



Uso de residuos de almazara como enmienda orgánica: efecto en el comportamiento de herbicidas, parámetros fisiológicos del cultivo y población microbiana del suelo

Memoria que presenta

Ana Isabel Cañero Amoreti
*para optar al título de Doctor con
Mención Internacional por la
Universidad de Sevilla*

Sevilla, octubre, 2012

Uso de residuos de almazara como enmienda orgánica: efecto en el comportamiento de herbicidas, parámetros fisiológicos del cultivo y población microbiana del suelo

Visado en Sevilla, a 23 de octubre de 2012

LOS DIRECTORES

Dr D. Juan Cornejo Suero
Profesor de Investigación del CSIC

Dra. Dña. Lucía Gracia Cox Meana
Investigadora Científica del CSIC

EL TUTOR

Dra. Dña. Matilde Forteza González
Profesora Titular de la Universidad de Sevilla

Memoria que presenta

Ana Isabel Cañero Amoreti
*para optar al título de Doctor con
Mención Internacional por la
Universidad de Sevilla*

PROFESOR DE INVESTIGACIÓN D. JOSÉ MANUEL PARDO PRIETO, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada "*Uso de residuos de almazara como enmienda orgánica: efecto en el comportamiento de herbicidas, parámetros fisiológicos del cultivo y población microbiana del suelo*", presentada por Dña. Ana Isabel Cañero Amoreti para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica y Conservación de Suelos, bajo la dirección de los Drs. D. Juan Cornejo Suero y Dña. Lucía Gracia Cox Meana, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a 23 de octubre de 2012

El presente trabajo se ha realizado en el marco del proyecto AGL2007-65771-C02-01 del Plan Nacional de I+D (CYCIT), dentro del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador.

AGRADECIMIENTOS

Antes de empezar esta memoria, me gustaría agradecer a todas las personas que han aportado un granito de arena en la gran tarea que ha sido elaborar esta Tesis Doctoral. Han sido muchos los recuerdos recolectados durante estos 4 años, y espero reconozcáis mi agradecimiento por todos esos momentos en estas breves líneas.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis, el Profesor de Investigación Dr. D. Juan Cornejo Suero y la Investigadora Científica Dra. Dña. Lucía Gracia Cox Meana, por su dedicación constante durante estos años, por sus consejos y por enseñarme ciencia aplicada. Gracias.

A la Profesora Titular de la Universidad de Sevilla, la Dra. Dña. Matilde Forteza González por aceptar la tutela de los Cursos de Doctorado y de esta Memoria.

A la Dirección del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por las facilidades prestadas para llevar a cabo este trabajo.

Gracias a la Universidad de Sevilla por cedernos el invernadero que posee para la consecución de los estudios recogido en el Capítulo IV.

A la Profesora en Investigación Dña. María del Carmen Hermosín Gaviño por sus sugerencias y participación en esta Tesis Doctoral.

Al Investigador Científico Dr. D. Rafael Celis García por facilitarnos suelos que fueron imprescindibles para la realización de esta Tesis Doctoral y por su colaboración desinteresada en la discusión de los resultados.

Al Investigador Científico Dr. D. José Julio Ortega Calvo por facilitarnos el acceso al contador de centelleo y el equipo de combustión, tan importantes para algunos resultados de esta Memoria.

Al Profesor de Investigación Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez y a la Científico Titular Dra, Dña. Leonila Laiz Trobajo, por facilitarme el material y las instalaciones que he necesitado durante el periodo que trabajé con microorganismos en Sevilla, por los consejos y conocimientos transmitidos.

A la Profesora Dña. Elisabeth H. M. Wellington de la Universidad de Warwick, Inglaterra, donde realicé estancias los años 2010 y 2011 por ofrecerme la oportunidad de ampliar mis conocimientos sobre el mundo de la Microbiología, y poder aplicarlos a la Agroquímica de Suelos.

Al Dr. D. Leonides A. Calvo Bado, por guiarme en mis estudios microbiológicos durante mis estancias en la Universidad de Warwick, por acogernos en su casa y hacernos sentir de su familia a Juanjo y a mí. Gracias también a Gill y a Miguel.

A la Profesora Titular de la Universidad de Sevilla, la Dra. Dña. Susana Redondo Gómez y al profesor ayudante Dr. D. Enrique Mateos Naranjo de la Universidad de Sevilla por proporcionarnos tanto los conocimientos, como las herramientas necesarias para comprender la ecología de la fotosíntesis de los olivos.

