60	191.1 ± 30.9 ^{aB}	83.0 ± 10.6 ^{bD}	87.8 ± 14.5 ^{bA}	52.4 ± 9.2 ^{bC}
90	146.2 ± 27.5 ^{aB}	140.8 ± 14.4 ^{aB}	112.4 ± 23.7 ^{aA}	69.7 ± 11.2 ^{bC}

Mean values (n=3) ± S.D. followed by different letters are significantly different according to Fisher's PLSD test (P<0.05). Lower case: among tebuconazole concentrations; upper case: among incubation times. Initial values at t = 0 days were (see table for units) = urease: 105.8 ± 14.1^{aA}; arylsulfatase: 298.7 ± 18.8^{aA}; β-glucosidase: 169.4 ± 12.5^{aA}; alkaline phosphatase: 320.0 ± 20.5^{aA}; dehydrogenase: 101.0 ± 6.6^{aA}.

8.4.3 Tebuconazole impact on soil microbial diversity

In control soils, values of species richness (S) and Shannon's diversity (H') calculated from Biolog EcoplatesTM data at an incubation time of 48 h, did not change during the first 7 days of incubation to then decrease progressively until day 90 (Tables 8.2. and 8.4.) (lower values of AWCD were also found at day 30, 60 and 90 *versus* day 7).

Table 8.4. Effect of tebuconazole on soil community-level physiological profiles from Biolog EcoplatesTM absorbance measurements at an incubation time of 48 h, following incubation for 7, 30, 60 or 90 days at three different initial concentrations: 5, 50 and 500 mg tebuconazole kg⁻¹ DW soil (T5, T50 and T500, respectively).

Incubation time(d)	Tebuconazole concentration			
	Control	T5	T50	T500
AWCD				
7	1.02 ± 0.08 ^{aA}	1.11 ± 0.06 ^{aA}	0.85 ± 0.03 ^{bB}	1.00 ± 0.06 ^{aA}
30	0.73 ± 0.03 ^{aB}	1.08 ± 0.10 ^{bA}	0.81 ± 0.07 ^{aBC}	0.94 ± 0.06 ^{abA}
60	0.36 ± 0.04 ^{aC}	0.84 ± 0.06 ^{bB}	0.73 ± 0.07 ^{bBC}	0.98 ± 0.11 ^{bA}
90	0.48 ± 0.07 ^{aC}	0.82 ± 0.08 ^{bB}	0.69 ± 0.06 ^{cC}	1.17 ± 0.13 ^{dA}
S				
7	24.67 ± 0.58 ^{aA}	22.33 ± 1.53 ^{bB}	17.33 ± 0.58 ^{cB}	20.00 ± 1.00 ^{bB}
30	17.00 ± 0.00 ^{aB}	28.33 ± 0.58 ^{bC}	25.67 ± 1.15 ^{cA}	27.67 ± 0.58 ^{dC}
60	12.67 ± 1.15 ^{aC}	21.33 ± 0.58 ^{bB}	21.0 ± 1.00 ^{bC}	24.33 ± 1.53 ^{cA}
90	8.67 ± 0.58 ^{aD}	20.33 ± 0.58 ^{bB}	17.67 ± 1.53 ^{cB}	21.00 ± 1.00 ^{bB}
H'				
7	4.37 ± 0.11 ^{aA}	4.26 ± 0.07 ^{aB}	3.94 ± 0.08 ^{bB}	4.18 ± 0.08 ^{aB}
30	3.97 ± 0.04 ^{aB}	4.61 ± 0.13 ^{bA}	4.49 ± 0.07 ^{bA}	4.59 ± 0.08 ^{bA}
60	3.34 ± 0.06 ^{aC}	4.25 ± 0.10 ^{bB}	4.18 ± 0.14 ^{bAB}	4.41 ± 0.07 ^{bA}
90	2.78 ± 0.04 ^{aD}	4.06 ± 0.07 ^{bC}	3.93 ± 0.03 ^{cB}	4.25 ± 0.06 ^{dB}

AWCD: average well colour development; S: species richness; H': Shannon's diversity index.

Initial values at $t = 0$ days were: AWCD: 1.10 ± 0.08^{aA} ; S: 25.33 ± 0.58^{aA} ; H': 4.47 ± 0.14^{aA} . Mean values ($n=3$) ± S.D. followed by different letters are significantly different according to Fisher's PLSD test ($P < 0.05$). Lower case: among tebuconazole concentrations; upper case: among incubation times.

At day 60 and 90, AWCD values were higher in tebuconazole-treated soils *versus* controls (Table 8.4.). At day 7, values of S were lower in tebuconazole-treated soils *versus* controls. In contrast, values of S and H' were higher in tebuconazole-treated soils *versus* controls at day 30, 60 and 90.

8.4.4 Relevant relationships between parameters

Microbial biomass C, basal respiration and substrate-induced respiration were positively correlated among each other and also with urease, arylsulfatase and β -glucosidase activity; these three enzyme activities were negatively correlated with N-NH₄⁺ (Table 8.5.). No correlation was found between R_B and DEH activity. On the other hand, N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻ concentrations were negatively correlated with each other (N-NH₄⁺ was negatively correlated with basal and substrate-induced respiration, while N-NO₃⁻ was positively correlated with those two respiratory parameters). Values of AWCD, S and H' from Biolog EcoplatesTM data were positively correlated among each other, and negatively with alkaline phosphatase activity.

Regarding PCA, varimax rotated factors for all variables are given in Table 8.6. The three factors retained for rotational analysis absorbed 74% of the total variance, with factors 1 and 2 explaining 54% of such variance. Factor 1 (33% of the total variance) showed a high positive Eigen-value (>0.90) for urease, arylsulfatase, β -glucosidase, and microbial biomass C. Factor 2 explained the variance of dehydrogenase and alkaline phosphatase activity, which showed an opposite pattern to that of AWCD, S and H'. Finally, factor 3 highlighted the negative correlations between N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻, as well as between basal and substrate-induced respiration *versus* Q_R.

Table 8.5. Correlations among soil microbial properties. Marked correlations are significant at 0.05 (*) and 0.01 (**) level of probability. Correlations significant at level of probability >0.05 were excluded

	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	URE	GLU	PHO	ARYL	DEH	R _B	SIR	qCO ₂	Q _R	C _{mic}	AWCD	S	H'
N-NH ₄ ⁺	1														
N-NO ₃ ⁻		1													
URE			1												
GLU				1											
PHO					1										
ARYL						1									
DEH							1								
R _B								1							
SIR									1						
qCO ₂										1					
Q _R											1				
C _{mic}												1			
AWCD													1		
S														1	
H'															1

N-NH₄⁺, ammonium concentration; N-NO₃⁻, nitrate concentration; URE, urease activity; GLU, β-glucosidase activity; PHO, alkaline phosphatase activity; ARYL, arylsulfatase activity; DEH, dehydrogenase activity; R_B: basal respiration; SIR: substrate-induced respiration; qCO₂: metabolic quotient; Q_R: respiratory quotient; C_{mic}: microbial biomass C; AWCD: average well colour development; S: species richness; H': Shannon's diversity index.

Table 8.6. Varimax rotated factors for all variables considered in the PCA (Eigen values < 0.50 were excluded).

Variables	Factor 1	Factor 2	Factor 3
N-NH ₄ ⁺	-.604	-	-.724
N-NO ₃ ⁻	-	-	.886
URE	.948	-	-
GLU	.934	-	-
PHO	-	.862	-
ARYL	.970	-	-
DEH	-	.707	-
R _B	-	-	.781
SIR	-	-	.732
qCO ₂	-.836	-	-
Q _R	-	-	-.617
C _{mic}	.935	-	-
AWCD	-	-.623	-
S	-	-.868	-
H'	-	-.849	-
VE (%)	33	21	20
CV (%)	33	54	74

N-NH₄⁺, ammonium concentration; N-NO₃⁻, nitrate concentration; URE, urease activity; GLU, β-glucosidase activity; PHO, alkaline phosphatase activity; ARYL, arylsulfatase activity; DEH, dehydrogenase activity; R_B: basal respiration; SIR: substrate-induced respiration; qCO₂: metabolic quotient; Q_R: respiratory quotient; C_{mic}: microbial biomass C; AWCD: average well colour development; S: species richness; H': Shannon's diversity index. VE: Variance explained; CV: Cumulative variance

8.5. Discussion

Fungicides can have an impact on soil health due to its direct application against soilborne fungal pathogens or indirectly by spraying it on foliar surfaces and subsequent runoff (Bending et al., 2006). In particular, fungicides can negatively affect microbial communities which play a key role in soil ecosystem functioning (Lupwayi et al., 2001; Monkiedje et al., 2002; Lupwayi et al., 2010). In this study, rates of tebuconazole degradation were faster in T5 soils (we found that the higher the tebuconazole

concentration, the longer the half-live), possibly because, at higher concentrations, tebuconazole might have inhibited the degradative activity of soil microorganisms, as reported for other fungicides (Chen and Edwards, 2001). Additionally, the observed biphasic pattern of degradation can be attributed to different adsorption sites or increased sorption over time, with microorganisms being able to use tebuconazole as carbon source for growth only at the beginning of the experiment, when a fraction of the added fungicide was in the dissolved phase and/or weakly adsorbed (Lee et al., 2004; Muñoz-Leoz et al., 2009).

Tebuconazole caused a consistent reduction in the values of basal respiration at the three concentrations tested, probably due to its negative effect on soil fungal communities which make up a large proportion of the total microbial biomass (tebuconazole inhibits ergosterol biosynthesis, a key component of fungal cell membranes) (Cycoń et al., 2006). This adverse impact on soil microbial communities was also reflected by the observed reduction in microbial biomass C and substrate-induced respiration (an indicator of potentially active microbial biomass). In contrast, Strickland et al. (2004) found no significant reduction in microbial biomass after tebuconazole addition, while Cycoń et al. (2006) did only observe a reduction in microbial biomass after the application of 270 mg tebuconazole kg⁻¹. These opposing results may be due to the methodologies employed: in our work, tebuconazole as active ingredient was applied directly to soil samples (in a methanol solution), while Cycoń et al. (2006) used a commercial formulation of tebuconazole with possible synergistic/antagonistic effects between the fungicide and adjuvants; on the other hand, for the application of tebuconazole to soil samples, Strickland et al. (2004) mixed the soil with sand that had been previously treated with tebuconazole (in a methanol solution), which might have affected fungicide bioavailability.

Apart from its direct effect on fungal populations, tebuconazole has been reported to cause non-target effects on bacterial communities (Jackson et al., 2000). Ecophysiological indices, such as $q\text{CO}_2$ and Q_R , have been reported to reflect environmental stress in soil microbial populations (Anderson and Domsch, 1985 1990, 1993, 2010; Pal et al., 2008) and, concomitantly, soil health. The tebuconazole-induced increase in $q\text{CO}_2$ and Q_R here found was more acute at the beginning of the incubation, when a higher proportion of tebuconazole was in the dissolved phase and/or weakly

adsorbed (thus, more bioavailable), suggesting a stress response of the soil microbial communities, resulting in a diversion of energy from growth and reproduction to cell maintenance (Moreno et al., 2007; Gómez et al., 2009). Indeed, a higher respiratory activity for the same microbial biomass is indicative of higher levels of maintenance energy and may be evidencing a lower metabolic efficiency due to a fungicide-induced inhibitory/stressing effect (Gómez et al., 2009). Also, the growth of *r* strategists, characterized by high growth rates and low yields of biomass (Insam et al., 1996), derived from the addition of a C source (tebuconazole) can be responsible for the observed increase in $q\text{CO}_2$ and Q_R .

Urease, arylsulfatase, β -glucosidase and alkaline phosphatase activity were strongly inhibited by tebuconazole, highlighting the severe impact of this fungicide on soil microbial communities and therefore soil health, since these enzyme activities play a key role in the cycling of N, S, C and P, respectively (Dick, 1997; Nannipieri et al., 2002). Contradictory results have been reported regarding the effect of fungicides on soil enzyme activities (Monkiedje and Spiteller, 2002; Monkiedje et al., 2002; Sukul, 2006; Monkiedje et al., 2007).

As abovementioned, nitrifying bacteria appear very sensitive to pesticide application (Ahtiainen et al., 2003). Unlike in control soils, during the first 30 days of incubation, we observed an accumulation of N-NH_4^+ , with very low values of N-NO_3^- , in tebuconazole-treated soils, indicating a marked inhibition of nitrification (a most important step in the N cycle in soils) in agreement with previous reports for tebuconazole (Cycoń et al., 2006) and other fungicides (Chen and Edwards, 2001; Monkiedje and Spiteller, 2002; Monkiedje et al., 2007; Černohlávková et al., 2009). The progressive increase in soil N-NO_3^- concentrations after day 30 indicates a recovery of nitrifying microorganisms due to decreasing amounts of bioavailable tebuconazole over time. Although nitrification has traditionally been considered to be carried out only by a small group of aerobic bacteria, ammonia-oxidizing archaea might also have a relevant role in nitrification in the soil ecosystem (Leininger et al., 2006). In the work by Cycoń et al. (2006), after just 7 days of incubation with tebuconazole, nitrification rates started to recover. Furthermore, the N-NH_4^+ accumulation may be ascribed, at least partly, to the killing of fungi resulting in a large pool of available nutrients for

ammonifying bacteria and the concomitant mineralization of organic N to NH_4^+ (Chen and Edwards, 2001).

Community-level physiological profiles obtained with Biolog EcoplatesTM provide an indication of the functional (catabolic) diversity of heterotrophic cultivable bacteria. The decline observed in AWCD, S and H' values in control soils over time might be due to the stimulation of competitive microbial species by the specific conditions of our experiment, leading to outcompetition of other species. The higher values of AWCD, S and H' found in tebuconazole-treated soils at day 90 can be explained by the killing of fungal populations and the concomitant increase in heterotrophic soil bacteria as a result of (i) decreased competition for nutrients with fungi, (ii) release of available substrates from dead fungal biomass, and (iii) lack of antagonistic inhibition through substances produced by fungi (Chen and Edwards, 2001; Widenfalk et al., 2004; Cycoń et al., 2006; Bending et al., 2007).

According to two-way ANOVA, several soil properties (N-NH_4^+ , N-NO_3^- , substrate-induced respiration, Q_R , AWCD, S, H') were significantly affected by tebuconazole concentration (Table 8.2.). Interestingly, at day 7, values of soil tebuconazole concentration were positively correlated with Q_R (as aforementioned, this ecophysiological index reflects environmental stress in soil microbial communities) and negatively correlated with substrate-induced respiration (an indicator of potentially active microbial biomass), indicating that these two parameters are most useful as indicators of the short-term adverse impact of tebuconazole on the soil microbial communities, providing a response gradient to a concentration gradient.

In general, no recovery of soil health (as reflected by the values of the soil microbial properties measured here) was observed in tebuconazole-affected soils during the 90-day incubation experiment (apart from the recovery of nitrifying communities described above). These persistent harmful effects were especially acute for soil enzyme activities, a fact that must be taken into serious consideration as these enzyme activities play a key role in the major biogeochemical cycles. This finding suggests that, in spite of residual pesticide concentration in soil decreasing relatively fast (e.g., in our study, a half-life of 9 days for T5), its non-target effects on soil microbial communities and soil health may persist for much longer periods of time (in our study, >90 days).

Finally, soil microbial properties have shown to be most valuable monitoring tools to assess the impact of tebuconazole application on soil health. This fact highlights the need to include ecologically-relevant measurements (complementary to classical toxicological bioassays), such as the soil microbial properties determined here, when assessing the environmental impact and possible non-target effects of pesticides.

8.6. Conclusions

Tebuconazole degradation was accurately described by a bi-exponential model (degradation half-lives varied from 9 to 263 days depending on the concentration tested). The addition of tebuconazole has a strong negative impact on soil microbial biomass and activity: basal respiration, substrate-induced respiration, microbial biomass C and enzyme activities involved in the major biogeochemical cycles were strongly inhibited by tebuconazole. Values of the ecophysiological indices qCO_2 and Q_R increased as a result of tebuconazole application, indicating a stressful condition for the soil microbial communities. In addition, nitrification was also inhibited during the first 30 days of incubation and functional community profiles revealed a shift in the composition of soil heterotrophic cultivable bacteria. Soil microbial properties have shown to be most valuable monitoring tools to assess the impact of tebuconazole application on soil health.

8.7. References

- Ahtiainen, J.H., Vanhala, P., Myllymaki, A., 2003. Effects of different plant protection programs on soil microbes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 56-64.
- Aislabie, J., Lloyd-Jones, G., 1995. A review of bacterial degradation of pesticides. *Australian Journal of Soil Research* 33, 925-942.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1985. Determination of eco-physiological maintenance requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biology and Fertility of Soils* 1, 81-89.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1990. Application of eco-physiological quotients (qCO_2 and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 251-255.

- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1993. The metabolic quotient for CO₂ ($q\text{CO}_2$) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 393-395.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 2010. Soil microbial biomass: the eco-physiological approach. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 2039-2043.
- Bending, G.D., Lincoln, S.D., Edmondson, R.N., 2006. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution* 139, 279-287.
- Bending, G.D., Rodríguez-Cruz, M.S., Lincoln, S.D., 2007. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere* 69, 82-88.
- Černohlávková, J., Jarkovský, J., Hofman, J., 2009. Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 80-85.
- Chen, S.K., Edwards, C.A., 2001. A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: comparisons of two soil type. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1982-1991.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., Kaczyńska, A., Kozdrój, J., 2006. Microbiological characteristics of a sandy loam soil exposed to tebuconazole and λ -cyhalothrin under laboratory conditions. *Ecotoxicology* 15, 639-646.
- Dick, R.P., 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health, in: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 121-156.
- EPA 3550c, 2007. Ultrasonic Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Revision 3. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Hernández-Allica, J., Barrutia, O., Garbisu, C., 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology* 39, 299-310.
- Gómez, E., Ferreras, L., Lovotti, L., Fernández, E., 2009. Impact of glyphosate on microbial biomass and metabolic activity in a vertic argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology* 45, 163-167.
- Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Zárate, O., Garbisu, C., 2006. Assessment of the efficiency of a metal phytoextraction process with biological indicators of soil health. *Plant and Soil* 281, 147-158.
- Insam, H., Hutchinson, T.C., Reber, H.H., 1996. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 691-694.

- ISO 16072, 2002. Soil Quality - Laboratory Methods for Determination of Microbial Soil Respiration.
- ISO 17155, 2002. Soil Quality - Determination of Abundance and Activity Soil Microflora Using Respiration Curves.
- Jackson, C.J., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2000. Bactericidal and inhibitory effects of azole antifungal compounds on *Mycobacterium smegmatis*. FEMS Microbiology Letters 192, 159-162.
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. Biology and Fertility of Soils 6, 68-72.
- Lee, S., Gan, J., Kim, J.S., Kabashima, J.N., Crowley, D.E., 2004. Microbial transformation of pyrethroid insecticides in aqueous and sediment phases. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 1-6.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature 442, 806-809.
- Lupwayi, N.Z., Arshad, M.A., Rice, W.A., Clayton, G.W., 2001. Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. Applied Soil Ecology 16, 251-261.
- Lupwayi, N.Z., Brandt, S.A., Harker, K.N., O'Donovan, J.T., Clayton, G.W., Turkington, T.K., 2010. Contrasting soil microbial responses to fertilizers and herbicides in a canola-barley rotation. Soil Biology and Biochemistry 42, 1997-2004.
- Mijangos, I., Pérez, R., Albizu, I., Garbisu, C., 2006. Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. Enzyme and Microbial Technology 40, 100-106.
- Mijangos, I., Becerril, J.M., Albizu, I., Epelde, L., Garbisu, C., 2009. Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. Soil Biology and Biochemistry 41, 505-513.
- Monkiedje, A., Ilori, M.O., Spiteller, M., 2002. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. Soil Biology and Biochemistry 34, 1939-1948.
- Monkiedje, A., Spiteller, M., 2002. Effects of the phenylamide fungicides, mefenoxam and metalaxyl, on the microbiological properties of a sandy loam and a sandy clay soil. Biology and Fertility of Soils 35, 393-398.
- Monkiedje, A., Spiteller, M., Maniepi, S.J.N., Sukul, P., 2007. Influence of metalaxyl- and mefenoxam-based fungicides on chemical and biochemical attributes of soil quality under field conditions in a southern humid forest zone of Cameroon. Soil Biology and Biochemistry 39, 836-842.
- Moreno, J.L., Aliaga, A., Navarro, S., Hernández, T., García, C., 2007. Effects of Atrazine on microbial activity in semiarid soil. Applied Soil Ecology 35, 120-127.

- Muñoz-Leoz, B., Garbisu, C., Antigüedad, I., Alonso, M.L., Alonso, R.M., Ruiz-Romera, E., 2009. Deltamethrin degradation and soil microbial activity in a riparian wetland soil. *Soil Science* 174, 220-228.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil, in: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-33.
- Pal, R., Das, P., Chakrabarti, K., Chakraborty, A., Chowdhury, A., 2008. Side effects of pencycuron on nontarget soil microorganisms in waterlogged soil: Field experiment. *Applied Soil Ecology* 38, 161-167.
- Pimentel, D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 8, 17-29.
- Rodríguez-Loinaz, G., Onaindia, M., Amezaga, I., Mijangos, I., Garbisu, C., 2008. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 49-60.
- Schomberg, H.H., Steiner, J.L., 1997. Estimating crop residue decomposition coefficients using substrate-induced respiration. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1089-1097.
- Strickland, T., Potter, T.L., Joo, H., 2004. Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation. *Pest Management Science* 60, 703-709.
- Sukul, P., 2006. Enzymatic activities and microbial biomass in soil as influenced by metalaxyl residues. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 320-326.
- Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 387-401.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703-707.
- Voroney, R.P., Winter, J.P., Gregorich, E.G., 1991. Microbe/plant soil interactions, in: Coleman, C., Fry, B. (Eds.), *Carbon Isotope Techniques*. Academic Press, New York, pp. 77-99.
- Widenfalk, A., Svensson, J.M., Goedkoop, W., 2004. Effects of the pesticides captan, deltamethrin, isoproturon and pirimicarb on the microbial community of a freshwater sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1920-1927.
- Yang, C.L., Sun, T.H., He, W.X., Zhou, Q.X., Chen, S., 2007. Single and joint effects of pesticides and mercury on soil urease. *Journal of Environmental Science* 19, 210-216.

9

- 9.1. Abstract
- 9.2. Introduction
- 9.3. Materials and methods
- 9.4. Results
- 9.5. Discussion
- 9.6. Conclusions
- 9.7. References

Results and discussion V:

Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado”

Albert Szent-Györgi (1893-1986)

9. Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities

Published in Soil Biology & Biochemistry 48, 125-134 (2012).

9.1. Abstract

A three-month mesocosm experiment was performed to unravel interactions between pesticides (difenoconazole: fungicide, deltamethrin: insecticide, ethofumesate: herbicide) and fertilizers (NPK synthetic fertilizer, compost) regarding the potential non-target effects of pesticides on soil microbial communities. To this aim, pesticides and fertilizers were applied to soil at a rate of 5 mg active ingredient kg⁻¹ DW soil and 185 mg N kg⁻¹ DW soil, respectively. Soil sampling was done after 0, 7, 30, 60 and 90 days of incubation in order to determine pesticide degradation rates and microbial properties: enzyme activities, basal respiration, substrate-induced respiration, potentially mineralizable N, nitrification rate and denitrification potential. By the end of the incubation, difenoconazole, deltamethrin and ethofumesate in non-fertilized soils were degraded by 52, 85 and 93%, with half-lives of 86, 36 and 29 days, respectively.

Compost application had a stimulatory effect on difenoconazole and deltamethrin degradation. NPK fertilization led to a 26% increase in ethofumesate half-life in soil. Difenoconazole and deltamethrin caused a short-term inhibitory effect on microbial activity in non-fertilized soils, but not in fertilized soils. A short-term antagonistic effect between NPK fertilization and deltamethrin or ethofumesate presence was found regarding their inhibitory effect on potentially mineralizable N. In compost-fertilized soils, pesticides (especially, ethofumesate) counteracted the stimulatory effect of compost on denitrification potential. Pesticides caused a slight negative effect on the capacity of soils to recycle nutrients that was counteracted at day 90 by the addition of compost, as reflected by the values of the treated-soil quality index. We concluded that fertilizers can modify both pesticide degradation rates and their non-target effects on soil microbial communities.

9.2. Introduction

Modern agriculture is highly dependent on the use of pesticides. Nonetheless, pesticides can exert negative non-target effects on human and environmental health (Pavel et al., 1999). Regarding their environmental impact, a considerable proportion of the applied pesticides frequently ends up in the soil, where it is degraded by physical, chemical and biological processes. At the same time, pesticides can induce harmful effects on soil microbial communities which are essential to soil ecosystem structure and function, and therefore of paramount importance to soil quality (Lupwayi et al., 2010; Muñoz-Leoz et al., 2011).

Fertilization can also impact soil microbial communities with concomitant effects on soil quality (Marschner et al., 2003; Romero et al., 2010). Interestingly, fertilization can have an effect on the capacity of soil microorganisms to degrade pesticides (Masciandaro et al., 2000; Sánchez et al., 2004). Thus, organic fertilizers can reduce pesticide bioavailability due to its sorption to organic matter (OM) (Barriuso et al., 1997). However, little information is available concerning the effects of the simultaneous application of fertilizers and pesticides on soil microbial communities, and hence soil quality. Besides, most of these studies are focused on pesticide degradation (Barriuso et al., 1997; Lipthay et al., 2007; Kadian et al., 2008) and/or the impact of

agrochemicals on a few soil microbial properties (Chen et al., 2001; Moorman et al., 2001; Romero et al., 2010).

Soil microbial properties, particularly those related to the biomass, activity and diversity of soil microbial communities can be used as indicators of the impact of disturbances on soil quality (Hernández-Allica et al., 2006; Mijangos et al., 2009). In particular, soil processes related with the nitrogen (N) cycle (ammonification, nitrification, denitrification) have been found to be very sensitive to the presence of agrochemicals (Ahtiainen et al., 2003).

In the present work, three functionally different pesticides (difenoconazole: fungicide, deltamethrin: insecticide, ethofumesate: herbicide) and two fertilizers (NPK synthetic fertilizer, organic compost) were applied simultaneously to soil samples, under laboratory conditions, in order to assess possible (i) fertilizer-induced changes in pesticide degradation rates and (ii) interactions between pesticides and fertilizers regarding their effects on a variety of soil microbial properties (enzyme activities: dehydrogenase, β -glucosidase, urease, arylsulfatase, alkaline phosphatase; basal and substrate-induced respiration; potentially mineralizable N; nitrification rate; denitrification potential) with potential as indicators of soil quality. In order to more closely simulate real field conditions, pesticides were applied as commercial formulations since adjuvants and surfactants present in such formulations may affect both pesticide degradation rates and their impact on soil microbial communities (Beigel et al., 1999). Finally, from the values of the enzyme activities, the treated-soil quality index proposed by Mijangos et al. (2010) was calculated.