A los Profesores Titulares Dr. Antonio López Piñeiro y Dr. Ángel Albarrán de la Universidad de Extremadura, por facilitarnos las muestras de suelo, alperujo y orujo que se estudiaron en el Capítulo III, por sus conocimientos y colaboración en la consecución de esta parte de esta Tesis Doctoral.

A las Doctoras Ana Muñoz González y M^a Alegría Cabrera Mesa, por ayudarme a resolver tantas dudas, por guiarme y ser buenas compañeras de laboratorio y de "oficina".

A mis compañeros de laboratorio en la Universidad de Warwick, a Collete, Frank, Nikos, Luci, Tanya, Vicky, Greg, Dorothy, Ashley, Alessandra, Helena y Helen, que acudían al rescate si me veían perdida entre autoclaves. A mis caseros y a la vez compis de piso en Warwick, Lucy y Mauro, por hacerme tan llevaderas las dos estancias que realicé, por su cariño y amistad.

A mis compis de beca, Celia, M. Carmen, Eleonora, Rosa, Lisa, Marco, Esteban, Iván, Carmen, Eulalia, y a todos con los que he compartido risas en estos años.

A mis amigos de siempre, Beatriz, Cristina, Pili, Adri, Alberto y Víctor, porque permanecen tras el paso de los años, cuando se les necesita.

A mis compañeros de laboratorio en el IRNAS, aunque algunos ya hayan tomado otros caminos y no los tengamos tan cerquita, gracias a Carmen, Gracia, Bea, Miguel, Felipe, Nacho, Isabel Cardo, Manuel, Paqui y a mi Marian, por las risas, dentro y fuera del Instituto, por hacer más llevaderos estos cuatro años.

Un especial agradecimiento a Isabel Serrano, Chari, María Jesús y Pili, por ser tan buenas conmigo y por su ayuda tan esencial durante estos años. Sin ustedes no habría conseguido terminar ni con dos becas! Gracias!

Mil gracias a mis padres, Paco y Graci, siempre apoyándose y sacrificándose para que realice mis sueños. Gracias a mis hermanas y a la vez amigas, Natalia y Laura, tan importantes en mi vida y con las que cuento en cada una de mis decisiones. Os quiero.

Gracias a Juanjo, compañero y amigo desde hace unos años, por estar conmigo y escucharme tantas veces en los buenos y en los malos momentos y sobre todo, por no dejar que me rinda en ninguno de ellos. Gracias, amor.

Y con especial cariño, Gracias a mis abuelos, Enrique, Juana y Lola, que tanto me enseñaron y que aún sin comprender bien dónde me metía, me acompañaron en el comienzo de esta etapa de mi vida y espero puedan verme completarla desde dónde quiera que estén.

En último lugar, quisiera agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, por la concesión de una beca Predoctoral del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador dentro del Proyecto AGL2007-65771-C02-01.

PREÁMBULO

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha evaluado el efecto de la adición a suelos agrícolas de residuos de almazara sobre el comportamiento de herbicidas, la fisiología de plantas de *Olea europaea* y sobre las poblaciones microbianas del suelo.

A través de estudios de adsorción-desorción, disipación, mineralización, lixiviación y bioensayos realizados en laboratorio con tres suelos procedentes de cultivos intensivos de la Vega del río Guadalquivir, se ha evaluado el efecto de la adición de dos residuos orgánicos de almazara sobre el comportamiento de los herbicidas MCPA y S-metolacloro. Como consecuencia del distinto grado de humificación y compostaje, los residuos mostraron componentes orgánicos solubles de distinta naturaleza. La adición de éstos al suelo, no reveló efecto negativo sobre su microbiología, ya que se incrementó el contenido en carbono orgánico soluble y respiración de los mismos. Por otro lado, la adición de los residuos se tradujo en comportamientos diferentes en MCPA y S-metolacloro: que en el caso del segundo produjo un aumento en su retención y con ello reducción de la lixiviación y degradación, mientras que no fue así para el primero.

Se ha comparado el efecto de la materia orgánica transformada en suelos tratados con otros dos residuos de almazara durante 9 años en campo en el comportamiento de los herbicidas bentazona y S-metolacloro, comparándose los resultados con los obtenidos en suelos enmendados en laboratorio con estos mismos residuos frescos. El envejecimiento de la materia orgánica exógena añadida al suelo al enmendar reveló diferencias en el comportamiento de estos herbicidas, principalmente debido a las diferencias en materia orgánica soluble y porosidad de los sistemas.

La aplicación al suelo del herbicida terbutilazina bajo condiciones de invernadero, a diferencia de glifosato, constituye una fuente indirecta de fitotoxicidad para olivos (*Olea europaea*), reduciendo su eficiencia fotosintética. Esta fitotoxicidad es contrarrestada por la adición de alperujo a los suelos, debido al aumento de adsorción del herbicida.

En lo que respecta al efecto de los residuos de almazara sobre la población microbiana del suelo, los resultados obtenidos muestran que estas enmiendas no afectan negativamente a la misma. Estudios de tolerancia a altas dosis de herbicidas mostraron cepas tolerantes a MCPA y S-metolacloro, aunque éstas, no lograron crecer en presencia de estos herbicidas como única fuente de carbono.

PREFACE

In this Doctoral Thesis we present an assesment of the effect of addition of organic wastes from olive oil extraction to soils on herbicides fate, *Olea europaea* physiology, and microbiota of agricultural soils.

The effect of addition of olive oil wastes on MCPA and S-metolachlor behavior in soils was studied through sorption-desorption, dissipation, mineralization, leaching and bioassays tests under laboratory conditions with three soils from intensive crops. Due to different humification degree and composting state, the residues used showed different composition of dissolved organic components. The addition of these residues to soils did not affect negatively soil microbial population since dissolved organic matter and soil respiration were increased. Different effects were found on MCPA and S-metolachlor behavior upon amendment with the residues: while no effect was detected in the case of MCPA, increase in retention and lower leaching and dissipation were found for S-metolachlor.

The effect of aged residues from olive oil extraction after 9 years application in the field on bentazone and S-metolachlor fate was also studied and compared to the results obtained with soils amended with fresh organic residues under laboratory conditions. Different behaviour was observed and attributed to differences in dissolved organic matter and porosity of soils systems.

This work also shows indirect phytotoxicity of the herbicide terbuthylazine reducing photosynthetic efficiency of olive plants (*Olea europaea*) under greenhouse conditions. This reduction was counterbalanced by the addition of organic residues due to increase in sorption of the herbicide to soil particles, minimizing plant absorption. However, no negative effect was observed in the case of glyphosate.

The study of herbicides addition and soil amendment with organic residues on soil microbial communities did not revealed negative effect on microbiota when herbicides MCPA, S-metolachlor or organic residues were added. Resistant to herbicides using these as only carbon source were not isolated, although tolerant organisms to high herbicides doses were found.

ÍNDICE

| | | |
|--------------|--|-----|
| Capítulo I | Introducción general..... | 37 |
| Capítulo II | Efecto de la adición de alperujo sobre el comportamiento en suelo de los herbicidas MCPA y S-metolacloro bajo condiciones de laboratorio. Estudios de adsorción-desorción, disipación, mineralización, lixiviación y bioensayos..... | 87 |
| Capítulo III | Efecto de residuos orgánicos transformados y no transformados en suelo sobre el comportamiento de los herbicidas bentazona y S-metolacloro. Estudios de adsorción-desorción, disipación, mineralización, lixiviación, actividad deshidrogenasa..... | 159 |
| Capítulo IV | Efecto de la adición de alperujo y de los herbicidas terbutilazina y glifosato sobre la eficiencia fotosintética en plantas jóvenes de <i>Olea europaea</i> bajo condiciones de invernadero. Estudios de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> e intercambio gaseoso..... | 197 |
| Capítulo V | Efecto de la adición de alperujo y herbicidas a suelos sobre comunidades microbianas autóctonas del mismo. Estudios independientes y dependientes de cultivo..... | 225 |
| Capítulo VI | Conclusiones generales..... | 261 |
| Capítulo VII | Publicaciones..... | 267 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Capítulo I | I.-Introducción general..... | 37 |
| | I.1.-Antecedentes..... | 37 |
| | I.2.-Dinámica de plaguicidas en suelos..... | 39 |
| | I.2.1.-Procesos de transferencia..... | 41 |
| | I.2.1.1.-Procesos de adsorción-desorción..... | 41 |
| | a) Mecanismos de adsorción..... | 43 |
| | b) Medida de adsorción..... | 43 |
| | c) Factores que influyen en los procesos de adsorción-desorción. Propiedades físico-químicas del plaguicida..... | 48 |
| | I.2.1.2.-Procesos de lixiviación. Factores que afectan a la movilidad del plaguicida en el suelo..... | 57 |
| | I.2.1.3.-Volatilización..... | 60 |
| | I.2.1.4.-Escorrentía..... | 61 |
| | I.2.1.5.-Absorción y exudación por plantas y organismos..... | 61 |
| | I.2.2.-Procesos de transformación..... | 61 |
| | I.2.2.1.-Degradación química..... | 62 |
| | I.2.2.2.-Biodegradación..... | 63 |
| | I.2.2.3.-Fotodegradación..... | 64 |
| | I.3.-Importancia de la adición de enmiendas orgánicas al suelo. El alperujo como enmendante | 65 |
| | I.4.-Bibliografía..... | 71 |
| | | |
| Capítulo II | II.-Efecto de la adición de alperujo sobre el comportamiento en suelo de los herbicidas MCPA y S-metolaclo-ro bajo condiciones de laboratorio. Estudios de adsorción-desorción, disipación, mineralización, lixiviación y bioensayos..... | 87 |
| | II.1.-Introducción..... | 87 |
| | II.2.-Objetivos..... | 88 |
| | II.3.-Materiales y métodos..... | 88 |
| | II.3.1.-Herbicidas..... | 88 |
| | II.3.1.1.-MCPA..... | 88 |
| | II.3.1.2.-S-metolaclo-ro..... | 89 |
| | II.3.1.3.-Método de análisis de los herbicidas..... | 90 |
| | II.3.2.-Alperujos..... | 92 |
| | II.3.2.1.-Propiedades físico-químicas..... | 92 |
| | II.3.2.2.-Caracterización de la materia orgánica soluble (MOS)..... | 92 |
| | II.3.3.-Suelos..... | 94 |