9.3. Materials and methods

9.3.1. Experimental design

A three-month mesocosm experiment was carried out to assess the effects of the simultaneous application of pesticides and fertilizers on soil microbial communities. For this study, we selected three functionally different pesticides (difenoconazole: fungicide, deltamethrin: insecticide, ethofumesate: herbicide) and two fertilizers (see below) included in the Code of Good Agricultural Practices for sugar beet cultivation in

the Vulnerable Zone of the Quaternary Aquifer of Vitoria-Gasteiz (northern Spain). Difenconazole, deltamethrin and ethofumesate are the three most commonly applied pesticides in this agricultural area. Besides, difenconazole and ethofumesate are of major interest due to their recurrent presence in water resources of the abovementioned Vulnerable Zone.

Initially, soil (top 0-25 cm) was collected from the riparian zone of the Salburua Wetland (located in the Vulnerable Zone), an area with no known pesticide or fertilizer application for the last 15 years. Immediately after collection, soil samples were taken to the laboratory in dark plastic bags, manually homogenized, air-dried at 25 °C during 48 h, sieved to <2 mm, and subjected to physicochemical characterization according to Sparks et al. (1996). The soil is of a Chernozem calcic character (FAO) with a clay-sandy texture, a pH of 8.3 (1:2.5 w/v in water), 17.0 g organic C kg⁻¹ dry weight (DW), 2.3 g total N kg⁻¹ DW, a C/N ratio of 7.8 and an electrical conductivity of 0.18 dS m⁻¹.

Pesticides were added to soil samples (see below) as commercial formulations, diluted in 1000 mL of deionised water, at a rate of 5 mg active ingredient kg⁻¹ DW soil: (i) Score[®] is an emulsifying concentrate with 25% of difenconazole, (ii) Audace[®] is an emulsifying concentrate with 2.5% of deltamethrin, and (iii) Kemitran[®] is a concentrated emulsion with 50% of ethofumesate. Pesticide doses correspond to the average value of the recommended field application rates for the studied pesticides, assuming a soil bulk density of 1 g cm⁻³ and an effective soil depth of 1 cm (Strickland et al., 2004).

Similarly, two fertilizers were added to soil samples at a rate of 184.5 mg N kg⁻¹ DW soil (equivalent to the recommended application rate of 61.3 kg N ha⁻¹ for sugar beet cultivation): (i) NPK synthetic fertilizer, which contained 8, 15 and 15% N (as NH₄NO₃), P (as P₂O₅) and K (as K₂O), respectively; (ii) a composted mixture of chicken manure and straw with a pH of 6.8 (1:2.5 w/v in water), 56% OM, 4.5% total N (4% organic N; 0.5% inorganic N), a C/N ratio of 9.0, 5% phosphorous, 4% potassium and an electrical conductivity of 16.8 dS m⁻¹. The NPK fertilizer and the organic compost are commercialized as grains (≈ 2 mm) and pellets (≈ 6 mm), respectively. Prior to their application, in order to facilitate a homogeneous distribution of the

fertilizer in the soil samples, grains and pellets were pulverized using a mortar and pestle, and sieved (<2 mm).

Twelve treatments were studied: (1) non-fertilized control (control = pesticide-free), (2) NPK-fertilized control, (3) compost-fertilized control, (4) difenoconazole, (5) difenoconazole + NPK fertilizer, (6) difenoconazole + compost, (7) deltamethrin, (8) deltamethrin + NPK fertilizer, (9) deltamethrin + compost, (10) ethofumesate, (11) ethofumesate + NPK fertilizer, (12) ethofumesate + compost. For each treatment, a set of three replicated mesocosms ($n = 3$) was used by transferring samples of 4 kg DW soil to 10 L plastic pots, resulting in a soil layer of approximately 10 cm. Soil moisture content was adjusted to 60% water holding capacity.

Treated soils were thoroughly mixed with a rotary mixer (Philips Handmixer, HR1570) to assure uniform distribution of pesticides and fertilizers over the entire soil samples. Pots were covered with perforated polypropylene sheets and incubated in the dark at 22 ± 1 °C, in order to minimize evaporative losses of water from soil and avoid photodegradation of pesticides. Throughout the incubation period, water content was held constant by the weekly addition of deionised water.

9.3.2. Soil microbial properties and pesticide concentration

From each mesocosm, samples of 250 g fresh weight (FW) soil were collected from the pots after 0, 7, 30, 60 and 90 days of incubation. Subsequently, soil samples were sieved (<2 mm) and stored at 4 °C until analysis.

Soil microbial basal and substrate-induced respiration were determined following ISO 16072 Norm (2002) and ISO 17155 Norm (2002), respectively. From the values of these two parameters, the respiratory quotient (Q_R), or the ratio of basal respiration to substrate-induced respiration, was calculated.

Concerning enzyme activities, urease was determined according to Kandeler and Gerber (1988). Arylsulfatase, β -glucosidase, alkaline phosphatase and dehydrogenase activities were determined according to Dick (1997) and Taylor et al. (2002), as described in Epelde et al. (2008) and Rodríguez-Loínez et al. (2008).

Potentially mineralizable nitrogen (N_{min}) was assessed following Powers et al. (1980). For nitrification rate, nitrate ($N-NO_3^-$) and ammonium ($N-NH_4^+$) concentrations were determined following Sparks et al. (1996). Denitrification potential was determined according to a modified method of Šimek et al. (2002): 75 mg $N-NO_3^-$ kg^{-1} DW soil and 75 mg C-glucose kg^{-1} DW soil (in 10 mL of deionised water) were added to 10 g DW soil placed in 120 mL serum bottles with a helium atmosphere containing 10% v/v acetylene. After 24 h of incubation at 25 °C in a rotary shaker, $N-N_2O$ production was measured by gas chromatography (KNK 3000 HRGC) using a thermal conductivity detector and a Porapak Q 80/100 3 x m 1/8" (Sugelabor) packed column. Operation conditions were as follows: column temperature, 25 °C; injection temperature, 25 °C; detector temperature, 150 °C; helium as carrier gas at a flow rate of 16 mL min^{-1} .

The concentration of pesticide residues was quantified through successive extractions with two solvents of different polarity. Initially, 5 g FW soil were extracted by shaking with 5 mL of acetonitrile for 5 min at 25 °C. After centrifugation for 5 min at 800 x g, the supernatant (S1) was collected. The same 5 g FW soil were then extracted with 5 mL of isopropanol under the same conditions to get S2 supernatant. S1 and S2 supernatants were mixed. This mixture was subjected to solid phase extraction with 1 g of Florisil® to eliminate interferences. The eluate was evaporated to dryness under a stream of N_2 . The residue was reconstituted with 2 mL of isopropanol and then filtered (0.22 μm). Extracts were analyzed by GC-MS (6890 Model) directly coupled to a 5973 inert mass spectrometry selective detector from Agilent Technologies (Palo Alto, CA). The column used was a HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.20 μm). The carrier gas was helium at a flow rate of 1.6 mL min^{-1} . Oven temperature was programmed as follows: 70 °C as initial temperature for 2 min, ramped at 25 °C min^{-1} to 250 °C, and then raised at 2 °C min^{-1} to 280 °C (this temperature was kept for 5 min). The injection (1 μL) was achieved in splitless mode, setting the injector and ion source at 250 °C and 280 °C, respectively. Samples were analyzed in Scan mode. Analytes were identified according to the mass spectrum and quantified by the area obtained for the selected target ion: difenoconazole (m/z 323), deltamethrin (m/z 181) and ethofumesate (m/z 207). Before extraction, an internal standard was added to samples. Matrix-matched

calibration curves were performed in the range 1-50 mg pesticide kg⁻¹ DW soil with a standard deviation < 15%.

9.3.3. Data analyses

Statistical analyses were performed using SPSS Software (SPSS 17, SPSS Inc., 2010). For each fertilizer and pesticide, data on soil microbial properties were analysed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with (i) incubation time and (ii) type of fertilizer or type of pesticide as factors. In figures and tables, differences between treatments at each incubation time were compared using one-way ANOVA and Fisher's PLSD post-hoc test. Values were considered to be significantly different at a 95% confidence level. Values in figures and tables correspond to the average of triplicate data (n = 3) ± standard deviations (SD). Pearson's correlation coefficients (r) and Principal Component Analysis (PCA) were performed to establish relationships among soil properties. STATISTICA 6.0 Software (Statsoft Inc., 2004) was used to fit experimental data on pesticide degradation to a bi-exponential model.

From the values of the enzyme activities, the treated-soil quality index (T-SQI) proposed by Mijangos et al. (2010) was calculated at 7 and 90 days of incubation. This index takes into account (i) the magnitude of the increment of each enzyme activity, compared to the value for that specific enzyme activity shown by the reference soil (100%; first Σ of the numerator) and (ii) the maintenance of the evenness among the enzyme activities shown by the reference soil (second Σ of the numerator):

$$T - SQI = 10^{\frac{\sum_{i=1}^n (\log n_i - \log m) - \sum_{i=1}^n |\log n_i - \log \bar{n}|}{\log m + \frac{i-1}{n}}} \quad (9.1.)$$

where *m* is the reference (mean value of enzyme activity in the reference soil at each incubation time, set to 100%) and *n* are the measured values for each enzyme activity as percentages of the reference. In this study, the untreated (neither pesticide nor fertilizer) soil was selected as reference soil.

9.4. Results

9.4.1. Pesticide degradation in soil

Pesticide degradation fitted more accurately to a bi-exponential kinetic model [$PC(t) = A \cdot e^{-k_1 \cdot t} + B \cdot e^{-k_2 \cdot t}$, where $PC(t)$ = pesticide concentration at t time; A and B = constants; k_1 and k_2 = degradation kinetic constants for the first and second component of the curve; and t = time] than to classical first-order models (Figure 9.1.). By the end of the incubation, difenoconazole, deltamethrin and ethofumesate in non-fertilized soils were degraded by 52, 85 and 93%, with half-life ($t_{1/2}$ = time required for a 50% dissipation of initial concentration) values of 86.4, 35.9 and 29.2 days, respectively (Table 9.1.). Rates of pesticide degradation were similar in NPK-fertilized and non-fertilized soils, except for ethofumesate which showed a 26% higher half-life value in NPK-fertilized soils. The application of compost, by contrast, had a stimulatory effect on difenoconazole and deltamethrin degradation ($t_{1/2}$ were 66 and 46% lower in difenoconazole- and deltamethrin-treated soils, respectively, compared to non-fertilized soils).

Table 9.1. Kinetic parameters of pesticide degradation in non-fertilized (NF), NPK-fertilized (NPK) and compost-fertilized (Compost) soils.

Pesticide	Fertilizer	A	k1 (d ⁻¹)	B	k2 (d ⁻¹)	t _{1/2} (d)	r ²
Difenoconazole	NF	4.176	0.005	0.824	4.334	86.4	0.989
	NPK	4.007	0.005	0.993	4.380	81.6	0.982
	Compost	2.075	4.567	2.925	0.005	29.7	1.000
Deltamethrin	NF	3.594	0.022	1.498	0.014	35.9	0.997
	NPK	3.211	0.020	1.874	0.020	35.6	0.999
	Compost	4.383	0.029	0.617	4.243	19.4	0.996
Ethofumesate	NF	3.222	0.022	1.537	0.022	29.2	0.985
	NPK	3.170	0.007	1.859	0.085	36.7	0.998
	Compost	3.804	0.024	0.921	0.020	27.6	0.984

Pesticide degradation in soil was described by a bi-exponential model [$PC(t) = A \cdot e^{(-k_1 t)} + B \cdot e^{(-k_2 t)}$], where $PC(t)$ = pesticide concentration at t time; A and B = constants; k_1 and k_2 = degradation kinetic constants for the first and second component of the curve; t = time]. $t_{1/2}$ = half-life or time required for a 50% dissipation of initial pesticide concentration.

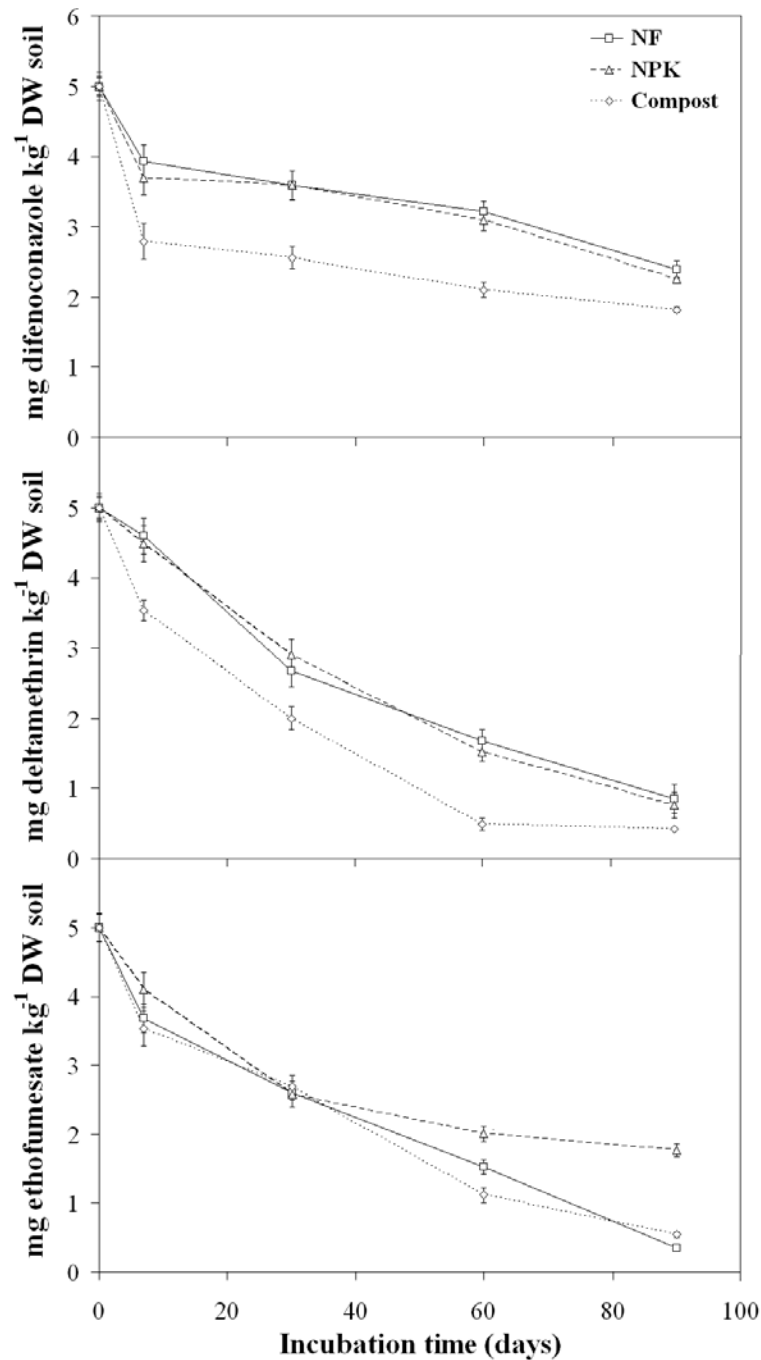


Figure 9.1. Pesticide (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) concentration in non-fertilized (NF), NPK-fertilized (NPK) and compost-fertilized (Compost) soils.

9.4.2. Effects of pesticides and fertilizers on soil microbial activity

In non-fertilized soils, at day 7, difenoconazole and deltamethrin application led to lower values (19 and 27% lower, respectively) of dehydrogenase activity compared to pesticide-free controls, while ethofumesate had no effect on this activity (Figure

9.2.A). In pesticide-free controls, NPK fertilization had no effect on dehydrogenase activity. The application of compost, by contrast, resulted in higher (on average, 35% higher) values of this parameter at day 7, 30 and 60. The abovementioned negative effect of difenoconazole and deltamethrin on dehydrogenase activity at day 7 was counteracted by NPK and compost fertilization. This phenomenon was especially accused in compost-fertilized difenoconazole-treated soils, which showed higher values of dehydrogenase activity at day 7 than their corresponding pesticide-free non-fertilized and compost-fertilized soils.

In non-fertilized soils, difenoconazole had no effect on Q_R values (Figure 9.2.B). In contrast, the application of deltamethrin and ethofumesate resulted in higher values of Q_R at day 7 (32 and 33% higher, respectively, compared to pesticide-free controls). In pesticide-free controls, no effect of NPK or compost fertilization was found regarding Q_R values. In general, NPK-fertilized soils treated with deltamethrin and ethofumesate showed lower values of Q_R than pesticide-treated non-fertilized soils. By contrast, in general, compost-fertilized soils treated with pesticides showed similar values of Q_R than pesticide-treated non-fertilized soils.

9.4.3. Effects of pesticides and fertilizers on potentially mineralizable N

In non-fertilized soils, the three pesticides had an inhibitory effect on N_{min} at day 7: 27, 30 and 14% lower values for difenoconazole, deltamethrin and ethofumesate, respectively, compared to pesticide-free controls (Figure 9.3.A). In pesticide-free soils, in general, NPK and compost fertilization led to lower and higher values of N_{min} , respectively, compared to non-fertilized controls. In NPK-fertilized soils, the addition of deltamethrin and ethofumesate led to lower values of N_{min} at day 7 (values of N_{min} in NPK-fertilized soils treated with deltamethrin and ethofumesate at day 7 were lower than their corresponding pesticide-free non-fertilized and NPK-fertilized soils). When added together to soil samples, the negative effect caused by pesticides (deltamethrin and ethofumesate) and NPK fertilization on N_{min} at day 7 was less marked than when applied separately, suggesting a short-term antagonistic interaction between NPK fertilization and both deltamethrin and ethofumesate regarding their inhibitory effect on N_{min} .

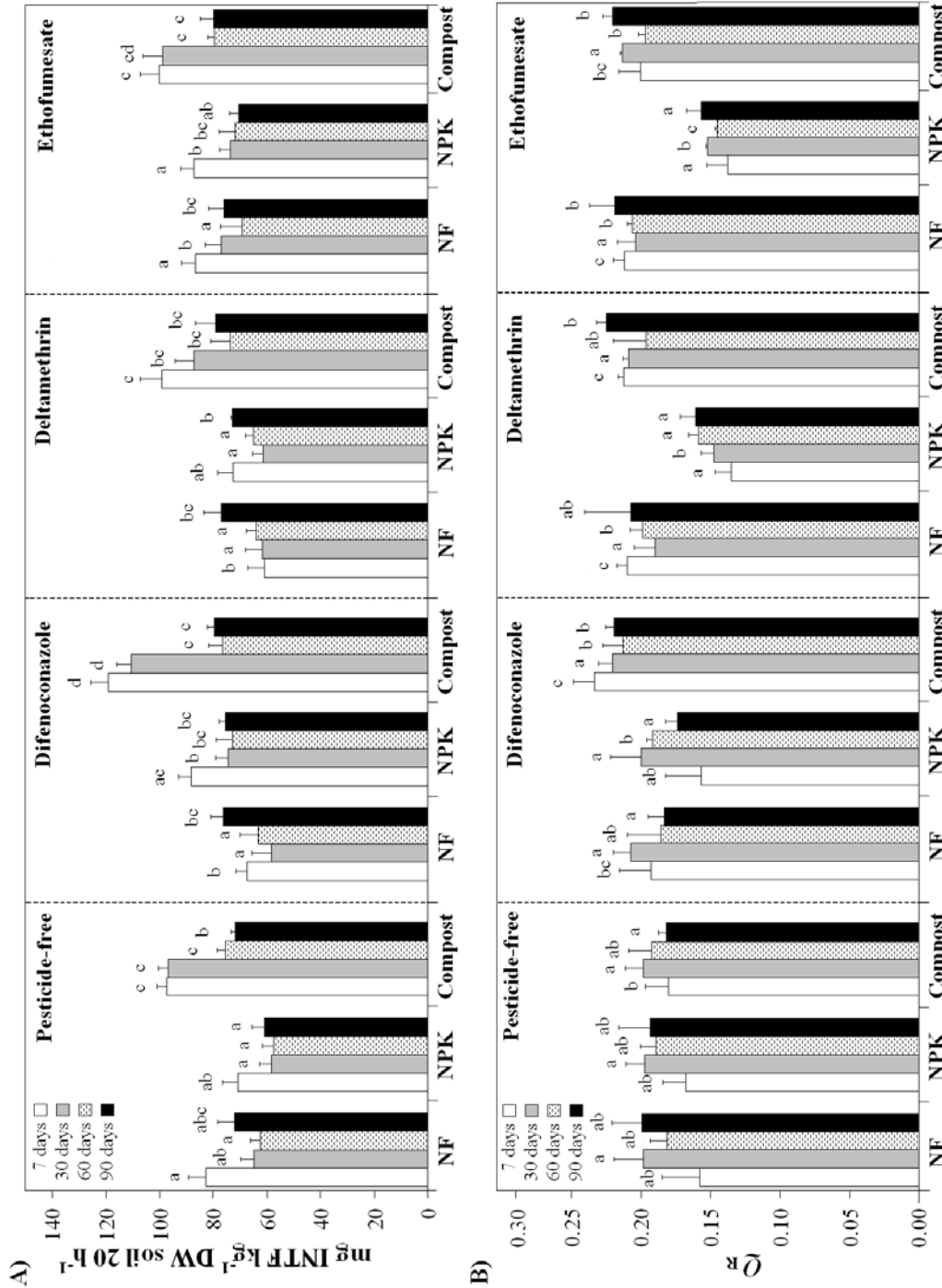


Figure 9.2. Values of (A) delhydrogenase activity and (B) the respiratory quotient (Q_R) in pesticide-free (control) and pesticide-treated soils under different fertilization treatments (NF: non-fertilized, NPK: NPK-fertilized, Compost: compost-fertilized). Values followed by different letters are significantly different according to Fisher's PLSD test at each incubation time.

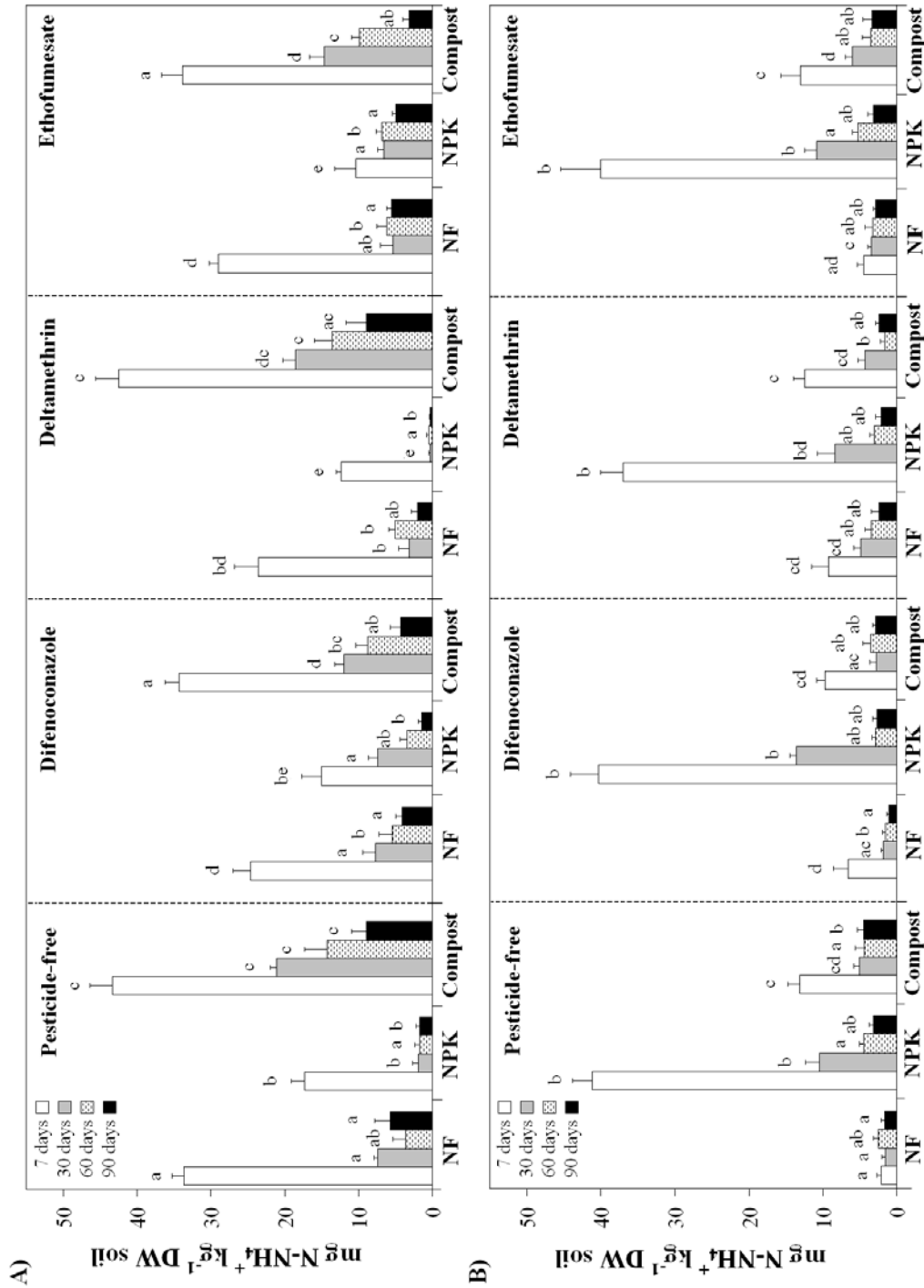


Figure 9.3. Values of (A) potentially mineralizable nitrogen (N_{mm}) and (B) $N-NH_4^+$ concentration in pesticide-free (control) and pesticide-treated soils under different fertilization treatments (NF: non-fertilized, NPK: NPK-fertilized, Compost: compost-fertilized). Values followed by different letters are significantly different according to Fisher's PLSD test at each incubation time.

Finally, the inhibitory effect of difenoconazole and ethofumesate observed in non-fertilized soils at day 7 was counteracted by the stimulatory effect caused by the addition of compost: compost-fertilized soils treated with difenoconazole and ethofumesate showed similar N_{min} values to those of non-fertilized pesticide-free controls.