| | |
|---|------------|
| II.3.3.1.-Análisis elemental..... | 95 |
| II.3.3.2.-Mineralogía..... | 95 |
| II.3.3.3.-Porosimetría..... | 96 |
| II.3.3.4.-Determinación capacidad de retención de agua..... | 96 |
| II.3.3.5.-Respiración basal..... | 97 |
| II.3.4.-Estudios con herbicidas en laboratorio..... | 98 |
| II.3.4.1.-Estudios de adsorción..... | 98 |
| II.3.4.2.-Estudios de desorción..... | 100 |
| II.3.4.3.-Estudios de disipación..... | 101 |
| II.3.4.4.-Estudios de mineralización..... | 102 |
| II.3.4.5.-Estudios de lixiviación..... | 103 |
| II.3.4.6.-Bioensayo..... | 104 |
| II.4.-Resultados y Discusión..... | 106 |
| II.4.1.-Caracterización de alperujos..... | 106 |
| II.4.1.1.-Propiedades físico-químicas..... | 106 |
| II.4.1.2.-Caracterización MOS..... | 108 |
| II.4.2.-Suelos..... | 112 |
| II.4.2.1.-Análisis elemental. Propiedades físico-químicas y superficiales..... | 112 |
| II.4.2.1.-Respiración basal..... | 118 |
| II.4.3.-Estudios con MCPA..... | 119 |
| II.4.3.1.-Estudios de adsorción..... | 119 |
| II.4.3.2.-Estudios de desorción..... | 123 |
| II.4.3.3.-Estudios de disipación..... | 125 |
| II.4.3.4.-Estudios de mineralización..... | 127 |
| II.4.3.5.-Estudios de lixiviación..... | 128 |
| II.4.3.6.-Bioensayo..... | 132 |
| II.4.4.-Estudios con S-metolacloro..... | 135 |
| II.4.4.1.-Estudios de adsorción..... | 134 |
| II.4.4.2.-Estudios de desorción..... | 137 |
| II.4.4.3.-Estudios de disipación..... | 139 |
| II.4.4.4.-Estudios de lixiviación..... | 141 |
| II.4.4.5.-Bioensayo..... | 145 |
| II.5.-Conclusiones..... | 147 |
| II.6.-Bibliografía..... | 148 |

| | | |
|---------------------|---|-----|
| Capítulo III | III.-Efecto de residuos orgánicos transformados y no transformados en suelo sobre el comportamiento de bentazona y S-metolacloro. Estudios de adsorción-desorción, disipación, mineralización, lixiviación y actividad deshidrogenasa..... | 159 |
| | III.1.-Introducción | 159 |
| | III.2.-Objetivos | 160 |
| | III.3.-Materiales y Métodos | 160 |
| | III.3.1.-Herbicidas | 160 |
| | III.3.1.1.-Bentazona..... | 160 |
| | III.3.1.2.-S-metolacloro..... | 161 |
| | III.3.1.3.-Métodos de análisis de los herbicidas..... | 161 |
| | III.3.2.-Residuos orgánicos y suelo | 161 |
| | III.3.3.-Análisis de residuos orgánicos y suelo | 163 |
| | III.3.4.-Estudios de laboratorio | 164 |
| | III.3.4.1.-Estudios de adsorción-desorción..... | 164 |
| | III.3.4.2.-Estudios de disipación-mineralización-actividad deshidrogenasa..... | 164 |
| | III.3.4.3.-Estudios de lixiviación..... | 166 |
| | III.3.4.4.-Análisis estadístico..... | 166 |
| | III.4.-Resultados y discusión | 167 |
| | III.4.1.-Propiedades físico-químicas y superficiales de los suelos sin enmendar y enmendados y propiedades físico-químicas de los residuos | 167 |
| | III.4.2.-Respiración basal | 172 |
| | III.4.3.-Estudios de laboratorio | 173 |
| | III.4.3.1.-Estudios de adsorción..... | 173 |
| | III.4.3.2.-Estudios de desorción..... | 175 |
| | III.4.3.3.-Estudios de disipación-mineralización..... | 179 |
| | III.4.3.4.-Monitorización de actividad deshidrogenasa..... | 182 |
| | III.4.3.5.-Estudios de lixiviación..... | 184 |
| | III.5.-Conclusiones | 188 |
| | III.6.-Bibliografía | 189 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Capítulo IV | IV.-Efecto de la adición de alperujo y de los herbicidas terbutilazina y glifosato sobre la eficiencia fotosintética en plantas jóvenes de <i>Olea europaea</i> bajo condiciones de invernadero. Estudios de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> e intercambio gaseoso..... | 195 |
| | IV.1.-Introducción..... | 197 |
| | IV.2.-Objetivos..... | 199 |
| | IV.3.-Materiales y Métodos..... | 199 |
| | IV.3.1.-Herbicidas..... | 199 |
| | IV.3.1.-Terbutilazina..... | 199 |
| | IV.3.1.-Glifosato..... | 200 |
| | IV.3.2.-Tratamiento de las plantas..... | 201 |
| | IV.3.3.-Suelo y residuo orgánico..... | 202 |
| | IV.3.4.-Adsorción y análisis de los herbicidas..... | 202 |
| | IV.3.5.-Medida de fluorescencia de la clorofila <i>a</i>..... | 203 |
| | IV.3.6.-Medida de intercambio gaseoso..... | 204 |
| | IV.3.7.-Análisis estadístico..... | 206 |
| | IV.4.-Resultados y Discusión..... | 206 |
| | IV.4.1.-Suelo y residuo orgánico..... | 207 |
| | IV.4.2.-Adsorción..... | 207 |
| | IV.4.3.-Fluorescencia..... | 210 |
| | IV.4.4.-Intercambio gaseoso..... | 214 |
| | IV.5.-Conclusiones..... | 216 |
| | IV.6.-Bibliografía..... | 217 |
| | | |
| Capítulo V | V.-Efecto de la adición de alperujo y herbicidas a suelos sobre comunidades microbianas autóctonas del mismo. Estudios independientes y dependientes de cultivo..... | 225 |
| | V.1.-Introducción..... | 225 |
| | V.2.-Objetivos..... | 228 |
| | V.3.-Materiales y Métodos..... | 228 |
| | V.3.1.-Herbicidas..... | 228 |
| | V.3.2.-Alperujos..... | 228 |
| | V.3.3.-Suelos..... | 228 |
| | V.3.4.-Extracción de ADN de suelos y alperujos..... | 229 |
| | V.3.5.-Extracción de ARN..... | 229 |
| | V.3.6.-Caracterización morfológica y conteo de microorganismos por técnicas de cultivo-dependientes..... | 230 |
| | V.3.7.-Electroforesis en gel de agarosa..... | 231 |
| | V.3.8.-Amplificación de ARNr 16S a través de PCR..... | 231 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| | V.3.9.-Electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE)..... | 233 |
| | V.3.10.-Estudio de tolerancia de las poblaciones microbianas frente a los herbicidas..... | 235 |
| | V.3.11.-Estudios de degradación de los herbicidas MCPA y S-metolacoloro por cepas aisladas..... | 236 |
| | V.3.12.-Secuenciación..... | 236 |
| | V.4.-Resultados y Discusión..... | 237 |
| | V.4.1.-Extracción de ARN..... | 237 |
| | V.4.2.-Caracterización morfológica y recuento de UFC o UFC..... | 239 |
| | V.4.3.-Aislamiento colonias seleccionadas, purificación y secuenciación..... | 240 |
| | V.4.4.-DGGE..... | 246 |
| | V.4.5.-Selección de microorganismos resistentes..... | 249 |
| | V.5.-Conclusiones..... | 253 |
| | V.6.-Bibliografía..... | 254 |
| Capítulo VI | VI.-General Conclusions..... | 263 |
| Capítulo VII | VII.-Publicaciones..... | 267 |
| | VII.1.-Cañero, A.I., Cox, L., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Effect of the herbicides terbuthylazine and glyphosate on Photosystem II Photochemistry of young olive (<i>Olea europaea</i>) plants. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2011, 59, 5528-5534. | 269 |
| | VII.2.-Cañero, A.I., Becerra, D., Cornejo, J., Hermosín, M.C., Albarrán, A., López-Piñeiro, A., Cox, L. Transformation of organic wastes in soil: Effect on bentazone behaviour. <i>Sci. Tot. Environ.</i> 2012, 433, 198-205..... | 275 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Tabla I.1. | Procesos que determinan el comportamiento de los plaguicidas en suelo..... | 40 |
| Tabla II.1. | Límites inferiores de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) por HPLC para MCPA y S-metolaclo-ro..... | 91 |
| Tabla II.2. | Propiedades físico-químicas e índice de humificación (HIX) de los dos alperujos utilizados..... | 106 |
| Tabla II.3. | Porcentajes para algunos macronutrientes y micronutrientes metálicos y no metálicos contenidos en los dos alperujos utilizados (AJ y AM)..... | 108 |
| Tabla II.4. | Propiedades físico-químicas de los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J, T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M)..... | 113 |
| Tabla II.5. | Porcentajes relativos de los filosilicatos presentes en la fracción arcilla de los tres suelos estudiados sin enmendar (S, C y T)..... | 114 |
| Tabla II.6. | Volúmenes de poro relativos y totales (VT) ($\text{mm}^3 \text{g}^{-1}$) para distintos rangos de tamaño de poro y de los suelos sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M)..... | 115 |
| Tabla II.7. | Coeficientes de adsorción de Freundlich para MCPA en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 10% (p/p) con AJ (S10J, C10J y T10J) y con AM (S10M, C10M y T10M)..... | 121 |
| Tabla II.8. | Coeficientes de desorción de Freundlich, porcentaje de desorción (D) y coeficiente de histéresis (H) para MCPA en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 10% (p/p) con AJ (S10J, C10J y T10J) y con AM (S10M, C10M y T10M)..... | 123 |
| Tabla II.9. | Coeficientes de ajuste a una cinética de primer orden y Vidas media ($T_{1/2}$) para MCPA en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 10% (p/p) con AJ (S10J, C10J y T10J) y con AM (S10M, C10M y T10M)..... | 126 |
| Tabla II.10. | Coeficientes de adsorción de Freundlich para S-metolaclo-ro en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M)..... | 135 |
| Tabla II.11. | Coeficientes de desorción de Freundlich, porcentaje de desorción (D), y el coeficiente de histéresis (H) para S- | 138 |