9.4.4. Effects of pesticides and fertilizers on soil inorganic nitrogen

In non-fertilized soils, difenoconazole and deltamethrin application resulted in higher values of $N-NH_4^+$ at day 7 compared to pesticide-free controls (210 and 338% higher, respectively) (Figure 9.3.B). In pesticide-free soils, NPK and compost fertilization led to higher values of this parameter at day 7 and 30 (values were higher in NPK-fertilized *versus* compost-fertilized soils). Although fertilizers and pesticides (difenoconazole and deltamethrin) induced higher values of $N-NH_4^+$ at day 7 when present separately, a short-term antagonistic interaction was observed when added together: values of $N-NH_4^+$ in NPK- and compost-fertilized soils treated with difenoconazole and deltamethrin were not higher than those observed in NPK- and compost-fertilized pesticide-free controls, respectively (in fact, values of this parameter in compost-fertilized difenoconazole-treated soils were 25.7% lower than in compost-fertilized pesticide-free controls).

In non-fertilized soils, difenoconazole application caused an increase in $N-NO_3^-$ concentration values at all incubation times (on average, values were 60% higher compared to pesticide-free controls) (Figure 9.4.A). In pesticide-free controls, higher values of $N-NO_3^-$ were in general observed in NPK- and compost-fertilized soils than in non-fertilized controls (as expected, values were higher in NPK-fertilized *versus* compost-fertilized soils).

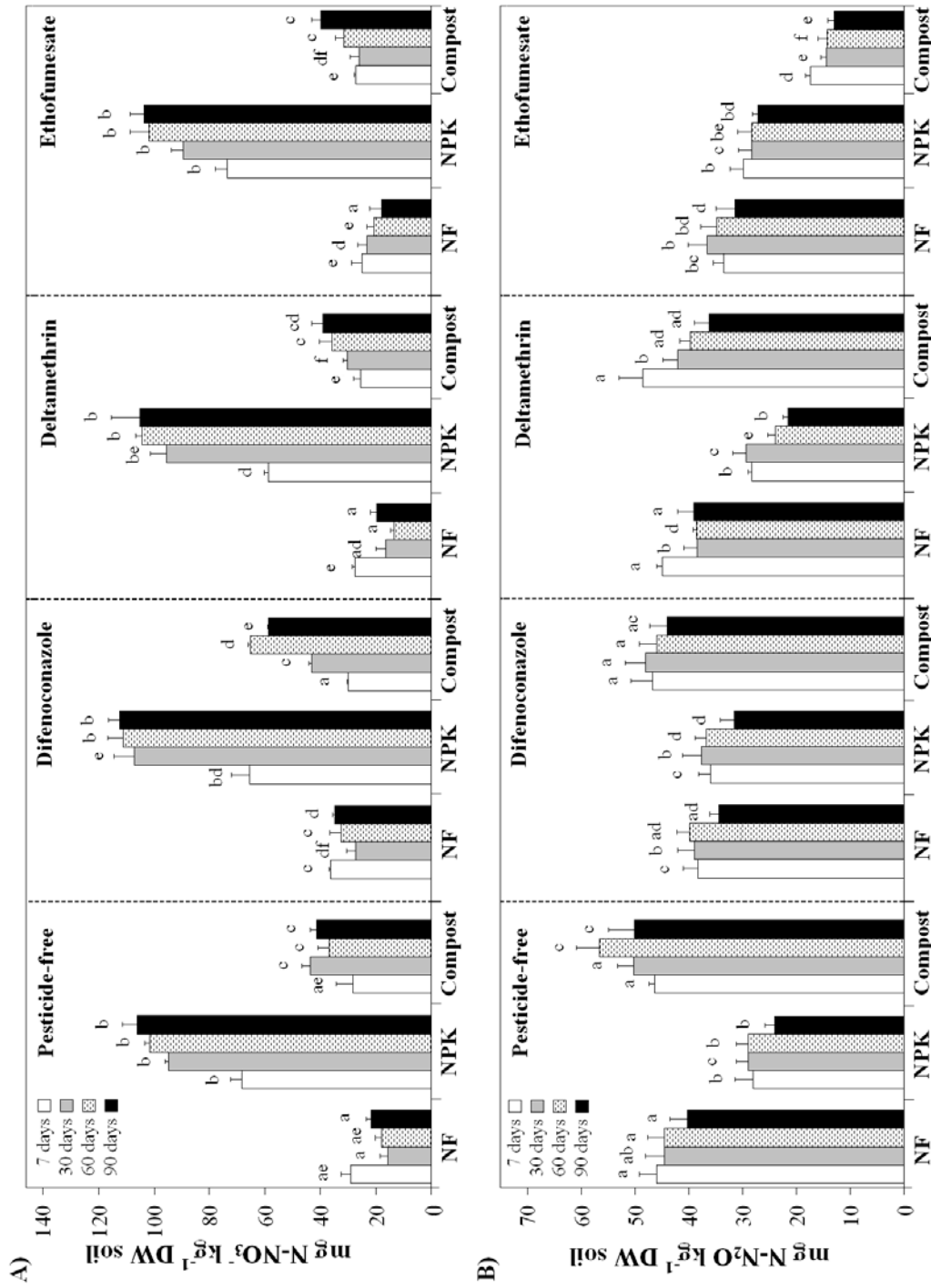


Figure 9.4. Values of (A) $N-NO_3^-$ concentration and (B) denitrification potential in pesticide-free (control) and pesticide-treated soils under different fertilization treatments (NF: non-fertilized, NPK: NPK-fertilized, Compost: compost-fertilized). Values followed by different letters are significantly different according to Fisher's PLSD test at each incubation time.

9.4.5. Effects of pesticides and fertilizers on denitrification potential

With respect to denitrification potential (Figure 9.4.B), in non-fertilized soils, lower values of this parameter were found in soils treated with difenoconazole at day 7, deltamethrin at day 60, and ethofumesate at days 7, 60 and 90. In pesticide-free controls, at all incubation times, values of denitrification potential were lower in NPK-fertilized than in non-fertilized controls (on average, 38% lower). On the contrary, in pesticide-free controls, the application of compost increased denitrification potential values at days 60 and 90. In compost-fertilized soils, the application of pesticides (especially, ethofumesate) counteracted the abovementioned stimulatory effect of compost on denitrification potential at days 60 and 90. In NPK-fertilized soils, difenoconazole and ethofumesate application counteracted the inhibitory effect of NPK fertilization on denitrification potential: in general, similar values were observed in non-fertilized and NPK-fertilized soils treated with difenoconazole and ethofumesate.

9.4.6. Effects of pesticides and fertilizers on soil quality

In non-fertilized soils, difenoconazole application had no effect on the T-SQI (Table 9.2.), while deltamethrin (at day 7 and 90) and ethofumesate (at day 90) led to lower values of this parameter. In pesticide-free controls, NPK- and compost-fertilized soils showed lower and higher T-SQI values, respectively, than non-fertilized soils. At day 7, in compost-fertilized soils, the presence of pesticides counteracted the stimulatory effect of compost on T-SQI values (this effect was more pronounced for difenoconazole application which led to lower T-SQI values in compost-fertilized *versus* non-fertilized difenoconazole-treated soils). At day 7 and 90, in NPK-fertilized soils, the presence of ethofumesate counteracted the inhibitory effect of NPK fertilizer on T-SQI values: values were not significantly different in NPK-fertilized *versus* non-fertilized ethofumesate-treated soils). In general, pesticides caused a slight negative effect on the capacity of soils to recycle nutrients (i.e., values of the T-SQI) that was counteracted at day 90 by the addition of compost.

Table 9.2. Effect of pesticides on values of the treated-soil quality index in non-fertilized (NF), NPK-fertilized (NPK) and compost-fertilized (Compost) soils at day 7 and 90 of incubation. Control = pesticide-free soil.

Time (days)	Pesticide	Fertilizer		
		NF	NPK	Compost
7	Control	100 ^a	77.4±4.6 ^b	112.1±3.4 ^c
	Difenoconazole	98.8±1.4 ^a	77.9±8.0 ^b	87.5±5.0 ^{bd}
	Deltamethrin	89.4±1.6 ^d	90.2±2.4 ^d	92.8±2.1 ^{ad}
	Ethofumesate	93.5±1.0 ^{ad}	89.6±5.9 ^{ad}	92.8±2.3 ^{ad}
90	Control	100 ^a	73.6±2.3 ^b	109.8±1.2 ^c
	Difenoconazole	91.8±4.1 ^{ad}	78.6±2.4 ^b	94.7±3.4 ^a
	Deltamethrin	86.1±1.6 ^d	80.0±1.3 ^b	95.9±5.2 ^a
	Ethofumesate	90.4±2.1 ^d	80.7±3.5 ^{bd}	100.0±2.3 ^a

Mean values (n=3) ± S.D. Values followed by different letters are significantly different at each incubation time according to Fisher's PLSD test (P<0.05). Reference value (100%): non-fertilized, pesticide-free controls.

9.4.7. Relevant correlations between parameters

Values of soil microbial properties were dependent upon type of fertilizer and incubation time for the three pesticides studied here, except for dehydrogenase activity in ethofumesate-treated soils (Table 9.3.). Significant interactions between type of fertilizer and incubation time were found for all possible combinations and most of the studied microbial properties. Similarly, values of soil microbial properties were dependent upon type of pesticide and incubation time for the three fertilization treatments studied here, except for Q_R in non-fertilized soils (Table 9.3.). Significant interactions between type of pesticide and incubation time were found for all possible combinations and most of the studied microbial properties.

Dehydrogenase activity, $N-NH_4^+$ concentration and N_{min} were positively correlated among each other (Table 9.4.). Similarly, denitrification potential, N_{min} and Q_R were positively correlated. Likewise, Q_R showed a positive correlation with dehydrogenase activity, while $N-NO_3^-$ concentration was negatively correlated with denitrification potential. A negative correlation was detected between $N-NO_3^-$ concentration and all the other parameters, except for $N-NH_4^+$ concentration.

Table 9.3. Analysis of variance for soil microbial properties as affected by type of fertilizer (F), type of pesticide (P), incubation time (T) and their interactions. Marked values (*) indicate significance at $P < 0.05$. All other values are not statistically significant.

	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N _{min}	DEH	DEN	Q _R
Type of fertilizer						
<i>Difenoconazole-treated samples</i>						
F	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
T	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.036*	<0.001*	0.003*
F x T	<0.001*	<0.001*	0.001*	0.916	<0.001*	<0.001*
<i>Deltamethrin-treated samples</i>						
F	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
T	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.013*	0.001*
F x T	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.012*	0.003*	0.003*
<i>Ethofumesate-treated samples</i>						
F	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
T	0.003*	<0.001*	<0.001*	0.539	<0.001*	<0.001*
F x T	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.899	0.261	<0.001*
Type of pesticide						
<i>Non-fertilized samples</i>						
P	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.022*
T	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.692
P x T	<0.001*	<0.001*	0.010*	0.001*	0.001*	0.227
<i>NPK-fertilized samples</i>						
P	<0.001*	0.016*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
T	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
P x T	0.003*	0.236	<0.001*	0.018*	0.004*	0.031*
<i>Compost-fertilized samples</i>						
P	<0.001*	0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.003*
T	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.001*
P x T	<0.001*	0.007*	0.178	0.001*	0.003*	0.079
N-NO ₃ ⁻ , nitrate concentration; N-NH ₄ ⁺ , ammonium concentration; N _{min} , potentially mineralizable N; DEN, denitrification potential; DEH, dehydrogenase activity; Q _R , respiratory quotient						

Table 9.4. Correlations among soil microbial properties. Marked correlations are significant at 0.05 (*) and 0.01 (**) level of probability.

	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	<i>N_{min}</i>	DEH	DEN	<i>Q_R</i>
N-NO ₃ ⁻	1					
N-NH ₄ ⁺	.167*	1				
<i>N_{min}</i>	-.401**	.232**	1			
DEH	-.248**	.155*	.605**	1		
DEN	-.354**	-.141	.311**	.133	1	
<i>Q_R</i>	-.447**	-.407**	.155*	.221**	.205**	1

N-NO₃⁻, nitrate concentration; N-NH₄⁺, ammonium concentration; *N_{min}*, potentially mineralizable N; DEH, dehydrogenase activity; DEN, denitrification potential; *Q_R*, respiratory quotient

Regarding the PCA carried out to establish relationships among soil properties (Figure 9.5.), two components absorbed 69% of the total variance: PC1 (34.5% of the total variance) was positively correlated with N-NH₄⁺ concentration, *N_{min}* and dehydrogenase activity, while PC2 (34.2% of the total variance) was positively correlated with *Q_R* and denitrification potential, and negatively with N-NO₃⁻ concentration. NPK-fertilized soils clumped together in the negative side of PC2 and were characterized by high values of N-NO₃⁻ and N-NH₄⁺ concentration, and low values of *Q_R* and denitrification potential. On the contrary, non-fertilized and compost-fertilized soils were located in the positive side of PC2 with a certain degree of overlap. For all three groups (non-fertilized, NPK-fertilized, compost-fertilized), data from day 7 were placed towards the positive side of PC1. In NPK- and compost-fertilized soils, data from day 60 and 90 were placed towards the negative side of PC1.

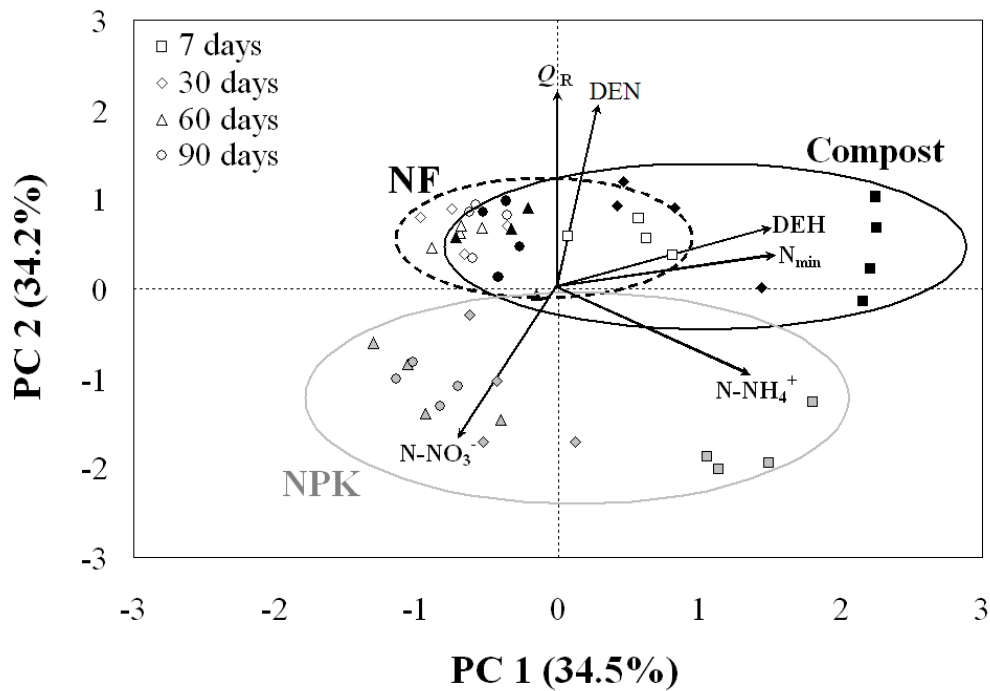


Figure 9.5. Principal component analysis based on correlations between soil microbial parameters and PC1 and PC2, at each incubation time (7, 30, 60 and 90 days). NF, non-fertilized soils (white); NPK, NPK-fertilized soils (grey); Compost, compost-fertilized soils (black). $N-NO_3^-$, nitrate concentration; $N-NH_4^+$, ammonium concentration; N_{min} , potentially mineralizable N; DEN, denitrification potential; DEH, dehydrogenase activity; Q_R , respiratory quotient.

9.5. Discussion

Among the three pesticides studied here, difenoconazole showed the highest half-life values in non-fertilized soils. Difenoconazole is a fungicide and then *a priori* expected to have more harmful non-target effects on soil microbial communities than deltamethrin (insecticide) or ethofumesate (herbicide). In any event, the degradation patterns of difenoconazole, deltamethrin and ethofumesate were different depending on the type of fertilizer: lower values of half-life were observed in compost-fertilized *versus* NPK-fertilized and non-fertilized soils. Organic amendments can reduce the bioavailability of pesticides due to their sorption to OM (Barriuso et al., 1997) but, in our study, pesticide dissipation kinetics were faster in the presence of compost. Possibly, the addition of compost resulted in higher values of overall soil microbial activity from the supply of easily available nutrients, leading to higher rates of pesticide

degradation carried out by more active microbial communities. Our results are in accordance with Thom et al. (1997) who found a stimulation of difenoconazole degradation after the application of pulverized leaves of *Tilia platyphyllosis*. In contrast, NPK-fertilization did not stimulate pesticide degradation (in fact, it negatively affected ethofumesate degradation). NPK fertilizers might certainly satisfy the microbial demand for N, P and K, but carbon and other nutrients are also needed to support microbial growth and activity (Moorman et al., 2001; Romero et al., 2010). The lower ethofumesate degradation observed in NPK-fertilized soils could be related with the fact that ethofumesate, unlike deltamethrin and difenoconazole, contains sulphur in its chemical structure: then, we hypothesize that the amount of SO_4^{-2} present in the NPK fertilizer (7.5% S- SO_4^{-2}) might reduce the use of ethofumesate as a source of sulphur by soil microbial communities, leading to lower pesticide degradation. This hypothesis appears supported by the lower values of arylsulfatase activity observed in NPK-fertilized soils (data not shown).

The study of the impact of pesticides and fertilizers on soil microbial communities is of paramount importance in order to understand and, hopefully, prevent their potential non-target effects on soil quality. In this respect, when pesticides interact with soil microorganisms not previously exposed to these agrochemicals, several processes may take place, including both inhibition and stimulation, which can be affected by the addition of fertilizers (Szelsa et al., 2008). In our study, according to the changes observed in dehydrogenase activity (an indicator of overall microbial activity), difenoconazole and deltamethrin application had an adverse short-term impact on soil microbial activity in non-fertilized soils, as previously reported for other fungicides and insecticides (Chen et al., 2001; Monkiedje et al., 2002; Cycoń et al., 2010). This pesticide-induced short-term inhibition was not detected in the presence of fertilizers.

Mineral fertilization has been reported to reduce microbial biomass and activity (Fausi and Dick, 1994). In our study, in NPK-fertilized soils, the application of difenoconazole stimulated dehydrogenase activity at 30, 60 and 90 days of incubation (higher values of this enzyme activity were also found in deltamethrin-treated soils at day 90). It is plausible that, in NPK-fertilized soils, microorganisms obtain the required carbon (to compensate for the high amounts of N, P and K) from the adjuvants and surfactants present in the commercial formulations used in this study (not from the

active ingredients themselves as higher values of pesticide biodegradation were not found in NPK-fertilized pesticide-treated soils). The same amount of N was added to soil samples during compost and NPK fertilization, but the addition of compost supplies a high amount of available organic compounds which, unlike NPK fertilization, can result in a stimulation of overall microbial activity, as reflected by the values of dehydrogenase activity in compost-fertilized pesticide-free controls. This phenomenon was especially accused in compost-fertilized soils treated with difenoconazole, which showed higher values of microbial activity than compost-fertilized controls. In compost-fertilized difenoconazole-treated soils, possible harmful effects of this fungicide on soil fungal communities may have resulted in a lower competition for the easily degradable organic compounds present in the compost, leading to rapid development of heterotrophic bacterial communities (Zhang et al., 2009) and, concomitantly, higher values of dehydrogenase activity.

The Q_R index (ratio of basal respiration to substrate-induced respiration) can reflect environmental stress in soil microbial communities (Anderson and Domsch, 1985) and, thus, a negative impact on soil quality. The higher Q_R values observed in non-fertilized soils treated with deltamethrin and ethofumesate at day 7 can be explained by a short-term pesticide-induced stress on soil microbial communities. A higher respiratory activity related to the size of microbial biomass is indicative of lower metabolic efficiency: a considerable portion of the energetic resources are used to survive, resulting in less organic C incorporation into the microbial biomass (Anderson and Domsch, 1985). This phenomenon has previously been reported for other herbicides, such as glyphosate (Gómez et al., 2009) and atrazine (Moreno et al., 2007), and fungicides like tebuconazole (Muñoz-Leoz et al., 2011). In any event, it must be taken into consideration that substrate-induced respiration provides measurement of both microbial activity (respiration) and biomass (Nielsen and Winding, 2002).

Potentially mineralizable N (N_{min}), an indicator of biologically active soil N, was positively correlated with dehydrogenase activity. The three pesticides induced a short-term adverse effect on N_{min} in non-fertilized soils. Fungicides have been reported to negatively affect N_{min} (Smith et al., 2000; Černohlávková et al., 2009). Our results, however, contrast with those of Ratcliff et al. (2006) and Devare et al. (2007) who found that herbicides like glyphosate and pyrethroid insecticides like tefluthrin can be

used as a source of N by soil microorganisms. On the other hand, in pesticide-free samples, lower and higher values of N_{min} were generally found in NPK-fertilized and compost-fertilized soils, respectively, compared to non-fertilized soils. The presence of NH_4^+ in the NPK fertilizer might have caused a product-feedback inhibition of N_{min} (Dick et al., 1988). The application of easily degradable organic N compounds present in the compost might have stimulated N mineralization (Marinari et al., 2010), counteracting the abovementioned short-term adverse effect of pesticides on N_{min} . Finally, the short-term antagonistic effect between NPK fertilization and both deltamethrin and ethofumesate application regarding their inhibitory effect on N_{min} could be due to an indirect stimulation of N mineralization by carbon compounds present in the commercial formulations or, alternatively, to the mineralization of N compounds present in the adjuvants and surfactants accompanying the active ingredient in such commercial formulations.

Nitrification and ammonification are closely related processes, as NH_4^+ oxidation during nitrification is responsible for NH_4^+ ion depletion. The simultaneous determination of soil NH_4^+ and NO_3^- concentration can be used as an indicator of disruption in soil N transformations (Černohlávková et al., 2009). As expected, both NPK- and compost-fertilized soils showed higher values of N- NH_4^+ and N- NO_3^- concentration than non-fertilized soils. Nonetheless, compost-fertilized soils showed in general lower values of N- NH_4^+ and N- NO_3^- concentration than NPK-fertilized soils, possibly owing to the fact that N_{min} from organic N sources and its subsequent nitrification are slower processes compared to NH_4NO_3 dissolution from NPK fertilizers (Burger and Jackson, 2003). The higher N- NH_4^+ concentration values observed in non-fertilized soils treated with difenoconazole and deltamethrin at day 7 could be attributed, at least partially, to pesticide-induced killing of sensitive microbial communities (e.g., fungi from the application of fungicides) and subsequent mineralization by surviving microorganisms (Cycoń et al., 2010). The increment in N- NH_4^+ concentration could also be due to pesticide-induced inhibition of nitrification; after all, pesticide-induced inhibition of nitrification has been reported by other authors for fungicides (Černohlávková et al., 2009; Muñoz-Leoz et al., 2011) and herbicides (Lang and Cai, 2009). However, according to our N- NO_3^- concentration values, nitrification appears stimulated in soils treated with difenoconazole.

We observed a short-term antagonistic effect between fertilization (NPK and compost) and difenoconazole and deltamethrin application regarding their stimulatory effect on N-NH_4^+ concentration values. This short-term antagonistic effect could be due to the fact that the high amounts of N-NH_4^+ present in the fertilizers might have inhibited the mineralization of N compounds (for instance, from dead pesticide-sensitive microorganisms) and/or stimulated nitrification. Regarding this last possibility, NPK- and compost-fertilized soils treated with difenoconazole showed higher N-NO_3^- concentration values than those observed when fertilizers and difenoconazole were present separately. In any event, both higher and lower nitrification rates have been reported for soil microorganisms exposed to fungicides (Cycoń et al., 2006; Černohlávková et al., 2009).

In general, lower values of denitrification potential were found in non-fertilized soils as a result of ethofumesate application. Cycoń et al. (2006) and Muñoz-Leoz et al. (2009) found that denitrifying microorganisms were sensitive to tebuconazole (another triazole fungicide) and deltamethrin, respectively. By contrast, Yeomans and Bremner (1985a,b) observed no inhibition, or even stimulation, of denitrification as a result of pesticide (fungicides, insecticides, herbicides) application. Nonetheless, denitrification is a process carried out by a large number of bacterial species whose response to pesticides is highly dependent on soil properties, experimental conditions, pesticide formulation, etc. The higher denitrification rates observed in compost-fertilized *versus* NPK-fertilized soils suggest that, in our soils, denitrifying microorganisms could be carbon-limited (Catanzaro and Beauchamp, 1985; Šimek et al., 2002). Besides, the easily available NO_3^- present in the NPK fertilizer might have been reduced to NO_2^- by denitrifying microorganisms, but the lack of enough supply of organic carbon needed to reduce NO_2^- to N_2O might have inhibited denitrification due to NO_2^- accumulation (Veydovec et al., 1994; Šimek et al., 2002). The higher inhibition of denitrification potential observed in ethofumesate-treated compost-fertilized *versus* non-fertilized soils could be explained by the fact that compost application led to optimal conditions for denitrification (i.e., abundant organic C and N) and, then, the inhibitory effect of ethofumesate on denitrifying microorganisms was more accused.

Enzyme activities have been widely used to assess the effects of pesticides on soil microbial communities (Albiach et al., 2000; Monkiedje et al., 2007; Muñoz-Leoz

et al., 2011). In order to obtain an integrative measurement of the effects of pesticides and fertilizers on soil enzyme activities involved in the major biogeochemical cycles (i.e., on the capacity of soil to recycle nutrients), here we used the T-SQI index proposed by Mijangos et al. (2010). Indeed, the T-SQI was calculated to assess the impact of fertilizers and pesticides on the soil's overall catalytic capacity (i.e., its capacity for nutrient cycling) and hence on soil quality, using the values obtained in non-fertilized pesticide-free soil as reference healthy soil. In the absence of pesticides, NPK fertilization caused a marked reduction of the T-SQI, possibly due to a product-feedback inhibition of enzyme activities, such as urease or alkaline phosphatase, by the presence of a high amount of inorganic N and P in the NPK-fertilizer (Dick et al., 1988). The addition of compost, by contrast, increased T-SQI values, most likely due to the presence of substrates for the studied enzymes in the compost (Albiach et al., 2000). In the absence of fertilization, deltamethrin application reduced T-SQI values at both incubation times (ethofumesate application also reduced T-SQI at day 90). The fungicide difenoconazole did not affect T-SQI values in non-fertilized soils, suggesting a more active role of bacteria *versus* fungi in the studied enzyme activities. In any case, pesticides caused a slight negative effect on the capacity of soils to recycle nutrients that was counteracted at day 90 by the addition of compost.