| | | |
|---------------------|---|-----|
| | metolacloro en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M)..... | |
| Tabla II.12. | Coeficientes de ajuste a una cinética de primer orden y Vidas media ($T_{1/2}$) para S-metolacloro en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M)..... | 140 |
| Tabla II.13. | Porcentajes totales lixiviados, residual en la columna empaquetada a mano y Total calculado de S-metolacloro en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados al 5% y 10%..... | 145 |
| Tabla III.2. | Coeficientes de adsorción para bentazona y S-metolacloro K_f , n_f , en el suelo S sin enmendar y enmendado en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10)..... | 175 |
| Tabla III.3. | Coeficientes de desorción para bentazona y S-metolacloro K_{fdes} y n_{fdes} en el suelo S sin enmendar y en los suelos enmendados en campo con orujo y alperujo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10)..... | 176 |
| Tabla III.4. | Coeficientes de ajuste a una cinética de primer orden y Vidas medias ($T_{1/2}$) para bentazona y S-metolacloro en el suelo sin enmendar y enmendado en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10). Porcentaje mineralizado de bentazona y de los residuos no extraíbles de la misma determinados por combustión durante el estudio de disipación-mineralización..... | 181 |
| Tabla III.5. | Porcentaje de bentazona lixiviado, extraído y total recuperado del suelo de las columnas empaquetadas a mano..... | 186 |
| Tabla IV.1. | Propiedades físico-químicas y textura de del suelo contenido en las macetas, sin enmendar (H) y enmendado al 5% y 10 % (p/p) con AJ (H5J y H10J, respectivamente)..... | 207 |
| Tabla IV.2. | Coeficientes de adsorción para terbutilazina (T) y glifosato (G) en el suelo sin enmendar (H) y enmendados al 5% y 10% con alperujo (H5J y H10J)..... | 208 |
| Tabla V.1. | Cebadores usados en las distintas reacciones de PCR..... | 232 |
| Tabla V.2. | Programas usados en el termociclador para las reacciones de PCR para cada uno de los cebadores..... | 232 |
| Tabla V.3. | Composición de las soluciones desnaturalizantes S0 y S100 a partir de las que se preparan las soluciones S20 y S70..... | 235 |
| Tabla V.4. | Concentración de ARN obtenido tras la extracción y valor del Número de Integridad de ARN (RIN)..... | 238 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Tabla V.5. | Número medio de UFC presentes en las placas inoculadas con los suelos T, T10J, T10J-MCPA Y T10J-Smetolacloro..... | 240 |
| Tabla V.6. | Número de UFC de color blanco y azul en placas tratadas con concentraciones crecientes de MCPA..... | 240 |
| Tabla V.7. | Presencia (X) o ausencia (-) de las cepas (A1-A24) secuenciadas en los suelos T0, T10J, T10MCPA y T10JS-metolacloro..... | 241 |
| Tabla V.8. | Tolerancia (T) y no tolerancia (NT) al herbicida MCPA a las dosis 2, 3, 5, 7, 10 kg ha ⁻¹ | 242 |
| Tabla V.9. | Tolerancia (T) y no tolerancia (NT) al herbicida S-metolacloro a las dosis 2, 3, 5, 7, 10 kg ha ⁻¹ | 243 |
| Tabla V.10. | Morfología y número de UFC en placas TSA inoculadas con extracto del alperujo AM..... | 245 |
| Tabla V.11. | Morfología y número de UFC en placas TSA inoculadas con extracto del alperujo AJ..... | 246 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|----------------------|--|-----|
| Figura I.1. | Procesos por los que se pueden incorporar los plaguicidas al suelo..... | 39 |
| Figura I.2. | Procesos que determinan el comportamiento de los plaguicidas en suelo..... | 42 |
| Figura I.3. | Tipos de isotermas de adsorción según <i>Giles et al.</i> (1960)..... | 46 |
| Figura I.4. | Cinéticas de biodegradación de los plaguicidas..... | 64 |
| Figura I.5. | Esquema de los sistemas de centrifugación tradicional, en tres fases y el actualmente más usado, de dos fases. Adaptación de <i>Morillo et al.</i> (2009)..... | 69 |
| Figura II.1. | Estructura tridimensional de la molécula de MCPA. Círculos rojos: átomos de oxígeno; grises: carbonos; blancos: hidrógenos y verde: átomo de cloro..... | 89 |
| Figura II.2. | Estructura tridimensional de la molécula de <i>S</i> -metolacloro Círculos rojos: átomos de oxígeno; grises: carbonos; blancos: hidrógenos; verde: átomo de cloro y azul: nitrógeno..... | 90 |
| Figura II.3. | Cromatógrafo (izquierda) y contador de centelleo (derecha)..... | 91 |
| Figura II.4. | Situación de los puntos de muestreo de los suelos S, C y T (amarillo) y procedencia de los alperujos AJ y AM (blanco)..... | 94 |
| Figura II.5. | Porosímetro de Intrusión de Mercurio (Quantachrome Poremaster 33 GT) (izquierda) y agregados secos para analizar (derecha)..... | 96 |
| Figura II.6. | Matraces biométricos usados en los estudios de respiración basal de los suelos..... | 98 |
| Figura II.7. | Esquema del método batch de la adsorción de los herbicidas (círculos rojos) en los suelos..... | 99 |
| Figura II.8. | Esquema del método de desorción de MCPA de los suelos a partir de una solución 50µM..... | 100 |
| Figura II.9. | Tarros herméticos para el estudio de disipación..... | 101 |
| Figura II.10. | Columnas de vidrio empaquetadas a mano con los suelos sin enmendar y enmendados para los estudios de movilidad..... | 103 |
| Figura II.11. | Preparación de las macetas para los bioensayos de MCPA y <i>S</i> -metolacloro..... | 105 |
| Figura II.12. | Espectro de fluorescencia normalizados al máximo de emisión para la MOS extraída de los alperujos Jaén (AJ, línea amarilla) y Morón (AM, línea azul) a pH de extracto (línea continua) y a pH 2 (línea discontinua)..... | 109 |
| Figura II.13. | Bandas de absorción expresadas en Transmitancia de los espectros FTIR de los extractos de MOS para AJ (línea amarilla) y AM (línea azul)..... | 111 |
| Figura II.14. | Volúmenes relativos (histograma) y acumulados (curva) de poro (mm ³ g ⁻¹) para distintos rangos de tamaño de poro de los suelos usados sin | 117 |

| | | |
|----------------------|--|-----|
| | enmendar (S, C, T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M). El volumen total de poro (VT) se representa como el número sobre la curva relativa..... | |
| Figura II.15. | Producción de CO ₂ kg ⁻¹ de suelo por microorganismos presentes en los suelos C (izquierda) y T (derecha) sin enmendar y enmendados con AJ a las dosis de 5% y 10% (p/p) (C5J, T5J, C10J y T10J)..... | 119 |
| Figura II.16. | Isotermas de adsorción de MCPA en los suelos S (arriba), C y T (abajo) sin enmendar y enmendados con AJ y AM al 10% (p/p) (S10J, C10J, T10J, S10M, C10M y T10M)..... | 120 |
| Figura II.17. | Isotermas de adsorción-desorción (puntos negros y azules, respectivamente) de MCPA en los suelos S (columna izquierda de la figura), C (columna central) y T (columna derecha de la figura) sin enmendar y enmendados con AJ y AM a la dosis de 10% (p/p) (S10J, C10J, T10J, S10M, C10M y T10M)..... | 124 |
| Figura II.18. | Curvas de disipación de MCPA en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados con AJ y AM al 10% (p/p) (S10J, C10J, T10J, S10M, C10M y T10M)..... | 125 |
| Figura II.19. | Curvas de mineralización de MCPA en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J)..... | 128 |
| Figura II.20. | Curvas de elución relativa (izquierda) y acumulada (derecha) de MCPA en los suelos sin enmendar y enmendados con AJ y AM al 10% (p/p). Los porcentajes totales eluidos y los errores respecto a la media se muestran junto a las curvas acumuladas..... | 131 |
| Figura II.21. | Resultado de los bioensayos con <i>Lepidium sativum</i> L. Efecto de la adición de AJ sobre la fitotoxicidad de MCPA..... | 132 |
| Figura II.22. | Histograma para la biomasa recolectada tras el estudio de bioensayo con las macetas de <i>Lepidium sativum</i> L. tratadas con AJ, con MCPA, por separado, en combinación y en macetas sin tratar con herbicida como controles..... | 133 |
| Figura II.23. | Isotermas de adsorción de S-metolacloro en los suelos S (arriba), C y T (abajo) sin enmendar y enmendados al 5 y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M C10M, T5M y T10M) | 136 |
| Figura II.24. | Isotermas de adsorción-desorción de S-metolacloro en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M)..... | 137 |
| Figura II.25. | Curvas de disipación de S-metolacloro en los suelos S (arriba), C y T (abajo) sin enmendar y enmendados con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M C10M, T5M y T10M)..... | 139 |
| Figura II.26. | Curvas relativas de lixiviación (izquierda) y acumuladas (derecha) para | 142 |