Finally, difenoconazole, compared to deltamethrin and ethofumesate, caused the highest impact on soil microbial properties: many studied parameters (dehydrogenase activity, N_{min} , soil NH_4^+ and NO_3^- concentration, denitrification potential) were affected by difenoconazole application at least at day 7. In addition, difenoconazole presented the lowest degradation rates and highest half-life values. Other studies have found fungicides to have the highest impact on soil microbial communities, compared to herbicides or insecticides, due to fungi being a most important component of soil microbial communities (Chen et al., 2001; Černohlávková et al., 2009). On the other hand, regarding fertilization treatments, NPK fertilization showed the most pronounced effect on soil microbial properties (Figure 9.5.). In any case, some of the most significant and permanent changes observed in the studied microbial properties correspond to soil samples treated with both fertilizer and pesticide. This fact must be taken into consideration when studying *in vitro* the effects of pesticides on soil

microbial communities and, hence, soil quality, because under real field conditions pesticides and fertilizers are generally both present in agricultural soils.

9.6. Conclusions

This work has shown that fertilizers can indeed modify pesticide degradation rates as well as the non-target effects of pesticides on soil microbial communities. This fact must be taken into account when evaluating the effects of pesticides on soil quality because, under real field conditions, both pesticides and fertilizers are simultaneously present in agricultural soils. Interestingly, compost application has stimulated the degradation rates of difenoconazole and deltamethrin, but not ethofumesate. In addition, pesticide-induced negative effects on the capacity of soil to recycle nutrients were counteracted by compost fertilization. Once more, soil microbial properties have proven to be valuable tools to assess the impact of agrochemicals on soil quality, highlighting the need to include these ecologically-relevant measurements in Ecological Risk Assessment studies regarding the non-target effects of pesticides on the soil ecosystem.

9.7. References

- Ahtainen, J.H., Vanhala, P., Myllymaki, A., 2003. Effects of different plant protection programs on soil microbes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 56-64.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F., 2000. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Bioresource Technology* 75, 43-48.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1985. Determination of eco-physiological maintenance requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biology and Fertility of Soils* 1, 81-89.
- Barriuso, E., Houot, S., Serra-Wittling, C., 1997. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pesticide Science* 49, 65-75.
- Beigel, C., Charnay, M.P., Barriuso, E., 1999. Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 525-534.

- Burger, M., Jackson, L.E., 2003. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 29-36.
- Catanzaro, J.B., Beauchamp, E.G., 1985. The effect of some carbon substrates on denitrification rates and carbon utilization in soil. *Biology and Fertility of Soils* 1, 183-187.
- Černohlávková, J., Jarkovský, J., Hofman, J., 2009. Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 80-85.
- Chen, S.K., Edwards, C.A., Subler, S., 2001. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1971-1980.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., Kaczyńska, A., Kozdrój, J., 2006. Microbiological characteristics of a sandy loam soil exposed to tebuconazole and λ -cyhalothrin under laboratory conditions. *Ecotoxicology* 15, 639-646.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., Kozdrój, J., 2010. Microbial characteristics of sandy soils exposed to diazinon under laboratory conditions. *World Journal of Microbial Biotechnology* 26, 409-418.
- Devare, M., London-R, L.M., Thies, J.E., 2007. Neither transgenic Bt maize (MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affect soil microbial activity or biomass: A 3-year field analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2038-2047.
- Dick, R.P., 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R, (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 121-156.
- Dick, R.P., Rasmussen, P.E., Kerle, E.A., 1988. Influence of long-term residue management on soil enzyme activities in relation to soil chemical properties of a wheat-fallow system. *Biology and Fertility of Soils* 6, 159-164.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Hernández-Allica, J., Barrutia, O., Garbisu, C., 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology* 39, 299-310.
- Fausi, M.F., Dick, R.P., 1994. Soil microbial dynamics: short- and long-term effects of inorganic and organic nitrogen. *Soil Science Society of American Journal* 58, 801-806.
- Gómez, E., Ferreras, L., Lovotti, L., Fernández, E., 2009. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a vertic argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology* 45, 163-167.
- Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Zárate, O., Garbisu, C., 2006. Assessment of the efficiency of a metal phytoextraction process with biological indicators of soil health. *Plant Soil* 281, 147-158.

- ISO 16072, 2002. Soil quality - Laboratory Methods for Determination of Microbial Soil Respiration.
- ISO 17155, 2002. Soil quality - Determination of Abundance and Activity of Soil Microflora using Respiration Curves.
- Kadian, N., Gupta, A., Satya, S., Mehta, R.K., Malik, A., 2008. Biodegradation of herbicide (atrazine) in contaminated soil using various bioprocessed material. *Bioresource Technology* 99, 4642-4647.
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* 6, 68-72.
- Lang, M., Cai, Z., 2009. Effects of chlorothalonil and carbendazim on nitrification and denitrification in soils. *Journal of Environmental Science* 21, 458-467.
- Lipthay, J.R., Sørensen, S.R., Aamand, J., 2007. Effect of herbicide concentration and organic and inorganic nutrient amendment on the mineralization of mecoprop, 2,4-D and 2,4,5-T in soil and aquifer samples. *Environmental Pollution* 148, 83-93.
- Lupwayi, N.Z., Brandt, S.A., Harker, K.N., O'Donovan, J.T., Clayton, G.W., Turkington, T.K., 2010. Contrasting soil microbial responses to fertilizers and herbicides in a canola-barley rotation. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1997-2004.
- Marinari, S., Lagomarsino, A., Moscatelli, M.C., Di Tizio, A., Campiglia, E., 2010. Soil carbon and nitrogen mineralization kinetics in organic and conventional three-year cropping systems. *Soil and Tillage Research* 109, 161-168.
- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B., 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 453-461.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Ronchi, V., Bauer, C., 2000. Kinetic parameters of dehydrogenase in the assessment of the response of soil to vermicompost and inorganic fertilisers. *Biology and Fertility of Soils* 32, 479-483.
- Mijangos, I., Becerril, J.M., Albizu, I., Epelde, L., Garbisu, C., 2009. Effects of glyphosate on rizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 505-513.
- Mijangos, I., Albizu, I., Epelde, L., Amezaga, I., Mendarte, S., Garbisu, C., 2010. Effects of liming on soil properties and plant performance of temperate mountainous grasslands. *Journal of Environmental Management* 91, 2066-2074.
- Monkiedje, A., Ilori, M.O., Spiteller, M., 2002. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1939-1948.
- Monkiedje, A., Spiteller, M., Maniepi, S.J.N., Sukul, P., 2007. Influence of metalaxyl- and mefenoxam-based fungicides on chemical and biochemical attributes of soil quality under field conditions in a southern humid forest zone of Cameroon. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 836-842.

- Moorman, T.B., Cowan, J.K., Arthur, E.L., Coats, J.R., 2001. Organic amendments to enhance herbicide biodegradation in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 541-545.
- Moreno, J.L., Aliaga, A., Navarro, S., Hernández, T., García, C., 2007. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. *Applied Soil Ecology* 35, 120-127.
- Muñoz-Leoz, B., Garbisu, C., Antigüedad, I., Alonso, M.L., Alonso, R.M., Ruiz-Romera, E., 2009. Deltamethrin degradation and soil microbial activity in a riparian wetland soil. *Soil Science* 174, 220-228.
- Muñoz-Leoz, B., Ruiz-Romera, E., Antigüedad, I., Garbisu, C., 2011. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2176-2183.
- Nielsen, M.N., Winding, A., 2002. Microorganisms as Indicators of Soil Health. National Environmental Research Institute, Technical Report No. 388, Denmark.
- Pavel, E.W., López, A.R., Berry, D.F., Smith, E.P., Reneau, R.B., Mostaghimi, S., 1999. Anaerobic degradation of dicamba and metribuzin in riparian wetland soils. *Water Research* 33, 87-94.
- Powers, R.F., 1980. Mineralizable soil nitrogen as an index of nitrogen availability to forest trees. *Soil Science Society of America Journal* 44, 1314-1320.
- Ratcliff, A.W., Busse, M.D., Shestak, C.J., 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology* 34, 114-124.
- Rodríguez-Loinaz, G., Onaindia, M., Amezaga, I., Mijangos, I., Garbisu, C., 2008. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 49-60.
- Romero, E., Fernández-Bayo, J., Castillo Díaz, J.M., Nogales, R., 2010. Enzyme activities and diuron persistence in soil amended with vermicompost derived from spent grape marc and treat urea. *Applied Soil Ecology* 44, 198-204.
- Sánchez, M.E., Estrada, I.B., Martínez, O., Martín-Villacorta, J., Aller, A., Morán, A., 2004. Influence of the application of sewage sludge on the degradation of pesticides in the soil. *Chemosphere* 57, 673-679.
- Šimek, M., Elhottová, D., Hopkins, D.W., 2002. What is the so-called optimum pH for denitrification in soil? *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1227-1234.
- Smith, M.D., Hartnett, D.C., Rice, C.W., 2000. Effect of long-term fungicide application on soil microbial properties in tallgrass prairie soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 935-946.
- Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., 1996. *Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America Book Series, Madison, WI.

- Strickland, T., Potter, T.L., Joo, H., 2004. Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation. *Pest Management Science* 60, 703-709.
- Szelsa, R., Rao, M.A., Gianfreda, L., 2008. Response of an agricultural soil to pentachlorophenol (PCP) contamination and the addition of compost or dissolved organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2162-2169.
- Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 387-401.
- Thom, E., Ottow, J.C.G., Benckiser, G., 1997. Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment. *Environmental Pollution* 96, 409-414.
- Veydovec, W., Silverstein, J., Cook, N.E.Jr., Figueroa, L., Hund, R., Lehnkuhl, G., 1994. Denitrification Inhibition by High Nitrate Wastes, *Proceedings of the ASCE Nat. EE Conf. ASCE, New York, NY*, pp. 415-422.
- Yeomans, J.C., Bremner, J.M., 1985a. Denitrification in soil: Effects of insecticides and fungicides. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 453-456.
- Yeomans, J.C., Bremner, J.M., 1985b. Denitrification in soil: Effects of herbicides. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 447-452.
- Zhang, B., Bai, Z., Hoefel, D., Tang, L., Wang, X., Li, B., Li, Z., Zhuang, G., 2009. The impact of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Science of the Total Environment*, 407, 1915-1922.

10

- 10.1. Abstract
- 10.2. Introduction
- 10.3. Materials and methods
- 10.4. Results
- 10.5. Discussion
- 10.6. Conclusions
- 10.7. References

Results and discussion VI:

**Non-target effects of three
pesticides on microbially-mediated
processes in a clay-loam soil**

*“Sorprenderse, extrañarse, es comenzar a
entender”*

José Ortega y Gasset (1883-1955)

10. Non-target effects of three pesticides on microbially-mediated processes in a clay-loam soil

Submitted to Soil Biology & Biochemistry in February 2012.

10.1. Abstract

A mesocosm experiment was performed to study non-target effects of difenoconazole (fungicide), deltamethrin (insecticide) and ethofumesate (herbicide) on microbial parameters in a clay-loam soil. Pesticides were applied, as commercial formulations, to soil samples at three different concentrations (5, 50 and 500 mg kg⁻¹ dry weight soil) and then incubated under laboratory conditions for 3 months. Throughout the incubation period, microbial parameters were determined at 7, 30, 60 and 90 days: basal respiration, substrate-induced respiration, potentially mineralizable nitrogen, nitrification rate, denitrification potential and enzyme activities (dehydrogenase, β -glucosidase, urease, arylsulfatase, alkaline phosphatase). Diversity of ammonium-oxidizing bacteria was also examined. Pesticide degradation rates decreased with increasing pesticide concentrations: half-lives varied from 85 to 546 days for

difenoconazole, from 29 to 1381 days for deltamethrin, and from 29 to 5923 days for ethofumesate. In general, at field application rates (5 mg kg^{-1} DW soil), none of the three pesticides caused significant changes in soil microbial communities. However, at higher pesticide concentrations, adverse impacts on soil microbial communities were detected. In particular, at 500 mg kg^{-1} DW soil, pesticide application decreased overall soil microbial activity and negatively affected the capacity of the soil to recycle nutrients. At high concentrations, difenoconazole and ethofumesate, but not deltamethrin, caused a pesticide-induced stress on soil microbial communities. Besides, deltamethrin and ethofumesate at 50 and 500 mg kg^{-1} DW soil resulted in lower values of denitrification potential. It was concluded that pesticide concentration affects both pesticide dissipation kinetics in soil and their impact on soil microbial parameters.

10.2. Introduction

As a result of the use and/or misuse of agricultural pesticides, pesticide contamination is nowadays an environmental problem of great concern (Pimentel, 1995). A considerable amount of the applied pesticides frequently ends up in the soil, where it can undergo biological and physicochemical transformations. In any case, once in the soil, microbial degradation has been reported as the main route of pesticide removal (Bending et al., 2006). Pesticides are designed as more or less inhibitors of biological targets, and therefore it is not surprising to observe harmful effects on non-target organisms, including soil microbial communities (Marschner et al., 2003; Romero et al., 2010), with concomitant negative consequences for soil quality (Johnsen et al., 2001; Niemi et al., 2009).

In this respect, since soil microbial communities play a key role in many soil processes and the delivery of essential ecosystem services (Jeffery et al., 2010), soil microbial parameters related to the biomass, activity and diversity of soil microbial communities can be most useful indicators of the impact of disturbances (including pesticide application) on soil quality (Epelde et al., 2009; Mijangos et al., 2009; Garbisu et al., 2011; Muñoz-Leoz et al., 2011). In particular, microbial parameters that provide information on the soil nitrogen cycle (*e.g.*, rates of nitrogen mineralization, nitrification

and denitrification) have been reported to be very sensitive to pesticide application (Ahtiainen et al., 2003).

Depending on its specific composition, as well as other factors such as type of soil and soil properties, pesticides frequently show slow rates of degradation in soil. In consequence, repeated application of pesticides can ultimately lead to their accumulation in concentrations detrimental to soil microbial communities (Munier-Lamy and Borde, 2000; Rice et al., 2002).

In the present study, three functionally different pesticides (difenoconazole: fungicide, deltamethrin: insecticide, ethofumesate: herbicide) were applied, under laboratory conditions, at three different concentrations (5, 50 and 500 mg active molecule kg⁻¹) to a riparian wetland soil with no previous history of pesticide application in order to (i) determine their dissipation kinetics and (ii) assess their impact on soil microbial parameters. The recommended approach for assessing the effects of pesticides on soil microbial communities includes the simultaneous measurement of multiple ecological end-points (Zabaloy et al., 2008) and, thus, throughout the three-month mesocosm experiment, different microbial parameters with potential as bioindicators of soil quality were determined at regular intervals: basal respiration, substrate-induced respiration, potentially mineralizable nitrogen (N_{min}), nitrification rate, diversity of ammonium-oxidizing bacteria, denitrification potential and enzyme activities (dehydrogenase, β -glucosidase, urease, arylsulfatase, alkaline phosphatase). Finally, from the values of the soil enzyme activities, the treated-soil quality index (T-SQI) proposed by Mijangos et al. (2010) was calculated.

10.3. Materials and methods

10.3.1. Soil characterization

Soil (top 0-25 cm) was collected from an area with no known pesticide application for the last 15 years, the riparian zone of the Salburua wetland, located in the Vulnerable Zone of the Quaternary Aquifer of Vitoria-Gasteiz (northern Spain). Immediately after collection, soil samples were taken to the laboratory in dark plastic bags, homogenized, air-dried at 25 °C during 48 h, sieved to <2 mm, and subjected to

physicochemical characterization according to Sparks et al. (1996). The soil is of a Chernozem calcic character (FAO) with a clay-loam texture, a pH of 8.3 (1:2.5 w/v in water), 17.0 g organic C kg⁻¹ dry weight (DW), 2.3 g total N kg⁻¹ DW, a C/N ratio of 7.8 and an electrical conductivity of 0.18 dS m⁻¹.

10.3.2. Pesticide application

The three functionally different pesticides studied here (difenoconazole: fungicide, deltamethrin: insecticide, ethofumesate: herbicide) are intensively used in the abovementioned Vulnerable Zone, as they are included in the Code of Good Agricultural Practices for sugar beet cultivation in this agricultural area. Besides, difenoconazole and ethofumesate are of major interest due to their recurrent presence in water resources of the Vulnerable Zone.

In order to more closely simulate real field conditions, pesticides were applied as commercial formulations since adjuvants and surfactants present in such formulations may affect both pesticide degradation rates and their impact on soil microbial communities (Beigel et al., 1999). Thus, the experimental soil was subjected to the following commercial formulations: (i) Score[®] is an emulsifying concentrate containing 25% of difenoconazole (1-[2-[2-chloro-4-(4-chlorophenoxy) phenyl]-4-methyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl]-1H-1,2,4-triazole); (ii) Audace[®] is an emulsifying concentrate containing 2.5% of deltamethrin ((S)-cyano(3-phenoxyphenyl)methyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromoethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate)); and (iii) Kemitran[®] is a concentrated emulsion with 50% of ethofumesate ((2-ethoxy-2,3-dihydro-3,3-dimethyl-5-benzofuranyl methanesulfonate)).

10.3.3. Experimental design

A three-month mesocosm study was carried out as previously described in Muñoz-Leoz et al. (2011). For each pesticide concentration (5, 50 and 500 mg active molecule kg⁻¹ DW soil), a set of four replicated mesocosms was prepared by transferring samples of 4 kg DW soil to 10 L plastic trays, resulting in a soil layer of approximately 10 cm depth.

Each soil sample was treated with the abovementioned commercial formulations diluted in deionized water, at a rate of 5-50-500 mg active molecule kg⁻¹ DW soil and 60% water holding capacity (WHC). The lowest pesticide concentration used here corresponds to the average value of the recommended field application rates for the studied pesticides, assuming a soil bulk density of 1 g cm⁻³ and an effective soil depth of 1 cm (Strickland et al., 2004). The other concentrations (50 and 500 mg kg⁻¹ DW soil) were chosen following standard ecotoxicological practice for establishing negative effects of a given substance in the environment (Chen and Edwards, 2001; Cycoń et al., 2006).

Pesticide-treated soil samples were thoroughly mixed with a rotary mixer (Philips handmixer, HR1570) to assure uniform pesticide distribution. Trays were then covered with perforated polypropylene sheets and incubated in the dark at 22 ± 1 °C, in order to minimize evaporative losses of water from soil and avoid photodegradation of pesticides. Throughout the incubation period, water content was held constant by the weekly addition of deionized water.

From each mesocosm, samples of 250 g fresh weight (FW) soil were collected from the trays after 0, 7, 30, 60 and 90 days of incubation. Subsequently, soil samples were sieved (<2 mm) and stored at 4 °C until analysis.

10.3.4. Soil microbial parameters

Soil microbial basal (R_B) and substrate-induced (SIR) respiration were determined following ISO 16072 Norm (2002) and ISO 17155 Norm (2002), respectively. The respiratory quotient Q_R , or the ratio of basal respiration to substrate-induced respiration ($Q_R = R_B/SIR$) was also calculated (Anderson and Domsch, 1985).

Urease activity was determined according to Kandeler and Gerber (1988). Arylsulfatase, β -glucosidase, alkaline phosphatase and dehydrogenase activities were determined according to Dick (1997) and Taylor et al. (2002), as described in Epelde et al. (2008) and Rodríguez-Loinaz et al. (2008).

Potentially mineralizable nitrogen (N_{min}) was assessed following Powers (1980). For nitrification rate, nitrate (N-NO₃⁻) and ammonium (N-NH₄⁺) concentrations in soil

were determined following Sparks et al. (1996). Denitrification potential was determined according to a modified method of Šimek et al. (2002): 75 mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ DW soil and 75 mg C-glucose kg⁻¹ DW soil (in 10 mL of deionized water) were added to 10 g DW soil placed in 120 mL serum bottles with a helium atmosphere containing 10% v/v acetylene. After 24 h of incubation at 25 °C in a rotary shaker, N-N₂O production was measured by gas chromatography (KNK 3000 HRGC) using a thermal conductivity detector and a Porapak Q 80/100 3 m x 1/8" (Sugelabor) packed column. Operation conditions were as follows: column temperature, 25 °C; injection temperature, 25 °C; detector temperature, 150 °C; helium as carrier gas at a flow rate of 16 mL min⁻¹.

10.3.5. Diversity of microbial communities

To estimate diversity of ammonium-oxidizing bacteria through PCR-DGGE analysis, DNA was extracted from soil samples (0.25 g FW soil) using the PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, California, USA) following manufacturer's instructions. The concentration of DNA in the extracts was determined on a 1% agarose gel containing 1 µg mL⁻¹ of ethidium bromide and known quantities of standard DNA. The intensity of DNA bands under UV illumination was determined by calculating peak areas with Bio-profil V99 software program (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Then, *amoA* genes were PCR-amplified using primers *amoA*-F1-GC and *amoA*-R1 following Avrahami et al. (2003). Amplification for *amoA* was carried out in 50 µl reaction mixtures containing 50 ng DNA, 1 x GoTaq Flexi buffer (Promega Corporation, Madison, WI), 0.16 mg mL⁻¹ BSA, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 µM of each primer, 400 µM of each dNTP, 1 U GoTaq Hot Start Polymerase (Promega M 5001). PCR cycling was carried out in a MJ Research PTC-200 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using the following program: 94 °C for 1 min; 35 cycles of 94 °C for 45 s, 57 °C for 30 s and 72 °C for 60 s; and a final extension at 72 °C for 7 min. Length of PCR products were checked on 1% agarose gels. After DNA amplification, 100 ng samples of PCR products from each of the four replicates were pooled for DGGE analysis.

DGGE analysis was performed according to Avrahami et al. (2003) using a DCode universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Amplification products were loaded on a 6 % (wt/vol) acrylamide gel [0.5 x Tris-acetate-EDTA (TAE), 37:1 acrylamide-bisacrylamide], with a denaturing gradient from 45 to 65% (with 100% of denaturant corresponding to 7 M urea and 40% deionized formamide). Gels were run at 100 V (constant voltage) and 60 °C for 17 h in 0.5 x TAE, stained with SYBR green (Sigma-Aldrich) diluted x 2,000 for 30 min and washed during 15 minutes with deionized water prior to UV transillumination. Gel images were camera captured under UV light, using Vision-Capt software (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). DNA bands were assigned to gel tracks using Quantity One Software (Bio-Rad Richmond, USA). One DNA sample (untreated control at day 90) was included in all DGGE gels to allow calibration in further analysis.

Diversity of ammonium-oxidizing bacteria was estimated using the Shannon's diversity index ($H' = - \sum p_i \log_2 p_i$), where p_i is the ratio between specific band intensity and total intensity of all bands in a lane sample after subtracting the background of each lane (Qu and Wang, 2008).

10.3.6. Pesticide concentration

The concentration of pesticide residues was quantified through two successive extractions with acetonitrile (firstly) and isopropanol (secondly) followed by GC-MS analysis as described in Muñoz-Leoz et al. (2012).

10.3.7. Data analyses

Statistical analyses were performed using SPSS Software (SPSS 17, SPSS Inc., 2010). Data on soil parameters were analysed using a three-way analysis of variance (ANOVA), with pesticide concentration, type of pesticide and incubation time as factors. Differences between controls and samples treated with different concentration of pesticides, at a given incubation time, were compared using one-way ANOVA and Fisher's PLSD post-hoc test. Values were considered to be significantly different at $P < 0.05$. Pearson's correlations and Principal Component Analysis (PCA) were performed

to establish relationships among soil parameters. STATISTICA 6.0 Software (Statsoft Inc., 2004) was used to fit experimental data on pesticide degradation to a bi-exponential model.

From the values of the enzyme activities, the treated-soil quality index (T-SQI) proposed by Mijangos et al. (2010) was calculated at each incubation time:

$$T - SQI = 10^{\log m + \frac{\sum_{i=1}^n (\log n_i - \log m) - \sum_{i=1}^n |\log n_i - \log \bar{n}|}{n}} \quad (10.1.)$$

where m is the reference (mean value of enzyme activity in the control untreated “reference” soil at each incubation time, set to 100%) and n are the measured values for each enzyme activity as percentages of the reference. This index takes into account (i) the magnitude of the increment of each enzyme activity, compared to the value for that specific enzyme activity shown by the reference soil (100%; first Σ of the numerator) and (ii) the maintenance of the evenness among the enzyme activities shown by the reference soil (second Σ of the numerator).

10.4. Results

10.4.1. Pesticide dissipation in soil

The evolution of the three pesticides concentration in soil fitted more accurately to a bi-exponential kinetic model [$PC(t) = A \cdot e^{-k_1 \cdot t} + B \cdot e^{-k_2 \cdot t}$, where $PC(t)$ = pesticide concentration at t time; A and B = constants; k_1 and k_2 = dissipation kinetic constants for the first and second component of the curve; and t = time] than to classical first-order models (Figure 10.1.). In soils treated with 5 mg pesticide kg^{-1} DW, by the end of the incubation time, initial pesticide concentration was reduced by 52, 69 and 89% for difenoconazole, deltamethrin and ethofumesate, respectively, with corresponding half-life times of 84.9, 29.0 and 28.5 days (Table 10.1.). Dissipation kinetics were strongly dependent upon concentration as higher values of half-life time were observed at increasing pesticide concentrations (Table 10.1.). Regarding ethofumesate, no significant dissipation was observed at the highest concentration tested throughout the 3-month incubation period.

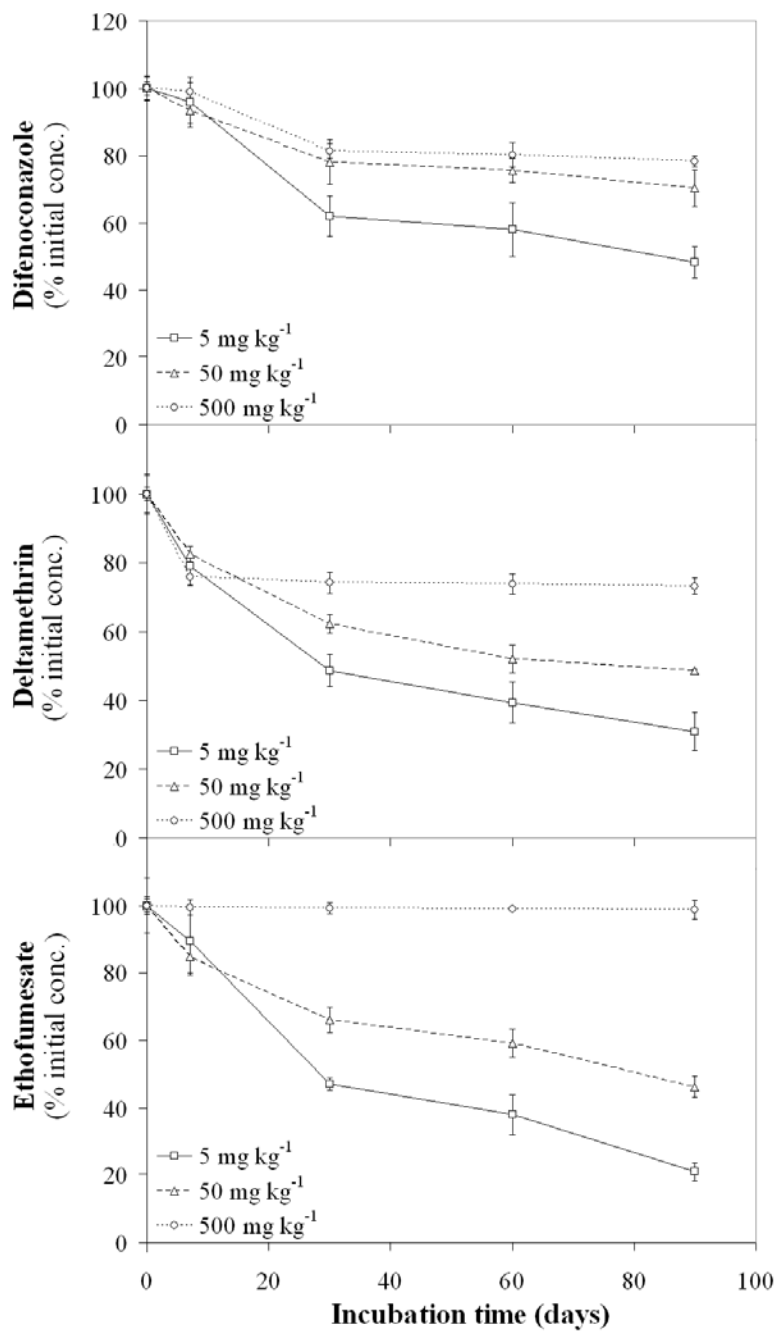


Figure 10.1. Pesticide (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) concentration in soil throughout the experiment. Pesticide concentration at a given incubation time is expressed as % of initial pesticide concentration. Mean values ($n=4$) \pm S.D.

Table 10.1. Kinetic parameters of pesticide dissipation in soil for difenoconazole, deltamethrin and ethofumesate at the three initial concentrations studied.

Pesticide	Concentration (mg kg ⁻¹ DW)	A	k1 (d ⁻¹)	B	k2 (d ⁻¹)	t _{1/2} (d)	r ²
Difenoconazole	5	2.6	0.0375	2.6	0.0008	84.9	0.983
	50	39.8	0.0013	10.5	0.0643	362	0.995
	500	263.1	-0.0035	245.2	0.0217	546	0.975
Deltamethrin	5	2.3	0.0783	2.7	0.0061	29.0	1.000
	50	31.9	0.0031	18.0	0.0804	78.0	0.999
	500	372.4	0.0002	127.6	0.4032	1381	1.000
Ethofumesate	5	1.9	0.0473	3.2	0.0116	28.5	0.994
	50	39.7	0.0057	10.4	0.1331	81.2	0.997
	500	304.8	0.0014	194.4	-0.0017	5923	0.960

Pesticide dissipation in soil was described by a bi-exponential model [$PC(t) = A \cdot e^{(-k_1 \cdot t)} + B \cdot e^{(-k_2 \cdot t)}$], where $PC(t)$ = pesticide concentration at t time; A and B = constants; k_1 and k_2 = dissipation kinetic constants for the first and second component of the curve; t = time]. $t_{1/2}$ = half-life or time required for a 50% dissipation of initial pesticide concentration.

10.4.2. Pesticide impact on soil microbial parameters

In general, values of soil microbial parameters were dependent upon type of pesticide, pesticide concentration and incubation time (Table 10.2.). Significant interactions between these three factors were found for dehydrogenase activity, Q_R , N_{min} , soil $N-NH_4^+$ and $N-NO_3^-$ concentration, denitrification potential and T-SQI (Table 10.2.). Nonetheless, diversity of ammonium-oxidizing bacteria did only show significant dependence upon type of pesticide.

Table 10.2. Analysis of variance for soil microbial parameters as affected by type of pesticide (*P*), pesticide concentration (*C*), incubation time (*T*) and their corresponding interactions. Non-significant values ($P > 0.05$) were excluded.

Factor	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	<i>N</i> _{min}	DEN	DEH	<i>Q</i> _R	T-SQI	<i>H'</i> -AOB
P	0.020	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
C	<0.001	<0.001	0.009	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-
T	<0.001	<0.001	<0.001	0.009	<0.001	0.007	<0.001	-
P x C	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-
P x T	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.023	-
C x T	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-
P x C x T	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.018	-

N-NO₃⁻, nitrate concentration; N-NH₄⁺, ammonium concentration; *N*_{min}, potentially mineralizable nitrogen; DEN, denitrification potential; DEH, dehydrogenase activity; *Q*_R, respiratory quotient; T-SQI, treated-soil quality index; *H'*-AOB, Shannon's index of ammonium-oxidizing bacteria diversity.

Dehydrogenase activity showed a biphasic pattern: higher values at day 7 than at day 30, 60 and 90 (Figure 10.2.A). In soils treated with 5 and 50 mg pesticide kg⁻¹ DW, aside from some isolated significant differences which formed no pattern, pesticides had no significant effect on dehydrogenase activity, as compared to untreated controls. At 500 mg pesticide kg⁻¹ DW, significantly lower values of dehydrogenase activity were found at all incubation times for both difenoconazole- and deltamethrin-treated soils (on average, 53.6 and 52.4% lower, respectively, compared to controls); similarly, 500 mg ethofumesate kg⁻¹ DW soil resulted in significantly lower values of this enzyme activity at day 60 and 90.

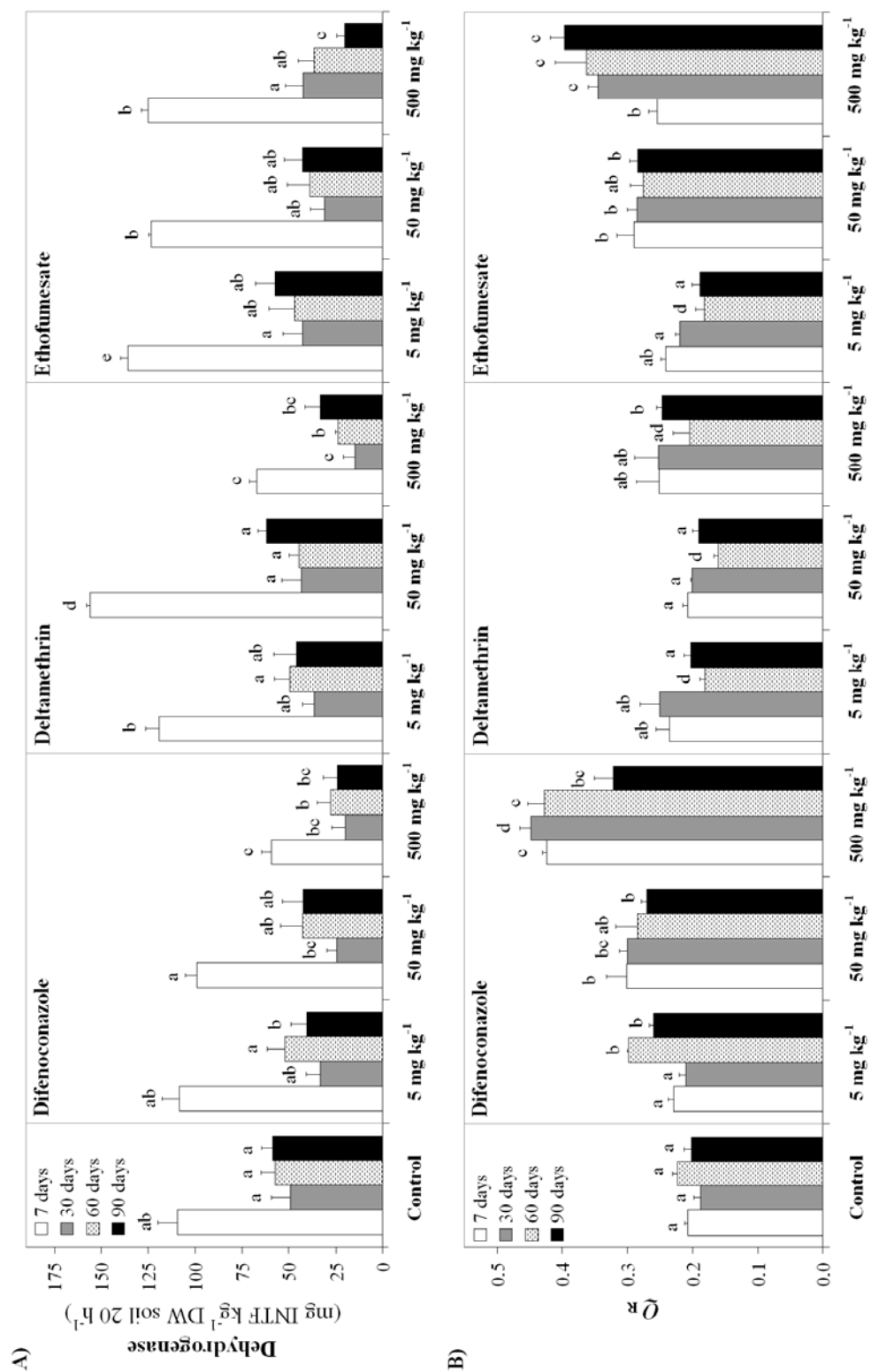


Figure 10.2. Effect of pesticides (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) at 5, 50 and 500 mg kg⁻¹ DW soil on (A) dehydrogenase activity and (B) the respiratory quotient. Mean values (n=4) ± S.D. Different letters indicate statistically significant differences among treatments according to Fisher's PLSD test at each incubation time.

Regarding Q_R (Figure 10.2.B), at 5 mg pesticide kg^{-1} DW soil, in general, no clear differences were observed between pesticide-treated and control soils. However, higher values of Q_R were generally found in samples treated with 50 and 500 mg kg^{-1} of difenoconazole and ethofumesate compared to untreated soils. In addition, in difenoconazole-treated soils, higher Q_R values were observed at 500 *versus* 50 mg kg^{-1} DW at day 7, 30 and 60; likewise, in ethofumesate-treated soils, higher Q_R values were observed at 500 *versus* 50 mg kg^{-1} DW at day 60 and 90.

As described for dehydrogenase activity, N_{\min} values showed a biphasic pattern: higher values at day 7 than at day 30, 60 and 90 (Figure 10.3.A). Pesticide application at 5 mg kg^{-1} DW soil had no effect on N_{\min} values. By contrast, at day 7, the addition of 50 and 500 mg pesticide kg^{-1} DW soil led to significant lower values of N_{\min} in difenoconazole- and ethofumesate-treated soils, and significant higher values in deltamethrin-treated soils. Likewise, at the highest concentration, significantly lower values of N_{\min} were observed at day 90 for all three pesticides.

Concerning nitrification rate (Figures 10.3.B and 10.4.A), except for ethofumesate at 5 mg kg^{-1} DW, all soils treated with pesticides showed significantly higher values of N-NH_4^+ concentration at day 7, compared to untreated controls (Figure 10.3.B). In deltamethrin-treated soils, at day 7, significantly higher values of this parameter were observed at 500 *versus* 50 mg kg^{-1} DW. Finally, in these deltamethrin-treated samples, lower values of N-NH_4^+ concentration were observed at 500 *versus* 50 mg kg^{-1} DW at day 60 and 90. On the other hand, in general, difenoconazole application had a stimulatory effect on soil N-NO_3^- concentration (Figure 10.4.A). Similarly, at day 30, 60 and 90, values of N-NO_3^- concentration in soils treated with 50 and 500 mg kg^{-1} DW soil of deltamethrin and ethofumesate were higher than in untreated controls. On the other hand, at these last three sampling times, values of N-NO_3^- concentration in pesticide-treated soils were in general higher at 500 *versus* 50 mg kg^{-1} DW soil.

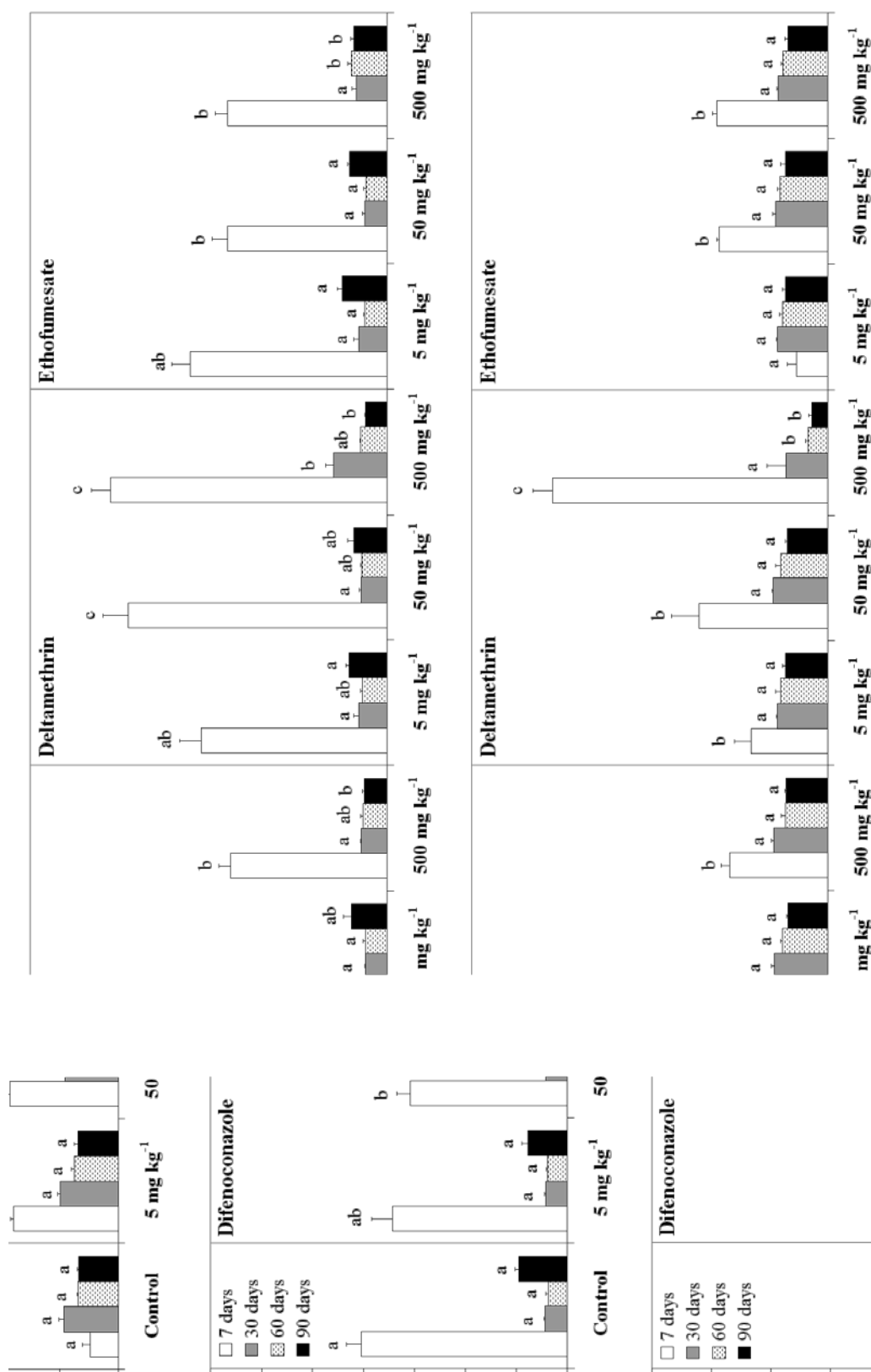


Figure 10.3. Effect of pesticides (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) at 5, 50 and 500 mg kg⁻¹ DW soil on potentially mineralizable nitrogen (N_{min}) (A) and soil N-NH₄⁺ concentration (B). Mean values (n=4) ± S.D. Different letters indicate statistically significant differences among treatments according to Fisher's PLSD test at each incubation time.

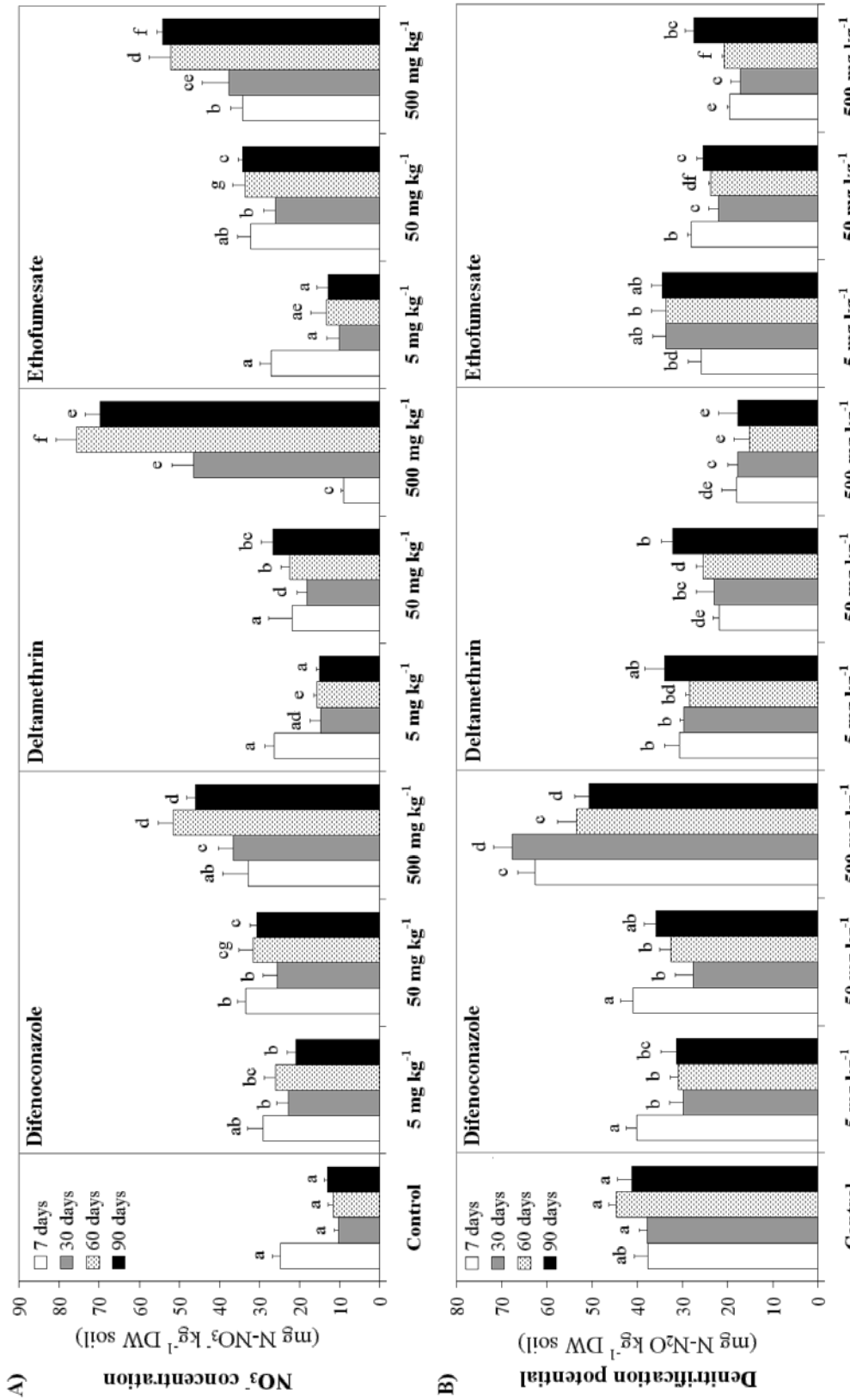


Figure 10.4. Effect of pesticides (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) at 5, 50 and 500 mg kg⁻¹ DW soil on soil N-NO₃⁻ concentration (A) and denitrification potential (B). Mean values (n=4) ± S.D. Different letters indicate statistically significant differences among treatments according to Fisher's PLSD test at each incubation time.

According to the values of the H' index assessed from data of the *amoA*-DGGE analysis, diversity of ammonium-oxidizing bacteria was affected by the presence of pesticides at all concentrations (Figure 10.5.). In general, the application of difenoconazole and ethofumesate led to higher values of this index, whereas limited changes of this index were not observed in deltamethrin-treated soils.

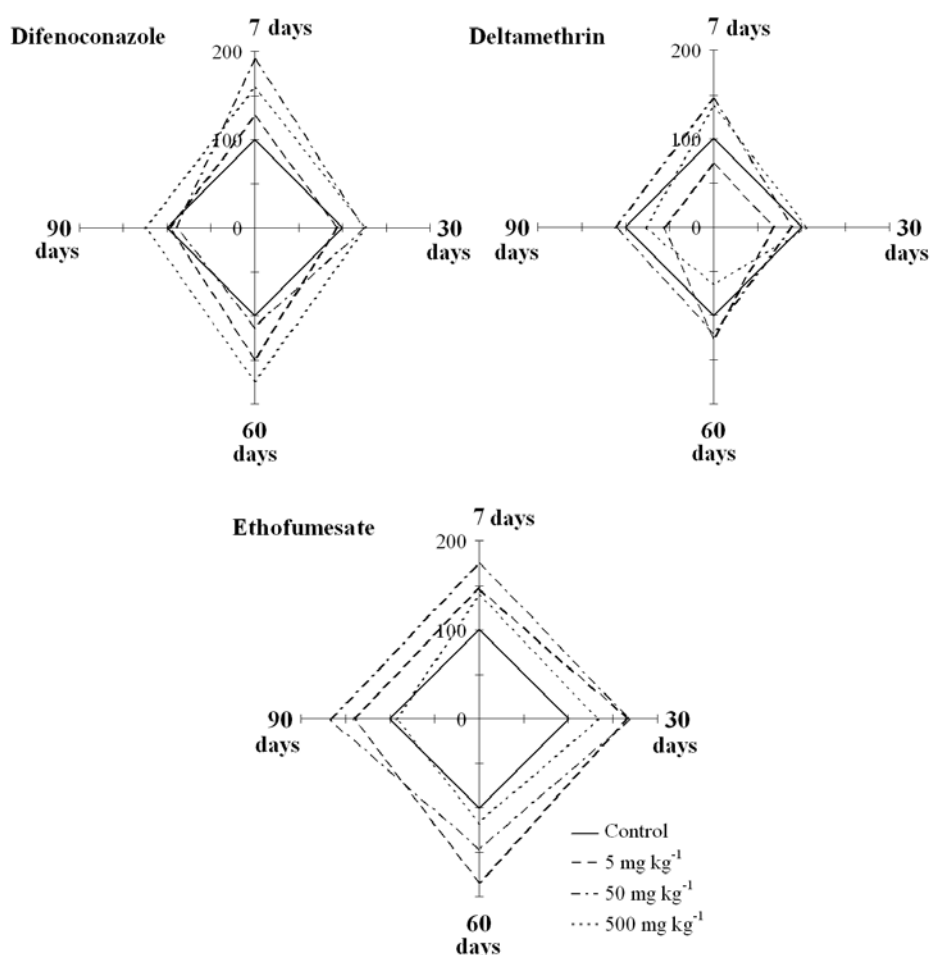


Figure 10.5. Effect of pesticides (difenoconazole, deltamethrin, ethofumesate) at 5, 50 and 500 mg kg⁻¹ DW soil on Shannon's index of ammonium-oxidizing bacteria diversity (H'). Values of H' in control untreated soil at each incubation time were used as reference samples (set to 100%). H' values in these control soils were: 0.971 (day 7), 1.190 (day 30), 1.059 (day 60) and 1.156 (day 90).

Deltamethrin and ethofumesate at 50 and 500 mg kg⁻¹ DW soil resulted in lower values of denitrification potential, compared to untreated controls (Figure 10.4.B). In contrast, difenoconazole at 500 mg kg⁻¹ DW soil increased denitrification potential values at all sampling times (however, at 5 and 50 mg kg⁻¹ DW, lower values of this parameter were observed at the three last sampling times).

Finally, the T-SQI was calculated from the values of the five enzyme activities determined here (Table 10.3.). At 5 mg kg⁻¹ DW soil, in general, pesticide application showed no significant effect on T-SQI values (apart from deltamethrin and ethofumesate-treated samples at day 60). By contrast, at higher concentrations (50 and 500 mg kg⁻¹ DW), significantly lower values of this index were observed for many of the studied soil samples: as a general trend, it was found that the higher the pesticide concentration, the lower the T-SQI value.

Table 10.3. Effect of difenoconazole, deltamethrin and ethofumesate on the treated-soil quality index (T-SQI) at 7, 30, 60 and 90 days of incubation in the presence of 5, 50 and 500 mg pesticide kg⁻¹ DW soil.

Time (days)	Pesticide	Pesticide concentration (mg kg ⁻¹)		
		5	50	500
7	Difenoconazole	101.6 ± 1.7 ^a	99.2 ± 1.7 ^a	76.0 ± 4.8 ^b
	Deltamethrin	96.6 ± 2.3 ^a	89.3 ± 5.8 ^{ab}	63.4 ± 5.0 ^c
	Ethofumesate	96.4 ± 7.0 ^a	100.3 ± 1.4 ^a	96.9 ± 1.2 ^a
30	Difenoconazole	98.3 ± 7.3 ^{ab}	96.2 ± 3.4 ^a	59.2 ± 6.5 ^c
	Deltamethrin	94.7 ± 7.1 ^{ab}	85.8 ± 5.0 ^b	39.8 ± 7.3 ^d
	Ethofumesate	97.5 ± 2.7 ^a	91.3 ± 2.7 ^{ab}	82.7 ± 4.5 ^b
60	Difenoconazole	94.2 ± 7.4 ^{ab}	84.9 ± 4.2 ^b	52.4 ± 2.7 ^c
	Deltamethrin	84.5 ± 6.5 ^b	76.7 ± 2.7 ^b	34.5 ± 7.5 ^d
	Ethofumesate	84.7 ± 8.9 ^b	85.2 ± 5.2 ^b	62.6 ± 5.5 ^e
90	Difenoconazole	100.6 ± 5.5 ^a	92.8 ± 6.1 ^{ab}	67.0 ± 0.3 ^c
	Deltamethrin	95.4 ± 3.1 ^{ab}	80.9 ± 3.9 ^d	45.3 ± 1.2 ^e
	Ethofumesate	96.6 ± 6.7 ^{ab}	86.0 ± 6.5 ^{bd}	66.3 ± 2.8 ^c

Mean values (n=4) ± S.D. Different letters indicate statistically significant differences between treated and control “reference” samples (T-SQI = 100) at each incubation time, according to Fisher’s PLSD test.

10.4.3. Relationships between soil microbial parameters

Soil N-NH₄⁺, N_{min} and dehydrogenase activity were positively correlated among each other (Table 10.4.). Likewise, soil N-NO₃⁻ was negatively correlated with soil N-NH₄⁺, N_{min} and dehydrogenase activity. The T-SQI was negatively correlated with Q_R

and N-NO_3^- (these two parameters were positively correlated) and positively with dehydrogenase activity and N_{\min} . Denitrification potential only showed a significant positive correlation with Q_R . Finally, no significant correlation was found for H' -AOB.

Table 10.4. Correlations among soil microbial parameters. Marked correlations are significant at 0.05 (*) and 0.01 (**) level of probability. Non-significant correlations ($P > 0.05$) were excluded

	N-NO_3^-	N-NH_4^+	N_{\min}	DEN	DEH	Q_R	T-SQI	H' -AOB
N-NO_3^-	1							
N-NH_4^+	-.274**	1						
N_{\min}	-	.718**	1					
DEN	-	-	-	1				
DEH	-.230**	.426**	.787**	-	1			
Q_R	.482**	-	-	.265**	-	1		
T-SQI	-.683**	-	.158*	-	.447**	-.289**	1	
H' -AOB	-	-	-	-	-	-	-	1

N-NO_3^- , nitrate concentration; N-NH_4^+ , ammonium concentration; N_{\min} , potentially mineralizable nitrogen; DEN, denitrification potential; DEH, dehydrogenase activity; Q_R , respiratory quotient; T-SQI, treated-soil quality index; H' -AOB, Shannon's index of ammonium-oxidizing bacteria diversity.

According to the PCA carried out with soil microbial parameters (Figure 10.6.), three principal components (PC) explained 82.6% of the total variance: PC1 (33.2% of total variance) was positively correlated with dehydrogenase activity, N_{\min} , and N-NH_4^+ , whereas PC2 (29.2% of total variance) was negatively correlated with N-NO_3^- and positively with T-SQI; finally, PC3 (20.2% of total variance) was characterized by a high positive Eigen-value (>0.75) for denitrification potential and Q_R . For the PCA plot, PC1 was not considered as it did not show significant differences among treatments. On the contrary, according to PC2 and PC3 (Figure 10.6.), soils treated with 5 mg pesticide kg^{-1} DW were located together with untreated controls, independently of the pesticide tested, towards the positive side of PC2; by contrast, soils treated with 50 and, specially, 500 mg pesticide kg^{-1} DW migrated to the negative side of PC2 (in this case, sample location was dependent upon pesticide type, with deltamethrin-treated soils being observed towards the positive side of PC3, while difenoconazole- and ethofumesate-treated soils were found towards the negative side of PC3).

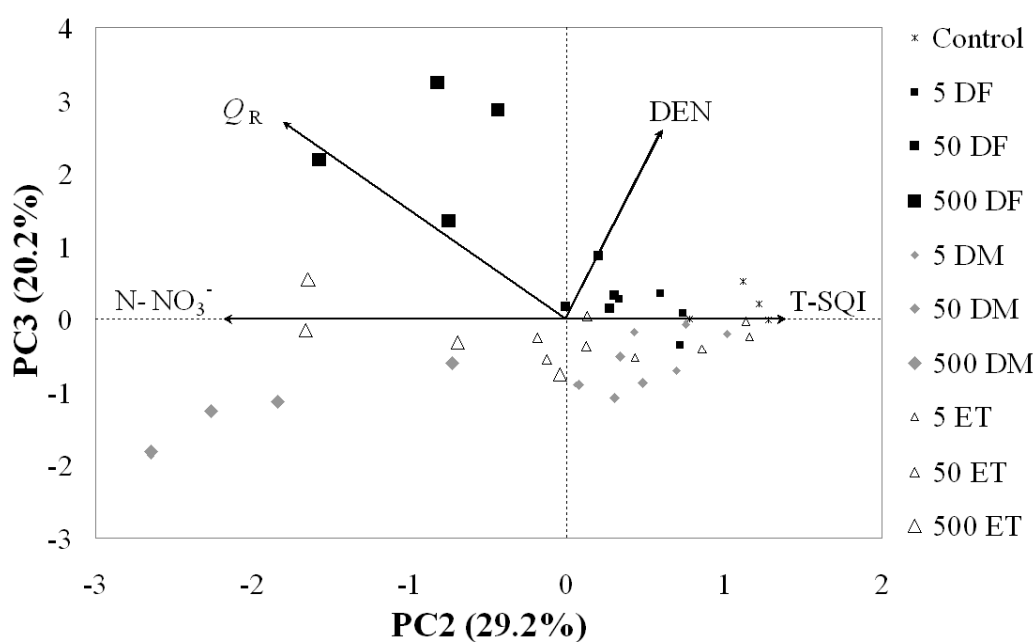


Figure 10.6. Principal component analysis based on correlations between soil microbial properties and PC2 and PC3, at the three pesticide concentrations studied here (5, 50 and 500 mg kg⁻¹ DW soil). DEN, denitrification potential; DF: difenoconazole; DM: deltamethrin; ET: ethofumesate.

10.5. Discussion

The nature and concentration of the applied pesticides are among the main factors affecting the existence and extent of non-target effects (Chen et al., 2001). At 5 mg kg⁻¹ DW soil (this concentration is closest to the recommended field application rate), dissipation half-life values were in accordance with those previously reported for difenoconazole (Guo et al., 2010) and ethofumesate (Siimes et al., 2006) when added as commercial formulations, and for deltamethrin (Roberts, 1998) as pure active compound. For the three pesticides, microbial degradation has been reported as the main factor responsible for pesticide dissipation in soils (Thom et al., 1997; Roberts, 1998; Gardner and Branham, 2001; Siimes et al., 2006; Guo et al., 2010). In any event, at 5 mg kg⁻¹ DW soil, the highest half-life value corresponded to difenoconazole-treated soils. As expected, fungicides frequently induce more harmful non-target effects on soil microbial communities as compared to insecticides and herbicides (Chen et al., 2001; Cycoń et al., 2006; ~~mu~~ -Leoz et al., 2011). The capacity of soil microbial communities to degrade pesticides has been found to be reduced by increasing

concentrations of fungicides (Chen and Edwards, 2001; Wang et al., 2009) and herbicides like alachlor (Felsot and Dzantor, 1995), but not deltamethrin (Muñoz-Leoz et al., 2009). As here observed for ethofumesate at 500 mg kg⁻¹ DW soil, Felsot and Dzantor (1995) found no alachlor degradation when applied at 250 mg kg⁻¹ DW soil. In this respect, and in order to reduce leaching, additives present in herbicide commercial formulations modify their solubility and sorption, with a concomitant reduction in herbicide bioavailability and, hence, microbial degradation rates (Beigel et al., 1999; Krogh et al., 2003; Crouzet et al., 2010).

According to values of dehydrogenase activity, at 5 and 50 mg kg⁻¹ DW soil, pesticides appear to have no clear effect on overall soil microbial activity. However, at 500 mg kg⁻¹ DW soil, overall microbial activity in soil at day 60 and 90 was negatively affected by the three pesticides. Dehydrogenase activity is a good indicator of overall microbial activity in soil as it occurs only in viable cells but not in stabilized soil complexes (Nannipieri et al., 2002). Both stimulation and inhibition of dehydrogenase activity, as a result of pesticide application, has been reported (Felsot and Dzantor, 1995; Monkiedje et al., 2002; Moreno et al., 2007; Zabaloy et al., 2008; Crouzet et al., 2010; Muñoz-Leoz et al., 2011).

The respiratory quotient (Q_R), or the ratio of basal respiration to substrate-induced respiration, is an ecophysiological index which can reflect environmental stress in soil microbial communities (Anderson and Domsch, 1985). Here, at 5 mg kg⁻¹ DW soil, pesticide application showed no clear effect on this index. By contrast, at higher concentrations of difenoconazole and ethofumesate, but not deltamethrin, Q_R values increased indicating pesticide-induced stress on soil microbial communities. Indeed, a higher respiratory activity related to the size of microbial biomass (SIR is an indicator of active microbial biomass) might reflect pesticide-induced stress on soil microbial communities, forcing them to use a considerable amount of their energetic resources for maintenance and survival, and therefore a lower incorporation of organic C into microbial biomass (Anderson and Domsch, 1985; Gómez et al., 2009). When applied at high concentrations, many authors have also found pesticide-induced non-target effects on soil microbial activity (Gómez et al., 2009; Moreno et al., 2007; Muñoz-Leoz et al., 2011).

Regarding N_{\min} , an indicator of biologically active soil N (Powers, 1980), the biphasic pattern observed in both pesticide-treated and untreated soils might be due to the fact that, during sample pre-treatment, soil homogenization and sieving induce the release of easily available nutrients from the breaking down of soil aggregates, resulting in a flush of N and C mineralization (Franzluebbers, 1999) with concomitant higher rates of microbial activity, as reflected by N_{\min} and dehydrogenase activity. Thus, the effect of pesticides on N_{\min} was more accused at day 7, as compared to the other incubation times: at this time, the addition of 50 and 500 mg pesticide kg^{-1} DW soil led to significant lower values of N_{\min} for difenoconazole and ethofumesate, and significantly higher values for deltamethrin. It might be hypothesized that deltamethrin and/or adjuvants present in its commercial formulation might act as an available source of N- and C-compounds for N-mineralizing microorganisms (Devare et al., 2007; Mijangos et al., 2009). Nonetheless, these N-mineralizing microorganisms could, in some way, be damaged by the presence of difenoconazole and ethofumesate, especially at high concentrations (Černohlávková et al., 2009).

Nitrification and ammonification are closely related processes, as NH_4^+ oxidation during nitrification is responsible for NH_4^+ ion depletion. Most importantly, the simultaneous measurement of NH_4^+ and NO_3^- concentration in soil can be used as an indicator of disruption in soil N transformations (Černohlávková et al., 2009). The higher values of N- NH_4^+ observed at day 7 in treated *versus* untreated soils could be interpreted as pesticide-induced inhibition of nitrification, as generally reported for pesticides (Černohlávková et al., 2009; Lang and Cai, 2009; Cycoń et al., 2010; Muñoz - Leoz et al., 2011). However, as reflected by soil N- NO_3^- values, nitrification appears stimulated by the presence of pesticides, particularly at the highest concentration. Alternatively, the higher N- NH_4^+ values might be due to pesticide-induced stimulation of ammonification, resulting from the mineralization of organic compounds present in pesticide formulations or in dead microbial biomass from microorganisms negatively affected by pesticide application (Monkiedje et al., 2007). In any case, other pyrethroid insecticides such as λ -cyhalothrin have been found to stimulate both N mineralization and nitrification (Cycoń et al., 2006; Devare et al., 2007).

Nitrifying bacteria have been reported as most sensitive to the application of a great variety of pesticides (Sáez et al., 2003). In our study, the diversity of ammonium-

oxidizing bacteria (AOB) was higher in the presence of difenoconazole and ethofumesate, but resulted rather reduced by deltamethrin. The herbicide atrazine at 10 mg kg⁻¹ DW soil has been found to increase AOB population abundance; by contrast, at 100 and 1,000 mg kg⁻¹ DW soil, atrazine induced a marked decrease of such abundance (Chang et al., 2011). Cycoń et al. (2006) observed that, at high concentrations, the insecticide λ-cyhalothrin had negative effects on nitrifying bacteria, while the application of the fungicide tebuconazole resulted in a stimulation of such nitrifying bacteria.

In general, lower values of denitrification potential were found in pesticide-treated soils (except for difenoconazole at the highest concentration). Pesticide impact on denitrification depends on many factors such as soil properties, incubation conditions, type of pesticide, specific adjuvants present in commercial formulations, etc. (Petersen et al., 2004). Sorption coefficients (K_{oc}) of pesticides condition their fixation to soil organic matter, and hence their non-target effects on soil denitrifying microorganisms. In the soil under study, denitrifying microorganisms have been reported (Muñoz-Leoz et al., 2010) to be closely related with soil organic C; however, no correlation was found among K_{oc} of pesticides and their subsequent impact on denitrification potential. On the other hand, solvents and other compounds present in commercial formulations might act as alternative C sources for denitrifying microorganisms (Yeomans and Bremner, 1989), which could explain the high values of denitrification potential observed in difenoconazole-treated soils at the highest concentration. In any case, most published works deal with pesticides applied as active molecules, thus not taking into consideration the effects of the adjuvants and surfactants present in commercial formulations. For example, both deltamethrin-induced stimulation and inhibition of denitrification has been reported by Widenfalk et al. (2004) and Muñoz-Leoz et al. (2009), respectively. Yeomans and Bremner (1985a,b) observed that many pesticides did not negatively affect denitrification, but even stimulated it. By contrast, Cycoń et al. (2006) found denitrifying microorganisms to be sensitive to tebuconazole. Sáez et al. (2003) observed that some herbicides, as well as organochlorinated and organophosphorus insecticides, showed inhibitory effects on *Paracoccus denitrificans*.

No significant changes in the T-SQI were observed when pesticides were added at recommended field application rates (5 mg kg⁻¹ DW soil). The T-SQI integrates information from different enzyme activities into one unique measure of soil functioning according to its nutrient recycling capacity. Nevertheless, at higher pesticide concentrations, the capacity of our riparian wetland soil to recycle nutrients was negatively affected, especially at 500 mg kg⁻¹ DW soil. There are many works in the literature on the effects of pesticides on soil enzyme activities (Megharaj et al., 1999; Albiach et al., 2000; Monkiedje et al., 2002, 2007; Tejada, 2009; Muñoz-Leoz et al., 2011; Zhuang et al., 2011), observing both higher and lower values depending on the specific enzyme activity, experimental conditions, soil properties, pesticide formulation, etc.

Finally, the low degradation rates found for the three pesticides (especially, for difenoconazole) can ultimately lead to their progressive accumulation in soil as a result of repeated application (Munier-Lamy and Borde, 2000; Rice et al., 2002). Here, in general, non-target effects of pesticides on soil microbial communities were limited and short-lived when applied at recommended field application rates. Difenoconazole caused the most significant impact on soil microbial parameters (Q_R , soil N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻ concentration, denitrification potential), as generally reported for fungicides (Chen et al., 2001; Černohlávková et al., 2009). However, at higher pesticide concentrations, non-target effects were more accused. This fact highlights the importance of considering increasing pesticide concentrations when assessing the environmental impact and potential non-target effects of pesticides on soil microbial communities and, consequently, soil quality.

10.6. Conclusions

Pesticide degradation rates were dependent upon concentration: higher values of half-life time were observed at increasing pesticide concentrations. In general, when used at recommended field application rates (5 mg kg⁻¹ DW soil), none of the three pesticides caused relevant changes in soil microbial communities. However, at higher pesticide concentrations, adverse impacts on soil microbial communities were detected. In particular, at 500 mg kg⁻¹ DW soil, pesticide application decreased overall soil

microbial activity and negatively affected the capacity of the riparian wetland soil to recycle nutrients (it was found that the higher the pesticide concentration, the lower the T-SQI value). At high concentrations, difenoconazole and ethofumesate, but not deltamethrin, caused a pesticide-induced stress on soil microbial communities. Likewise, at 500 mg kg⁻¹ DW soil, lower values of N_{\min} were observed at the end of the incubation period for all three pesticides. In turn, deltamethrin and ethofumesate at 50 and 500 mg kg⁻¹ DW soil resulted in lower values of denitrification potential. It was concluded that pesticide concentration affects both pesticide dissipation kinetics in soil and their impact on soil microbial communities.

10.7. References

- Ahtiainen, J.H., Vanhala, P., Myllymaki, A., 2003. Effects of different plant protection programs on soil microbes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 56-64.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F., 2000. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Bioresource Technology* 75, 43-48.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1985. Determination of eco-physiological maintenance requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biology and Fertility of Soils* 1, 81-89.
- Avrahami, S., Liesack, W., Conrad, R., 2003. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology* 5, 691-705.
- Beigel, C., Charnay, M.P., Barriuso, E., 1999. Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 525-534.
- Bending, G.D., Lincoln, S.D., Edmondson, R.N., 2006. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution* 139, 279-287.
- Černohlávková, J., Jarkovský, J., Hofman, J., 2009. Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 80-85.
- Chang, Y.-J., Hussain, A., Stephen, J.R., Mullen, M.D., White, D.C., Peacock, A., 2001. Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous β -subgroup ammonia-oxidizers communities in soil microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2462-2468.

- Chen, S.K., Edwards, C.A., 2001. A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: comparisons of two soil types. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1982-1991.
- Chen, S.K., Edwards, C.A., Subler S., 2001. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1971-1980.
- Crouzet, O., Batisson, I., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Bardot, C., Poly, F., Bohatier, J., Mallet, C., 2010. Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione : A dose-effect microcosm approach. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 193-202.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., Kaczyńska, A., Kozdrój, J., 2006. Microbiological characteristics of a sandy loam soil exposed to tebuconazole and λ -cyhalothrin under laboratory conditions. *Ecotoxicology* 15, 639-646.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., Kozdrój, J., 2010. Microbial characteristics of sandy soils exposed to diazinon under laboratory conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 409-418.
- Devare, M., London-R, L.M., Thies, J.E., 2007. Neither transgenic Bt maize (MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affect soil microbial activity or biomass: A 3-year field analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2038-2047.
- Dick, R.P., 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 121-156.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Hernández-Allica, J., Barrutia, O., Garbisu, C., 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology* 39, 299-310.
- Epelde, L., Mijangos, I., Becerril, J.M., Garbisu, C., 2009. Soil microbial community as bioindicator of the recovery of soil functioning derived from metal phytoextraction with sorghum. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1788-1794.
- Felsot, A.S., Dzantor, E.K., 1995. Effect of alachlor concentration and an organic amendment on soil dehydrogenase activity and pesticide degradation rate. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 23-28.
- Franzluebbers, A.J., 1999. Potential C and N mineralization and microbial biomass from intact and increasingly disturbed soils of varying texture. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1083-1090.
- Garbisu, C., Alkorta, I., Epelde, L., 2011. Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance. *Applied Soil Ecology* 49, 1-4.
- Gardner, D.S., Branham, B.E., 2001. Mobility and dissipation of ethofumesate and halofenozide in turfgrass and bare soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2894-2898.

- Gómez, E., Ferreras, L., Lovotti, L., Fernández, E., 2009. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a vertic argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology* 45, 163-167.
- Guo, C., Li, J.Z., Guo, B.Y., 2010. Determination and safety evaluation of difenoconazole residues in apples and soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 85, 427-431.
- ISO 16072, 2002. Soil Quality - Laboratory Methods for Determination of Microbial Soil Respiration.
- ISO 17155, 2002. Soil Quality - Determination of Abundance and Activity of Soil Microflora using Respiration Curves.
- Jeffery, S., Gardi, C., Jones, A., Montanarella, L., Marmo, L., Miko, L., Ritz, K., Peres, G., Römbke, J., van der Putten, W.H., 2010. *European Atlas of Soil Biodiversity*. European Commission. Publication Office of the European Union, Luxembourg.
- Johnsen, K., Jacobsen, C.S., Torsvik, V., Sørensen, J., 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils: a review. *Biology and Fertility of Soils* 33, 443-453
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* 6, 68-72.
- Krogh, K.A., Halling-Sørensen, B., Mogensen, B.B., Vejrup, K.V., 2003. Environmental properties and effects of non-ionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50, 871-901.
- Lang, M., Cai, Z., 2009. Effects of chlorothalonil and carbendazim on nitrification and denitrification in soils. *Journal of Environmental Science* 21, 458-467.
- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B., 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 453-461.
- Megharaj, M., Singleton, I., Kookana, R., Naidu, R., 1999. Persistence and effects of fenamiphos on native algal populations and enzymatic activities in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1549-1553.
- Mijangos, I., Becerril, J.M., Albizu, I., Epelde, L., Garbisu, C., 2009. Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant composition by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 505-513.
- Mijangos, I., Albizu, I., Epelde, L., Amezaga, I., Mendarte, S., Garbisu, C., 2010. Effects of liming on soil properties and plant performance of temperate mountainous grasslands. *Journal of Environmental Management* 91, 2066-2074.
- Monkiedje, A., Ilori, M.O., Spiteller, M., 2002. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1939-1948.
- Monkiedje, A., Spiteller, M., Maniepi, S.J.N., Sukul, P., 2007. Influence of metalaxyl- and mefenoxam-based fungicides on chemical and biochemical attributes of soil

quality under field conditions in a southern humid forest zone of Cameroon. *Biology and Biochemistry* 39, 836-842.

- Moreno, J.L., Aliaga, A., Navarro, S., Hernández, T., García, C., 2007. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. *Applied Soil Ecology* 35, 120-127.
- Munier-Lamy, C., Borde, O., 2000. Effect of triazole fungicide on the cellulose decomposition by the soil microflora. *Chemosphere* 41, 1029-1035.
- Muñoz-Leoz, B., Garbisu, C., Antigüedad, I., Alonso, M.L., Alonso, R.M., Ruiz-Romera, E., 2009. Deltamethrin degradation and soil microbial activity in a riparian wetland soil. *Soil Science* 174, 220-228.
- Muñoz-Leoz, B., Antigüedad, I., Garbisu, C., Ruiz-Romera, E., 2010. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions from a riparian wetland soil: An undisturbed soil column study. *Science of the Total Environment* 409, 763-770.
- Muñoz-Leoz, B., Ruiz-Romera, E., Antigüedad, I., Garbisu, C., 2011. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2176-2183.
- Muñoz-Leoz, B., Garbisu, C., Antigüedad, I., Ruiz-Romera, E., 2012. Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 48, 125-134.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-33.
- Niemi, R.M., Heiskanen, I., Ahtiainen, J.H., Rahkonen, A., Mäntykoski, K., Welling, L., Laitinen, P., Ruuttunen, P., 2009. Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. *Applied Soil Ecology* 41, 293-304
- Petersen, D.G., Dahllöf, I., Nielsen, L.P., 2004. Effects of zinc- and copper pyriithione on microbial community function and structure in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 921-928.
- Pimentel, D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 8, 17-29.
- Powers, R.F., 1980. Mineralizable soil nitrogen as an index of nitrogen availability to forest trees. *Soil Science Society of America Journal* 44, 1314-20.
- Qu, X.H., Wang, J.G., 2008. Effect of amendments with different phenolic acids on soil microbial biomass, activity, and community diversity. *Applied Soil Ecology* 39, 172-179.
- Rice, P.J., Anderson, T.A., Coats, J.R., 2002. Degradation and persistence of metolachlor in soil: effects of concentration, soil moisture, soil depth and sterilization. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 2640-2648.

- Roberts, T. 1998. *Metabolic Pathways for Agrochemicals - Part II: Insecticides and Fungicides*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
- Rodríguez-Loinaz, G., Onaindia, M., Amezcua, I., Mijangos, I., Garbisu, C., 2008. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 49-60.
- Romero, E, Fernández-Bayo, J., Castillo-Díaz, J.M., Nogales, R., 2010. Enzyme activities and diuron persistence in soil amended with vermicompost derived from spent grape marc and treat urea. *Applied Soil Ecology* 44, 198-204.
- Sáez, F., Pozo, C., Gómez, M. A., Rodelas, B., González-López, J., 2003. Growth and nitrite and nitrous oxide accumulation of *Paracoccus denitrificans* ATCC 19367 in the presence of selected pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1993-1997.
- Siimes, K., Rämö, S., Welling, L., Nikunen, U., Laitinen, P., 2006. Comparison of the behaviour of three herbicides in a field experiment under bare soil conditions. *Agricultural water management* 84, 53-64.
- Šimek, M., Elhottová, D., Hopkins, D.W., 2002. What is the so-called optimum pH for denitrification in soil? *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1227-1234.
- Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., 1996. *Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America Book Series, Madison, WI.
- Strickland, T., Potter, T.L., Joo, H., 2004. Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation. *Pest Management Science* 60, 703-709.
- Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 387-401.
- Tejada, M., 2009. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere* 76, 365-373.
- Thom, E., Ottow, J.C.G., Benckiser, G., 1997. Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment. *Environmental Pollution* 96, 409-414.
- Wang, Y.S., Huang, Y.J, Chen, W.C., Yen, J.H., 2009. Effect of carbendazim and pencycuron on soil bacterial community. *Journal of Hazardous Materials* 172, 84-91.
- Widenfalk, A., Svensson, J.N., Goedkoop, W., 2004. Effects of the pesticides captan, deltamethrin, isoproturon and pirimicarb on the microbial community of a freshwater sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1920-1927.
- Yeomans, J.C., Bremner, J.M., 1985a. Denitrification in soil: Effects of insecticides and fungicides. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 453-456.

- Yeomans, J.C., Bremner, J.M., 1985b. Denitrification in soil: Effects of herbicides. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 447-452.
- Yeomans, J.C., Bremner, J.M., 1989. Effects of solvents on denitrification in soil. *Biology and Fertility of Soils* 7, 336-340.
- Zabaloy, M.C., Garland, J.L., Gómez, M.A., 2008. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology* 40, 1-12.
- Zhuang, R., Chen, H., Yao, J., Li, Z., Burnet, J.E., Choi, M.M.F., 2011. Impact of beta-cypermethrin on soil microbial community associated with its bioavailability: A combined study by isothermal microcalorimetry and enzyme assay techniques. *Journal of Hazardous Materials* 189, 323-328.

11

11.1. Síntesis final

11.2. Recomendaciones

11.3. Referencias

Síntesis final

“Porque la repugnancia a aceptar ideas preconcebidas y convertir la opinión de uno mismo en tesis antes que en hipótesis de trabajo es precisamente lo que constituye la marca de calidad de un científico genuino y lo que constituye la naturaleza ética esencial de la actividad científica”

Aldous Huxley (1894 – 1963)

11. Síntesis final

11.1. Síntesis final

Gracias a la modernización e intensificación de la agricultura se ha podido satisfacer la demanda de alimentos de una población en constante crecimiento. Sin embargo, dicha intensificación ha conducido a una serie de impactos en el medio ambiente relacionados fundamentalmente con la degradación de la calidad de las aguas, tanto subterráneas como superficiales. En este sentido, la contaminación difusa de origen agrícola se caracteriza por la multitud de factores involucrados en su evolución en el medio, que condicionan su posterior impacto medioambiental. Muchos de esos factores están íntimamente relacionados con la matriz a través de la cual discurren los contaminantes agrícolas antes de impactar en los recursos hídricos: de forma relevante, el suelo.

Desde el momento en que alcanzan el suelo, los fertilizantes y pesticidas se ven sometidos a una serie de transformaciones que determinarán su persistencia en el medio y sus potenciales efectos adversos sobre la calidad de las aguas y los seres vivos (Bending et al., 2006). Las poblaciones microbianas, por ejemplo, además de jugar un papel fundamental en la eliminación de ambos tipos de compuestos en el suelo (Aislabie y Lloyd-Jones, 1995), desempeñan muchas otras funciones atribuidas a este valioso

recurso (*e.g.*, producción de biomasa, depuración de aguas, reciclaje de nutrientes,...). Sin embargo, éstas pueden verse a su vez negativamente afectadas por la repetida aplicación de fertilizantes y/o pesticidas, comprometiendo no sólo la capacidad depuradora del suelo, sino también el resto de funciones que desempeña (Lupwayi et al., 2010).

Es por ello que actualmente se considera a la agricultura como una actividad potencialmente perjudicial para la calidad de las aguas y la calidad del suelo, entendiendo por este último concepto como el grado de aptitud de un suelo para desempeñar una función determinada (Carter et al., 1997).

A medida que se identifican nuevas masas de agua con presencia de nitratos y pesticidas de origen agrícola, crece la preocupación sobre un problema medioambiental cada vez más presente en nuestra sociedad. Sin embargo, el estudio de esta problemática asociada a las prácticas agrícolas no es una tarea fácil. El estudio de la contaminación agrícola requiere de un enfoque eminentemente multidisciplinar, además de por su carácter difuso, por la gran diversidad de factores que condicionan su impacto en el medio.

Es por esta razón que en el transcurso del presente trabajo se han aunado conocimientos y experiencias propios de la hidrogeología, la edafología, la microbiología ambiental y la química, con un único fin: estudiar el impacto de fertilizantes y pesticidas en la calidad del suelo y el agua. Para ello se ha tomado como referencia la Zona Vulnerable a la contaminación de nitratos de origen agrícola del Acuífero Cuaternario de Vitoria-Gasteiz, un ejemplo bien documentado de degradación de recursos hídricos debido a un conjunto de actuaciones agrícolas inadecuadas con respecto al agua y al suelo.

Con la declaración del sector oriental del acuífero como Zona Vulnerable a la contaminación por nitratos, se implementaron toda una serie de medidas recogidas en el código de buenas prácticas agrícolas, con el fin de reducir los niveles de nitratos presentes en las aguas superficiales y subterráneas. No obstante, aunque la reducción ha sido significativa (García-Linares et al., 2003), aún siguen detectándose periódicamente en las aguas de la Zona Vulnerable niveles de nitratos superiores al límite de 50 mg NO₃⁻ L⁻¹ permitido por la directiva europea para aguas de consumo humano

(2006/118/CE), tal y como se comprobó en el estudio de la lixiviación de fertilizantes y pesticidas durante el cultivo de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) (Capítulo 5).

En el caso de la parcela de referencia de Gauna, tanto las simulaciones realizadas con el modelo LEACHN, como los datos de campo, evidenciaron que el abonado de fondo inorgánico (NPK 8-15-15) realizado en épocas húmedas tuvo un impacto negativo sobre la calidad de las aguas subterráneas. La rápida solubilización del fertilizante, y la ausencia de un cultivo desarrollado que pudiera absorber la gran cantidad de nutrientes liberados en el medio, supuso unas pérdidas significativas de nitrógeno vía lixiviación que llegó a elevar los niveles de nitratos en aguas subterráneas hasta los 90 mg NO₃⁻ L⁻¹ (Capítulo 5). Además del impacto negativo que supuso desde el punto de vista medioambiental, el lavado de los fertilizantes implica adicionalmente una importante pérdida económica, en tanto en cuanto el coste de la aplicación del fertilizante no va a tener una repercusión positiva en la rentabilidad del cultivo.

El abonado de cobertera, por el contrario, aún realizándose también mediante fertilizantes inorgánicos, se llevó a cabo bajo condiciones climatológicas más favorables (menos precipitaciones). Este factor, junto con el hecho de que la remolacha es un cultivo capaz de absorber nitrógeno hasta momentos antes de ser cosechada (Jegó et al., 2008), permitió reducir las pérdidas de NO₃⁻ por lixiviación en este segundo abonado.

En el caso de la presencia de pesticidas en las aguas subterráneas de la Zona Vulnerable, los datos existentes son mucho más escasos, y se observa cierta discrepancia entre los muestreos de la red de control de aguas subterráneas de la Agencia Vasca del Agua (URA) y los de nuestro grupo de investigación. Durante el cultivo de la remolacha azucarera considerado en el presente trabajo, a pesar de la gran variedad de pesticidas utilizados, únicamente se detectó la presencia del herbicida etofumesato (0,5 - 5,3 µg L⁻¹), y en menor medida del fungicida difenoconazol (1,1 µg L⁻¹) en las aguas subterráneas que circulaban a través de la parcela, valores muy por encima de los permitidos por la directiva europea para aguas de consumo humano (2006/118/CE) (Capítulo 5). En este caso, aunque el modelo LEACHP consiguió predecir satisfactoriamente la lixiviación del herbicida, no fue así en el caso del fungicida, mostrando en general una cierta tendencia a sobreestimar la persistencia en el suelo de los pesticidas utilizados. Este hecho posiblemente estuviera asociado a la limitación que supone para el modelo el no considerar el efecto de los flujos preferenciales en el transporte de pesticidas a través de las fracturas del suelo.

A pesar de que en las aguas subterráneas de determinadas zonas de la Zona Vulnerable, como las del municipio de Gauna, se detectan concentraciones elevadas de contaminantes de origen agrícola (nitratos, etofumesato y difenoconazol), en los puntos de muestreo situados en las inmediaciones del humedal de Salburua, dichas concentraciones se reducen considerablemente.

Dentro de las funciones que desempeñan las zonas riparias en el medio, destaca la de actuar como zonas de transición entre los ecosistemas terrestres y acuáticos, atenuando la contaminación de origen agrícola antes de que impacte en las masas de agua (Casey et al., 2004). El caso del humedal de Salburua no es una excepción. Simulando el paso de las aguas subterráneas a través de la zona riparia del humedal mediante ensayos de columnas de lixiviación (Capítulo 6), se pudo comprobar experimentalmente, bajo condiciones de laboratorio, cómo la desnitrificación microbiana destacaba entre los diferentes mecanismos microbianos responsables de la eliminación de nitratos (Ranalli y Macalady, 2010), observada anteriormente en estudios de campo (Martínez-Santos, 2008; Martínez, 2012). Análogamente, cuantificando la dependencia directa de este proceso con la temperatura y la materia orgánica del suelo, se pudo estimar una capacidad máxima de desnitrificación de $1.012 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.

Sin embargo, midiendo las emisiones de CO_2 y N_2O que se originaban durante la eliminación de NO_3^- vía desnitrificación microbiana, se constató la paradoja de que un efecto beneficioso a escala local, como es la depuración de las aguas subterráneas, puede llevar asociado inextricablemente otro efecto perjudicial a escala mucho más global como es la generación de cantidades importantes de gases de efecto invernadero. En este sentido, se estimaron unas tasas potenciales de generación de $5.620 \text{ kg CO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ y $240 \text{ kg N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Capítulo 6). De esta forma, se confirmó el postulado basado en la conocida ley de Lavoisier que afirma que en numerosas ocasiones “*la contaminación ni se crea ni se destruye, solo se transforma*”.

Junto con los NO_3^- , al entorno de Salburua llegan también pesticidas, bien a través de las aguas subterráneas, bien por deposición aérea desde los campos de cultivos limítrofes. Por ello, para comprobar si dichos pesticidas podrían afectar a la capacidad atenuadora de nitratos observada en la zona riparia del humedal, se llevaron a cabo unos ensayos preliminares a escala de microcosmos, donde se evaluó el impacto del insecticida deltametrina sobre las comunidades microbianas desnitrificantes del suelo de

la zona riparia de Salburua. En algunos estudios se ha descrito un efecto beneficioso de los pesticidas sobre la desnitrificación bacteriana (Yeomans and Bremner, 1985; Pell et al., 1998), fundamentalmente debido a la utilización del propio pesticida como fuente de carbono orgánico que actúa como donador de electrones. Sin embargo, el suelo de Salburua posee un elevado contenido en materia orgánica, de forma que el carbono no actúa como nutriente limitante, y los efectos tóxicos de la deltametrina en los microorganismos del suelo pueden hacerse patentes. Es tal vez por esta razón que se observó que la capacidad de las comunidades microbianas desnitrificantes de la zona riparia de Salburua para eliminar nitratos puede verse comprometida en caso de llegar al humedal cantidades significativas de pesticidas tales como la deltametrina (Capítulo 7).

Tras estos tres primeros capítulos en los que se profundizó en el estudio del impacto de fertilizantes y pesticidas sobre la calidad de las aguas subterráneas de la Zona Vulnerable, así como en la capacidad atenuadora del humedal de Salburua frente a la contaminación de nitratos, se inició una nueva fase focalizada en el estudio del impacto de dichos contaminantes agrícolas sobre la calidad del suelo.

Tras validar la metodología experimental y los parámetros microbiológicos potencialmente indicadores de la calidad del suelo (Capítulo 8), se seleccionaron los compuestos agroquímicos a estudiar. Se comparó el impacto del fertilizante inorgánico NPK 8-15-15 utilizado en la parcela de referencia de Gauna, con el de un avicompost comercializado por una empresa situada en la propia zona de estudio. Adicionalmente, de entre la gran variedad de pesticidas utilizados durante el cultivo de remolacha azucarera estudiado en el Capítulo 5, se seleccionaron tres compuestos funcionalmente distintos: el difenoconazol (fungicida), el etofumesato (herbicida) y la deltametrina (insecticida). El estudio de los dos primeros se consideró especialmente interesante por su presencia en las aguas subterráneas de la Zona Vulnerable, mientras que la deltametrina fue elegida por sus propiedades físico-químicas particulares (alto coeficiente de adsorción y muy baja solubilidad).

Analizando la evolución del contenido en nitrógeno mineral de los suelos incubados, se comprobó experimentalmente cómo la aplicación del avicompost supuso la liberación al medio de un flujo de amonio y nitrato más progresivo y uniforme que en el caso del fertilizante inorgánico (Capítulo 9). Este fenómeno puede estar asociado al hecho de que la mineralización de los nutrientes orgánicos aportados con el avicompost esté regulada por la acción de los microorganismos del suelo, y no por su simple

solubilización como en el caso del NPK (Burger y Jackson, 2003). Trasladando estas observaciones al cultivo de remolacha simulado en el Capítulo 5, podría sugerirse un estudio que analizara la viabilidad de la sustitución del fertilizante NPK por avicompost como abonado de fondo, el cual podría permitir un contenido en nitrógeno inorgánico en el medio más acorde con el requerido inicialmente por la planta, pudiendo reducirse las pérdidas potenciales de nitrógeno a las aguas subterráneas a pesar de las intensas precipitaciones propias del mes de noviembre.

La aplicación de fertilizantes inorgánicos no solo mostró un mayor riesgo para la calidad de las aguas subterráneas, sino que también para los microorganismos del suelo, especialmente para aquellos involucrados en el ciclo del nitrógeno y en el reciclaje de los principales nutrientes del suelo (Capítulo 9). La liberación en el medio de una gran cantidad de nitrógeno, fósforo y azufre inorgánicos, en ausencia de una fuente de carbono adicional que permitiera mantener unas relaciones C/N óptimas (Romero et al., 2010), inducía un fenómeno de inhibición por producto en las principales actividades enzimáticas microbianas, las cuales regulan la mineralización de nutrientes procedentes de la materia orgánica propia del suelo (Dick et al., 1988). Cabría pensar que esta reducción de la fertilidad propia del suelo es de carácter temporal y remitiría a medida que el exceso de nutrientes en el suelo fuese disminuyendo (por absorción vegetal o lixiviación), aunque se requerirían de más estudios para comprobar sus efectos a largo plazo. No obstante, el aporte selectivo de un reducido número de elementos (nitrógeno, fósforo, potasio y azufre) mediante fertilizantes inorgánicos sí que está asociado a una progresiva pérdida de elementos necesarios para mantener la productividad de los suelos, tales como el carbono orgánico y otros oligoelementos, los cuales sí están presentes en los fertilizantes orgánicos (Díaz-Marcote y Polo, 1992).

La aplicación de avicompost introdujo un “pool” de nutrientes orgánicos que, al ser potencialmente mineralizables por los microorganismos del suelo (Albiach et al., 2000), indujo un efecto bioestimulador sobre el conjunto de las comunidades microbianas edáficas (Szelsa et al., 2008). Dicho efecto activador estuvo asociado con otro beneficio desde el punto de vista medioambiental que no fue observado en presencia de NPK: la mejora en la degradación de los pesticidas (Thom et al., 1997), reduciendo la persistencia del difenoconazol y la deltametrina en el medio (Capítulo 10). Ya que la acción preventiva de estos dos pesticidas se manifiesta mayoritariamente en la superficie foliar, la acción del avicompost reduciría sus posibles impactos

negativos sobre la calidad del suelo y el agua una vez estos compuestos llegan al suelo, no comprometiendo su efectividad. En el caso del etofumesato, por el contrario, el abono orgánico no modificó su degradación. No obstante, la efectividad del herbicida se mantiene mientras éste permanece en el suelo, de forma que no interesaría tanto su degradación, sino más bien su fijación al suelo para evitar su lixiviación, tal y como se comprobó en el Capítulo 5. Si bien las enmiendas orgánicas poseen la capacidad de reducir las pérdidas de pesticidas por lixiviación (Barriuso et al., 1997), este extremo no pudo ser comprobado para el caso del avicompost y el etofumesato en el presente estudio, y se aconseja su estudio en futuros ensayos.

El efecto bioestimulador del avicompost no solo mejoró la degradación de los pesticidas sino que también contribuyó, en buena medida, a reducir sus impactos en los parámetros microbiológicos potencialmente indicadores de la calidad del suelo (Capítulo 9). En el caso del fertilizante inorgánico, por el contrario, los efectos inhibidores que indujo en ciertos parámetros microbianos, tales como las actividades enzimáticas, se acentuaron en presencia de pesticidas. Dado que tanto fertilizantes como pesticidas son aplicados conjuntamente a los cultivos, cabría esperar que los impactos que se diesen en los microorganismos de los suelos agrícolas fueran más próximos a los observados experimentalmente cuando ambos compuestos coexisten simultáneamente en el suelo que por separado.

La aplicación de pesticidas en dosis similares a las utilizadas en campo (5 mg kg^{-1}) tuvo un impacto limitado y temporal en la calidad del suelo. Tanto los parámetros microbiológicos indicadores de la actividad microbiana general, como los relacionados con el ciclo del nitrógeno y las actividades enzimáticas, mostraron un impacto inicial tras la aplicación de pesticida que, en la mayoría de los casos, desapareció tras los 90 días de estudio (Capítulos 9 y 10). De entre los pesticidas analizados, el fungicida difenoconazol fue el que indujo cambios más significativos en un mayor número de parámetros microbianos (Capítulos 9 y 10). De hecho, hay numerosas referencias que califican a los fungicidas como los pesticidas más susceptibles de provocar cambios en las poblaciones microbianas del suelo (Chen et al., 2001; Černohlávková et al., 2009). Este fenómeno estaría asociado a la mayor similitud fisiológica del conjunto de los microorganismos edáficos con los organismos-diana sobre los que los fungicidas ejercen su poder biocida, léase, los hongos (Chen et al., 2001; Černohlávková et al., 2009).

No obstante, a medida que la concentración de los pesticidas en el suelo aumentaba, se comprobó que tanto sus impactos en la calidad del suelo, como su persistencia en el medio, aumentaban (Capítulo 10) (Rice et al., 2002). Las comunidades microbianas del suelo mostraron una menor actividad y un mayor estrés metabólico en presencia de la mayor de las concentraciones estudiadas (500 mg kg^{-1}), especialmente con el fungicida difenoconazol. Los parámetros microbianos relacionados con el ciclo del nitrógeno también evidenciaron cambios significativos, que, en ciertos casos, ya no eran de carácter temporal, sino que persistían hasta el final de los 90 días de estudio, como los registrados en la diversidad de las comunidades bacterianas encargadas de la oxidación del amonio o el potencial de desnitrificación.

Aunque a la vista de las simulaciones realizadas con el modelo LEACHP y los datos experimentales en la parcela de Gauna (Capítulo 5), las altas concentraciones ensayadas en el presente estudio ($50 \text{ y } 50 \text{ mg kg}^{-1}$) distan mucho de las presentes realmente en el medio, las condiciones podrían cambiar ante futuros posibles escenarios. El cambio climático, por ejemplo, con la consiguiente subida generalizada de las temperaturas, podría acarrear una mayor incidencia de insectos y otros organismos patógenos dañinos para los cultivos que obligarían a intensificar el régimen de aplicación de pesticidas. Otra posible causa sería la progresiva resistencia de las plagas a la acción de dichos pesticidas, fenómeno que actualmente ya se está dando y que obliga a los agricultores a utilizar dosis cada vez mayores o combinaciones de productos con mayor poder biocida (Merrington et al., 2002). Simulando estos posibles escenarios, podríamos actuar con antelación, minimizando los impactos asociados al cambio en el régimen de aplicación de pesticidas y su posible acumulación en el suelo.

A diferencia del caso de los fertilizantes, resulta complicado formular hipótesis acerca de la repercusión que tendría sobre la calidad de las aguas los cambios inducidos por los pesticidas en las comunidades microbianas del suelo. Considerando la dosis más parecida a la aplicada en campo, dichos cambios son en su mayoría de carácter limitado y transitorio (indicadores: actividad microbiana general, nitrógeno potencialmente mineralizable, nitrógeno inorgánico, potencial de desnitrificación, actividades enzimáticas), por lo que sus impactos puntuales sobre las aguas variarían mucho en función del momento de aplicación del pesticida, la disponibilidad de nutrientes en el medio y los requerimientos de la planta, entre otros factores.

Así, por ejemplo, el aumento en los niveles de nitrato en suelo o la reducción del potencial de desnitrificación, ambos inducidos por la aplicación de 5 mg kg^{-1} de difenoconazol, podría reducir las pérdidas de nitrato en forma de nitrógeno gas y aumentar la disponibilidad de nitrato para la planta, pero también podría suponer un aumento del nitrógeno potencialmente lixiviable a las aguas subterráneas. En relación con el etofumesato, al tratarse de un herbicida que es aplicado hasta en cuatro ocasiones a lo largo del cultivo de la remolacha, aunque sus efectos puntuales son muy limitados, su aplicación recurrente podría generar un impacto de carácter acumulativo distinto del esperado tras una única aplicación. En el caso de la deltametrina, al carácter transitorio de sus impactos, hay que sumarle el hecho de que la concentración analizada en los ensayos en mesocosmos (5 mg kg^{-1}) es la que difiere en mayor medida con respecto a la predicha por el modelo en suelo ($0,84 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). Es por ello que, mientras siga utilizándose a las bajas dosis que se aplican actualmente en la Zona Vulnerable, cabría esperar que sus impactos reales en las comunidades microbianas del suelo fueran aún menos significativos, y por tanto, su impacto en la calidad de las aguas inapreciable.

11.2. Recomendaciones

Si bien es cierto que los ensayos de laboratorio suponen una pequeña aproximación a las condiciones reales que se dan en campo, éstos permiten delimitar pequeños elementos que intervienen en el complejo proceso de generación, difusión y atenuación de la contaminación agrícola, en este caso, la que afecta a la Zona Vulnerable del acuífero cuaternario de Vitoria-Gasteiz.

Somos conscientes de que se han excluido multitud de factores que pueden influir en la dinámica de nitratos y pesticidas en el suelo y las aguas (*e.g.*, interacción microorganismos-planta, absorción vegetal, secado y rehumectación de suelo, radiación solar,...) y que abren ante nosotros un gran abanico de posibles futuros estudios. También quedan por dilucidar aspectos interesantes como la influencia de los aditivos presentes en las formulaciones comerciales de los pesticidas, o medir el impacto de los fertilizantes y pesticidas en las comunidades microbianas procedentes de suelos agrícolas, en lugar de suelos “limpios” como el del humedal de Salburua.

Por todo ello, cualquier recomendación que se formule a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, debe ser formulada con la cautela propia del que es

consciente del carácter “in vitro” de sus datos, y de que cualquier extrapolación a condiciones de campo debería ser contrastada.

Se comprobó experimentalmente que a las razones de índole ecológica (reserva de biodiversidad) que justifican la protección y conservación de Salburua, hay que sumarle el importante papel que juega el humedal dentro del acuífero como punto de atenuación natural de nitratos de origen agrícola. Sin embargo, dicho beneficio ambiental no es a coste cero, ya que la depuración natural de las aguas subterráneas que tiene lugar en el humedal puede suponer la emisión a la atmósfera de importantes cantidades de gases de efecto invernadero. Adicionalmente, se recomienda profundizar en el estudio del impacto que tendría la probable llegada futura de pesticidas a través de las aguas subterráneas en la hidroquímica del humedal, ya que de esta manera podríamos adelantarnos a posibles futuros escenarios ante los cuales estaríamos a tiempo de introducir medidas preventivas.

De igual manera, se comprobó cómo, a pesar del código de buenas prácticas agrícolas implementado para la Zona Vulnerable, aún siguen dándose episodios de lavado de nitratos y pesticidas a las aguas subterráneas del acuífero, apareciendo en concentraciones muy superiores a las permitidas por la legislación. A través de los datos obtenidos durante el cultivo de remolacha azucarera y en los ensayos de incubación en bandejas, se comprobó que los fertilizantes inorgánicos sintéticos aplicados durante el abonado de fondo presentan una gran susceptibilidad a ser lixiviados. Los abonos orgánicos, como el avicompost utilizado en el presente trabajo, además de representar un riesgo menor para la calidad de las aguas subterráneas, debido a su liberación más progresiva de nitrógeno mineral, presentan otros beneficios medioambientales, tales como la mejora de la degradación de los pesticidas residuales presentes en el suelo o la reducción de los posibles impactos de dichos pesticidas sobre la calidad de los suelos. Es, por ello, que se recomienda llevar a cabo estudios en los que se analice la viabilidad tanto económica como ecológica de la sustitución en el cultivo de remolacha azucarera de la fertilización sintética tradicional, al menos durante el abonado de fondo, por abonos orgánicos, con el fin de reducir sus impactos sobre el medio ambiente y hacer de la agricultura una actividad más respetuosa con su entorno.

A lo largo del presente trabajo se ha constatado que la utilización de parámetros microbianos como bioindicadores del estado del ecosistema edáfico presenta numerosas dificultades, muchas de ellas relacionadas fundamentalmente con la complicada

interpretación de los datos biológicos de biomasa, actividad y biodiversidad microbiana. En este sentido, es fácil caer en la tentación de equiparar el aumento de determinados parámetros microbianos con una mejora general de la calidad del suelo. Aunque es innegable que la funcionalidad del ecosistema edáfico está asociada a unos niveles determinados de actividad microbiana, un incremento de dicha actividad como respuesta a cualquier variable o perturbación del ecosistema edáfico (*e.g.* introducción de fertilizantes y pesticidas en el medio) no debe ser interpretado como un aspecto favorable en relación a la calidad del suelo de forma automática. Son necesarios un conjunto de variables y parámetros adicionales que permitan analizar dicho cambio desde un enfoque mucho más integrador y holístico.

Por otra parte es vital que aquellos que nos dedicamos al estudio del suelo sepamos transmitir de forma eficaz a los gestores del territorio y a la sociedad en general la enorme importancia de conservar este valioso recurso. Para ello se debe seguir profundizando en el estudio de los mecanismos mediante los cuales, procesos microbianos considerados clave a nivel edáfico (*e.g.* liberación de nutrientes a partir de la M.O. o biodegradación de contaminantes) pueden afectar a los procesos que ocurren en superficie (*e.g.* producción de biomasa vegetal o depuración de aguas) y *viceversa*.

Por último, se suele esgrimir la necesidad de alimentar a una población humana en constante crecimiento como argumento para mantener unas prácticas agrarias claramente insostenibles y que causan efectos perjudiciales en el medio ambiente y la salud humana. No obstante, la FAO nos recuerda cada año que mientras se mueren millones de personas por culpa del hambre, en el planeta se produce mucha más comida de la necesaria para alimentar a todos sus habitantes, al menos, actualmente. Es por ello que el hambre en el mundo no depende tanto de la producción de alimentos, sino de decisiones políticas en gran parte.

Lejos de aspirar a introducir cambios revolucionarios en el panorama agrícola mundial, los estudios llevados a cabo en el presente trabajo han tenido por objeto arrojar algo de luz sobre el complejo problema que representa la contaminación agrícola, no solo sobre la calidad de las aguas, sino también sobre la calidad de los suelos, concepto este último escasamente explorado dentro del panorama agrícola y sobre el que aún queda todo por descubrir. Solo gracias a la suma de pequeñas aportaciones como ésta podremos hacer de la agricultura la actividad que antaño era: enriquecedora para el ser humano y respetuosa con el suelo, el agua y el aire, en definitiva, con la vida.

11.3. Referencias

- Aislabie, J., Lloyd-Jones, G., 1995. A review of bacterial degradation of pesticides. *Australian Journal of Soil Research* 33, 925-942.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F., 2000. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Bioresource Technology* 75, 43-48.
- Barriuso, E., Houot, S., Serra-Wittling, C., 1997. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pesticide Science* 49, 65-75.
- Bending, G.D., Lincoln, S.D., Edmondson, R.N., 2006. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution* 139, 279-287.
- Burger, M., Jackson, L.E., 2003. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 29-36.
- Carter, M.R., Gregorich, E.G., Anderson, D.W., Doran, J.W., Janzen, H.H., Pierce, F.J., 1997. Concepts of soil quality and their significance. In: Gregorich, E.G., Carter, M.R. (Eds.), *Soil Quality for Crop Production and Ecosystem Health*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-20.
- Casey, R.E., Taylor, M.D., Klaine, S.J., 2004. Localization of denitrification activity in macropores of a riparian wetland. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 563-569.
- Černohlávková, J., Jarkovský, J., Hofman, J., 2009. Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 80-85.
- Chen, S.K., Edwards, C.A., Subler, S., 2001. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1971-1980.
- Díaz-Marcote, I., Polo, A., 1992. Comparación de una fertilización mineral tradicional con abonados orgánicos en el cultivo de cebada en seco. II Congreso internacional del ANQUE. Burgos.
- Dick, R.P., Rasmussen, P.E., Kerle, E.A., 1988. Influence of long-term residue management on soil enzyme activities in relation to soil chemical properties of a wheat-fallow system. *Biology and Fertility of Soils* 6, 159-164.
- García-Linares, C., Martínez-Santos, M., Martínez-Bilbao, V., Sánchez-Pérez, J.M., Antigüedad, I., 2003. Wetland restoration and nitrate reduction: the example of the peri-urban wetland of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, North Spain). *Hydrology and Earth System Sciences* 7, 109-121.
- Jegó, G., Martínez, M., Antigüedad, I., Launay, M., Sánchez-Pérez, J.M., Justes, E., 2008. Evaluation of the impact of various agricultural practices on nitrate leaching under the root zone of potato and sugar beet using the STICS soil-crop model. *Science of the Total Environment* 394, 207-221.

- Lupwayi, N.Z., Brandt, S.A., Harker, K.N., O'Donovan, J.T., Clayton, G.W., Turkington, T.K., 2010. Contrasting soil microbial responses to fertilizers and herbicides in a canola-barley rotation. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1997-2004.
- Martínez M., García C., Antigüedad I., Sánchez-Pérez J.M., Aizpurua A., 2001. Funcionalidad de las zonas húmedas del cinturón peri-urbano de Vitoria-Gasteiz: consecuencias sobre la desnitrificación de las aguas subterráneas. En: López-Rodríguez J.J., Quemada Sáez-Badillos M. (Eds.): *Actas de las V Jornadas sobre Investigación en la Zona no Saturada*, Pamplona: 147-156
- Martínez-Santos, M., 2008. Dinámica espacio-temporal de la calidad de las aguas de la Zona Vulnerable de Vitoria-Gasteiz (País-Vasco). Tesis Doctoral. Departamento de Geodinámica. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Martínez, M., 2012. Caracterización hidrodinámica e hidroquímica del humedal de Salburua (Álava, País Vasco). Tesis Doctoral. Departamento de Geodinámica. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Merrington, G., Winder, L., Parkinson, R., Redman, M., 2002. *Agricultural pollution: Environmental problems and practical solutions*. Spon Press, New York.
- Pell, M., Stenberg, B., Torstensson, L., 1998. Potential denitrification and nitrification tests for evaluation of pesticide effects in soil. *Ambio* 1, 24-28.
- Ranalli, A.J., Macalady, D.L., 2010. The importance of the riparian zone and in-stream processes in nitrate attenuation in undisturbed and agricultural watersheds — a review of the scientific literature. *Journal of Hydrology* 389, 406-415.
- Rice, P.J., Anderson, T.A., Coats, J.R., 2002. Degradation and persistence of metolachlor in soil: effects of concentration, soil moisture, soil depth and sterilization. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2640-2648.
- Romero, E., Fernández-Bayo, J., Castillo Díaz, J.M., Nogales, R., 2010. Enzyme activities and diuron persistence in soil amended with vermicompost derived from spent grape marc and treat urea. *Applied Soil Ecology* 44, 198-204.
- Szelsa, R., Rao, M.A., Gianfreda, L., 2008. Response of an agricultural soil to pentachlorophenol (PCP) contamination and the addition of compost or dissolved organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2162-2169.
- Thom, E., Ottow, J.C.G., Benckiser, G., 1997. Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment. *Environmental Pollution* 96, 409-414.
- Yeomans, J. C., Bremner., J.M., 1985. Denitrification in soils: Effects of insecticides and fungicides. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 453-456.

12

Conclusiones

“A base de observaciones, de reflexión, se encuentra”

Claude Monet (1840-1926)

12. Conclusiones

Nota introductoria: *en el presente capítulo se mencionan exclusivamente las conclusiones principales de este trabajo. Para conclusiones más específicas sobre los diferentes temas desarrollados en la presente tesis, se remite al lector a los capítulos correspondientes (Capítulos 5-10).*

1. A pesar de la implantación del código de buenas prácticas agrícolas en la Zona Vulnerable de Vitoria-Gasteiz, el uso de fertilizantes y pesticidas durante un cultivo característico de la zona, como es el de remolacha azucarera, continúa afectando negativamente a la calidad de las aguas subterráneas, detectándose tanto nitratos como etofumesato (herbicida) y difenoconazol (fungicida) a concentraciones superiores a las permitidas por la legislación para aguas de consumo humano.

2. Los modelos LEACHN y LEACHP no pueden estimar el efecto que el flujo preferente a través de las fracturas del suelo tiene sobre la lixiviación de nitratos y pesticidas. A pesar de esta limitación, los resultados obtenidos por los modelos fueron

12. Conclusiones

razonablemente satisfactorios en lo que respecta a la lixiviación de nitratos y etofumesato.

3. La desnitrificación se destacó como el principal proceso microbiológico responsable de la eliminación de nitratos de las aguas subterráneas que circulan a través de la zona riparia del humedal de Salburua. A partir del efecto que la temperatura y el contenido en materia orgánica del suelo tienen sobre dicho proceso, se estimó una tasa máxima de eliminación de nitratos de $1.012 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, que supondrían la emisión a la atmósfera de $5.620 \text{ kg CO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ y $240 \text{ kg N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.

4. Estudios preliminares evidenciaron que la presencia de deltametrina en el suelo del humedal de Salburua puede mermar su capacidad para eliminar nitratos de las aguas subterráneas vía desnitrificación microbiana.

5. Los parámetros microbiológicos con potencial bioindicador de la calidad del suelo se mostraron como herramientas de gran valor para la monitorización del impacto que fertilizantes y pesticidas pueden causar sobre las comunidades microbianas edáficas. En Zonas vulnerables a la contaminación por nitratos de origen agrícola, resulta especialmente interesante el estudio de indicadores microbianos relacionados con el ciclo del nitrógeno.

6. La incorporación de elementos inorgánicos durante la aplicación de fertilizantes sintéticos alteró el equilibrio de los nutrientes en el suelo, inhibiendo los procesos microbianos involucrados en su reciclaje. La presencia del fertilizante NPK disminuyó la degradación del herbicida etofumesato y acentuó el impacto que los pesticidas tuvieron sobre algunos de los parámetros microbiológicos estudiados.

7. La aplicación de avicompost tuvo un efecto bioestimulador sobre las comunidades microbianas edáficas, gracias a la incorporación al suelo de un gran cantidad de compuestos orgánicos fácilmente mineralizables. Gracias a ello, mejoró la degradación del fungicida difenoconazole y del insecticida deltametrina, reduciendo sus tiempos de

vida media en el suelo, y ayudó a mitigar los cambios inducidos por los pesticidas en las comunidades microbianas edáficas.

8. A partir de los parámetros microbiológicos estudiados, se concluyó que los pesticidas aplicados en concentraciones similares a las dosis de campo tuvieron un impacto, de carácter limitado y transitorio, sobre la calidad del suelo. En general, las comunidades microbianas se vieron inicialmente afectadas por la aplicación de los pesticidas, para posteriormente recuperarse al final del periodo de estudio. El fungicida difenoconazol fue el pesticida que indujo cambios de carácter más persistente en un número mayor de indicadores microbiológicos.

9. El carácter transitorio de los cambios inducidos por los pesticidas en la calidad del suelo dificulta la elaboración de hipótesis sobre el impacto que dichos cambios puedan tener en la calidad de las aguas.

10. La concentración a la que el pesticida se encuentra en el suelo condiciona significativamente su persistencia e impacto en la calidad del suelo. La degradación de los pesticidas disminuyó progresivamente a medida que aumentaba su concentración en suelo (5, 50 y 500 mg kg⁻¹), incluso no llegándose a detectar apenas degradación del etofumesato a la concentración más elevada. Los parámetros microbiológicos mostraron asimismo un gradiente de afección en relación con la concentración del pesticida, con cambios mucho más significativos y de carácter persistente.

12. Conclusions

Introductory note: *only the main conclusions from this work are included here. For more specific conclusions regarding topics dealt with during the development of this work, please refer to the corresponding chapters (Chapters 5-10).*

1. Despite the implementation of a Good Agricultural Practices Code in the Vulnerable Zone of Vitoria-Gasteiz, the use of fertilizers and pesticides during a characteristic crop from the study zone such as sugar beet, continues to negatively affect groundwater quality, with nitrate, as well as ethofumesate (herbicide) and difenoconazole (fungicide), being detected at concentrations higher than those allowed by the current drinking water regulations for human consumption.

2. LEACHN and LEACHP models cannot properly assess the effect of preferential transport through soil macropore fractures on nitrate and pesticide leaching. Despite this limitation, obtained results were reasonably satisfactory regarding nitrate and ethofumesate leaching.

3. Denitrification was the most important microbial process responsible for nitrate removal in the groundwater entering the riparian zone of the Salburua wetland. By means of assessing the effect of temperature and soil organic matter on this process, we estimated a maximum nitrate removal capacity of $1,012 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$, which would involve the emission of $5,620 \text{ kg CO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ and $240 \text{ kg N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ to the atmosphere

4. Preliminary assays showed that deltamethrin presence in the riparian soil of the Salburua wetland might reduce its capacity to remove nitrate from groundwater through microbial denitrification.

5. Microbial parameters with potential as bioindicators of soil quality are valuable tools to monitor the impact of fertilizers and pesticides on soil microbial communities. In vulnerable zones to agricultural nitrate pollution, it is most relevant to study those microbial indicators involved in the nitrogen cycle.

6. Inorganic elements added through synthetic fertilizers altered nutrient equilibrium in the soil ecosystem, actually inducing an inhibition of microbial processes involved in their recycling. The presence of NPK fertilizer decreased ethofumesate (herbicide) degradation and accentuated the impact of pesticides on some of the soil microbial parameters studied here.

7. Avicompost application had a stimulatory effect on soil microbial communities thanks to the addition of a great amount of easily mineralizable compounds. As a result, difenoconazole (fungicide) and deltamethrin (insecticide) degradation were enhanced, with shorter half-lives in soil, and pesticide-induced changes on soil microbial communities were counteracted.

8. As reflected by the values of the soil microbial parameters determined here, we concluded that pesticide application at concentrations similar to field application rates had a limited and temporary impact on soil quality. In general, microbial communities

12. Conclusions

were initially affected by pesticide application, but then changes disappeared by the end of the study period. Difenoconazole application resulted in the most persistent changes in many microbial indicators.

9. The transitory character of the pesticide-induced changes on soil quality makes it difficult to formulate a hypothesis regarding the impact of such changes on water quality in the Vulnerable Zone.

10. Pesticide concentration significantly conditions both their persistence in the soil and impact on soil quality. Pesticide degradation decreased progressively at higher soil pesticide concentrations (5, 50 and 500 mg kg⁻¹); in fact, no ethofumesate degradation was observed at the highest concentration tested. Likewise, soil microbial parameters showed a response gradient with regard to pesticide concentration, resulting in more significant and persistent changes.

12. Conclusions

Remarque Introductive: *dans ce chapitre, seules les principales conclusions de ce travail. Pour des conclusions plus précises sur les différents thèmes développés dans cette thèse, le lecteur est renvoyé aux chapitres correspondants (chapitres 5-10).*

1. Malgré la mise en œuvre d'un code de bonnes pratiques agricoles dans la Zone Vulnérable de Vitoria-Gasteiz, l'utilisation d'engrais et de pesticides au cours d'une culture caractéristique de la région, la betterave sucrière, continue de nuire à la qualité des eaux souterraines, puisque l'on détecte des nitrates, de l'éthofumesate (herbicide) et du difénoconazole (fongicide) à des concentrations supérieures à celles autorisées par la loi dur l'eau pour la consommation humaine.

2. Les modèles LEACHP et LEACHN ne peuvent pas estimer l'effet que l'écoulement préférentiel à travers des fractures du sol a sur le lessivage des nitrates et des pesticides. Malgré cette limitation, les résultats obtenus par les modèles ont été raisonnablement satisfaisants à l'égard de la lixiviation des nitrates et l'éthofumésate.

3. La dénitrification apparaît comme le principal processus microbiologique responsable de l'élimination des nitrates dans l'eau souterraine qui coule à travers le sol riparien de la zone humide de Salburua. Compte tenu de l'effet que la température et la teneur en matière organique du sol ont sur ce processus, le taux maximal estimé de l'élimination des nitrates est de $1,012 \text{ kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$, qui représenterait l'émission dans l'atmosphère de $5,620 \text{ kg de CO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ et de $240 \text{ kg N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$.

4. Des études préliminaires ont montré que la présence de la deltaméthrine sur le sol riparien de la zone humide de Salburua peut nuire à la capacité à éliminer les nitrates des eaux souterraines par dénitrification microbienne.

5. Les paramètres microbiologiques potentiellement bioindicateurs de la qualité du sol se sont montrés être des outils précieux pour suivre l'impact que les engrais et les pesticides peuvent causer sur les communautés microbiennes du sol. Dans les zones vulnérables à la pollution par les nitrates provenant de l'agriculture, il est particulièrement intéressant d'étudier les indicateurs microbiens liés au cycle de l'azote.

6. L'incorporation d'éléments inorganiques lors de l'application d'engrais synthétiques a bouleversé l'équilibre des nutriments dans le sol, en inhibant les processus microbiens impliqués dans leur recyclage. La présence de l'engrais NPK a diminué la dégradation de l'herbicide éthofumesate et a souligné l'impact que les pesticides ont eu sur certains des paramètres microbiologiques étudiés.

7. L'application de l'avicompost a eu un effet bio-stimulateur sur les communautés microbiennes du sol, grâce à l'incorporation dans le sol d'une grande quantité de composés organiques facilement minéralisés. Grâce à lui, la dégradation de l'insecticide deltaméthrine et du fongicide difénoconazole a été amélioré, en réduisant leurs demi-vies sur le sol, et a contribué à atténuer les changements induits par les pesticides dans les communautés microbiennes édaphiques.

8. A partir des paramètres microbiologiques étudiés, nous avons pu conclure que les pesticides appliqués à des concentrations similaires à la dose domaine ont un impact limité et temporaire sur la qualité des sols. En général, les communautés microbiennes ont été initialement affectés par l'application de pesticides, cet effet ayant diminué à la fin de la période d'étude. Le fongicide difénoconazole a été le pesticide qui a induit les changements les plus persistants dans un grand nombre d'indicateurs microbiologiques.

9. Le caractère transitoire des changements induits par les pesticides dans la qualité des sols rend difficile l'élaboration d'hypothèses sur les changements que ces impacts pourraient avoir sur la qualité de l'eau.

10. La concentration à laquelle le pesticide est présent dans le sol influe considérablement sur leur persistance et leur impact sur la qualité des sols. La dégradation des pesticides a diminué progressivement avec la concentration croissante dans le sol (5, 50 et 500 mg kg⁻¹), rendant même impossible la détection de la dégradation de l'éthofumesate à la plus forte concentration. Les paramètres microbiologiques ont également montré une condition gradient par rapport à la concentration du pesticide, avec des changements beaucoup plus importants et de caractère plus persistant.

13

13.1. Articles

13.2. Contributions to
congresses

Appendix:

**Publications related to the present
Doctoral Thesis**

“Después de todo, cuando estás enamorado, quieres contarlo a todo el mundo. Por eso, la idea de que los científicos no hablen al público de la ciencia me parece aberrante”

Carl Sagan (1934 – 1996)

13.1. Articles

Title: Deltamethrin Degradation and Soil Microbial Activity in a Riparian Wetland Soil

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Carlos Garbisu, Iñaki Antigüedad, M^a Luz Alonso, Rosa M^a. Alonso, Estilita Ruiz-Romera

Journal: Soil Science

Year: 2009 **Volume:** 174 **Pages:** 220-228

Title: Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions from a riparian wetland soil: An undisturbed soil column study

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Iñaki Antigüedad, Carlos Garbisu, Estilita Ruiz-Romera

Journal: Science of the Total Environment

Year: 2011 **Volume:** 409 **Pages:** 763-770

Title: Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Estilita Ruiz-Romera, Iñaki Antigüedad, Carlos Garbisu.

Journal: Soil Biology and Biochemistry

Year: 2011 **Volume:** 43 **Pages:** 2176-2183

Title: Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Carlos Garbisu, Iñaki Antigüedad, Estilita Ruiz-Romera.

Journal: Soil Biology and Biochemistry

Year: 2012 **Volume:** 48 **Pages:** 125-134

Title: Non-target effects of three pesticides on microbially-mediated processes in a clay-loam soil

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Carlos Garbisu, José M. Sánchez-Pérez, Jean-Yves Charcosset, Estilita Ruiz-Romera.

Journal: Soil Biology and Biochemistry (Submitted in February 2012)

Year: **Volume:** **Pages:**

13.2. Contributions to congresses

Title: Effects of Deltamethrin in Denitrification Activity from a Wetland Soil in the Basque Country

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Estilita Ruiz-Romera, Iñaki Antigüedad, Ana Baranda.

Congress: Wetland Pollution Dynamics and Control. WETPOL2007

Presentation: Oral **Date:** September 2007 **Place:** Tartu (Estonia)

Title: Monitorización de la actividad microbiana de un suelo expuesto a diferentes dosis de Tebuconazole

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Estilita Ruiz-Romera, Iñaki Antigüedad, Carlos Garbisu, Rosa M^a Alonso, M^a Luz Alonso.

Congress: VII Iberian and IV Iberoamerican Congress of Environmental Contamination and Toxicology (CICTA 2008)

Presentation: Poster **Date:** April 2008 **Place:** Lisboa (Portugal)

Title: Eliminación de Nitratos y Emisiones de Gases de Efecto Invernadero en el Humedal de Salburua (Vitoria-Gasteiz). Efecto de la Temperatura y del Carbono Orgánico

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Estilita Ruiz-Romera, Iñaki Antigüedad, José Ángel Uriarte, Míren Martínez

Congress: VI Congreso Ibérico sobre Gestión y Planificación del Agua

Presentation: Oral **Date:** December 2008 **Place:** Vitoria (Spain)

Title: Impacto Ambiental de Pesticidas en Zonas Vulnerables de la CAPV. Mecanismos de Atenuación de Pesticidas en Columnas de Suelo.

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Estilita Ruiz-Romera, Iñaki Antigüedad, Maria Aranzazu Goicolea, Nora Unzeta.

Congress: Estudios en la Zona no Saturada del Suelo (ZNS09)

Presentation: Poster **Date:** Noviembre 2009 **Place:** Barcelona (Spain)

Title: Soil microbial parameters as indicators of soil health during natural pesticide biodegradation process

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Estilita Ruiz-Romera, Carlos Garbisu, Iñaki Antigüedad, M^a Aaránzazu Goicolea.

Congress: Integral Water Cycle: Present and Future. ANQUE 2010

Presentation: Oral **Date:** June 2010 **Place:** Oviedo (Spain)

Title: Modelization of environmental fate and transport of nitrates and pesticides in an agricultural soil by LEACHN and LEACHP models

Authors: Borja Muñoz-Leoz, Estilita Ruiz-Romera, Iñaki Antigüedad, Miren Martínez, M^a Aranzazu Goicolea.

Congress: Sino-European Symposium on Environment and Health (SESEH 2012)

Presentation: Poster **Date:** August 2012 **Place:** Galway (Ireland)

Agradecimientos/Acknowledgements/Reconnaisances

Desde que comencé en el complicado pero apasionante mundo de la ciencia he tenido la suerte de cruzarme con multitud de personas a cada cual más dispar, y a todas ellas no puedo decirles otra cosa más que GRACIAS. Gracias por enseñarme, acompañarme, divertirme, preocuparme, animarme, complicarme,... todo lo que habéis hecho por mí me ha ayudado a ser la persona que soy y a hacer la tesis que he hecho.

Gracias a Esti porque en Diciembre de 2004 me dijiste que sí, y ese sí ha durado ya 8 años, y será así hasta que el ministerio de educación, la universidad o el destino quieran. No has sido una jefa al uso. Has sido mi mentora, mi guía, mi consejera y lo que es más importante: mi amiga. Todos los cambios y momentos vitales por los que hemos pasado en este tiempo he tenido mucha suerte de haberlos compartido contigo. Gracias a Carlos porque me has enseñado que el día puede tener más de 24 horas cuando tienes la suerte de trabajar en lo que te apasiona. A pesar de lo apretado de tu agenda siempre has tenido un momento y un buen consejo para el ingeniero estirado de San Mamés. Gracias a Iñaki por desvivirte para que los becarios tengamos un salario a final de mes y por tu meticulosidad a la hora de corregir todos los documentos que te mandaba. Gracias por todos tus “dale una vuelta más”. Los tres me habéis enseñado el significado de la palabra “trabajo”, no con grandes y elocuentes discursos, sino con el ejemplo silencioso de vuestro día a día. No todo el mundo tiene la suerte de poder trabajar codo con codo con una química, un hidrogeólogo y un bioquímico como vosotros. Me siento todo un privilegiado.

Gracias a todas las entidades que han prestado su apoyo económico y sin las cuales no habría sido posible llevar a cabo todo este trabajo, en especial al Ministerio de Ciencia e Innovación por otorgarme la beca de Formación de Personal Investigador-FPI (BES-2007-16563), y la beca de movilidad para realizar mi estancia de 3 meses en el Ecolab del Ensats de Toulouse, ambas a través del proyecto “Atenuación de nitratos en zona de ribera de la Zona Vulnerable de Vitoria-Gasteiz (CGL2006-06485)”. También querría agradecer la financiación recibida a través del Gobierno Vasco por medio de las convocatorias de Grupos de Investigación Consolidados (IT516/10: Hidrogeología y Medio Ambiente) y Eortek (ETORTEK06/141: Berrilur II-Investigación estratégica para la protección y recuperación de la salud y calidad del recurso suelo), así como a través de la Unión Europea por medio del programa Interreg SUDOE IVB

(SOE1/P2/F146 Proyecto AguaFlash: Desarrollo de un método de evaluación de riesgos de degradación de la calidad del agua en Cuencas Vertientes agrícolas durante los procesos de crecidas aplicables a las CV de SUDOE).

Gracias al sector Vitoria, en especial a Arantxa por gestionar el análisis de las muestras de pesticidas que tantos quebraderos de cabeza nos dieron.

Gracias al sector San Mamés, a los integrantes (algunos ya ex-integrantes) de nuestra querida aunque a veces conflictiva Sala de I+D: Esther, Alex, Urko, Aitziber, Simo, Luis, Sergio, Diego, Iker, Iñaki, Nerea, Maitane, Nestor, Maite, Estibaliz, Ion, Iratxe, Saioa, Harold, Ilian. Gracias por el reactivo prestado, por el equipo apagado, por el consejo dado,... y por los cafés, las cenas, las sidrerías,... Una mención especial se merece Mari Feli, por tu infinita paciencia conmigo y los miles de problemas para los que siempre encuentras solución. Y gracias a todos los que me habéis ayudado con vuestros proyectos fin de carrera: Nuria, Andrés, Ana, Aitor, Iker, Ione, Gorka, Mikel, Iraia, Iessika, Patricia, espero haber enseñaros algo útil.

Gracias al sector Neiker y al sector Leioa. Lur, Iker y Miren, vosotros habéis sido un ejemplo a seguir, no solo de cómo hay que hacer una buena tesis, sino de cómo hay que ir por este mundo. Fernando, me enseñaste a ser crítico con los números que escupen los equipos de medida y con el mundo en general. Gracias a Miryam y a Bárbara por hacer más llevadera aquella semana que padecimos en Barco de Ávila y a Jesús Ángel, Ane, Itsasne, Maite y Fernando por tantos momentos buenos compartidos con vosotros. Todos vosotros me habéis ayudado a quitarme el color gris tan típico de los ingenieros y poner un poco de verde, marrón y azul en mi vida.

Muchas gracias al sector Toulouse. Merci à José Miguel et à Sabine pour faire possible mon stage et pour m'accueillir et me faire éprouver tellement confortable avec vos familles. Merci pour le Trident, le baeckeofe et le potofu. Merci a Jean-Yves pour ton engagement avec moi. Je crois que la manipulation du DGGE c'est la chose la plus compliqué que j'avais fait dans ma vie, et bien sur que sans tes conseils et sans l'aide de Iessica je n'aurais pas pu le faire. Merci a toi aussi Iessica.

Gracias a Mike Oldfield, Michel Cretu, Enya, Vangelis, James Horner, John Williams,...gracias a vuestra música encontré la concentración que tanto necesité.

Gracias a Andrés, Bittor, Marta, Asier, Jesus, Iker, Alex, Jose y demás amigos, aunque no hayais conseguido entender a lo que me he dedicado estos 6 años. Algunos

de vosotros me habéis acompañado en todo este proceso que comenzó haciendo una ficha de colorear círculos con apenas 3 años y ha acabado haciendo una PCA de interminables series de datos con los 30 recién cumplidos. Aunque la vida nos impide vernos tanto como nos gustaría, el rato que pasamos juntos bien merece la espera.

Por último, aunque no por eso menos importante, está mi familia, en especial mis padres, vosotros me habéis enseñado a ser honrado, trabajador y perseverante, valores todos ellos que han hecho posible esta tesis, por ello, es tan mía como vuestra. A Clara, porque a pesar de alterarme la vida sabes que te quiero. I a la Marta. Els dos li devem molt a aquesta tesi, gràcies a ella hem pogut mantenir la nostra peculiar relació. Malgrat la distància tu has estat el meu bastó, la meva galleda d'escombraries, la meva espurna i tot el que necessito per ser feliç.

Gracias a todos de corazón.

“Cuando bebas agua, recuerda la fuente”

Proverbio chino

La modernización e intensificación de la agricultura han permitido aumentar los rendimientos de producción al ritmo que demanda una población en constante crecimiento. Sin embargo, este hecho ha llevado asociado una serie de impactos adversos en el medio ambiente que pueden llegar a comprometer la sostenibilidad de la agricultura en el futuro.

En este sentido, a la degradación de la calidad de las aguas asociada al uso/abuso de fertilizantes y pesticidas, hay que añadir los impactos que dichos compuestos pueden ocasionar en la calidad del suelo, la cual viene determinada en buena parte por el estado de las comunidades microbianas edáficas que regulan muchos de los procesos que tiene lugar en el ecosistema suelo.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar, a escala de laboratorio, los posibles impactos que algunos fertilizantes y pesticidas empleados en la Zona Vulnerable de Vitoria-Gasteiz tienen sobre la calidad del suelo y el agua en dicha zona.

Centros colaboradores:



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Proyectos participantes:



*“La química divina trabaja en el subsuelo”
Nathaniel Hawthorne*