| | | |
|-----------------------|--|-----|
| | S-metolacloro en los suelos sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M)..... | |
| Figura II.27. | Porcentajes de S-metolacloro extraído de las porciones de suelo a distintas profundidades de las columnas de suelo empaquetadas a mano..... | 144 |
| Figura II.28. | Estado de las macetas de raigrás inglés crecidas tras 20 días de ensayo en laboratorio para los tratamientos Control, alperujo, S-metolacloro+AJ y S-metolacloro..... | 146 |
| Figura II.29. | Histograma para la biomasa de raigrás inglés crecida tras 20 días de ensayo en laboratorio para los tratamientos Control, alperujo, S-metolacloro+AJ y S-metolacloro..... | 146 |
| Figura III.1. | Estructura química tridimensional de la molécula de bentazona: Gris: átomo de carbono; azul: nitrógeno; blanco: hidrógeno; amarillo: azufre y rojo: oxígeno..... | 161 |
| Figura III.2. | Distribución al azar de las parcelas experimentales de la granja de INIAP..... | 163 |
| Figura III.3. | Valores relativos (histograma) y acumulados (curva) para los volúmenes de mercurio para los suelos sin enmendar y enmendados en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10)..... | 171 |
| Figura III.4. | Respiración basal del suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y en laboratorio con OW y DW..... | 172 |
| Figura III.5. | Isotermas de adsorción para bentazona (izquierda) y S-metolacloro (derecha) en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10)..... | 173 |
| Figura III.6. | Isotermas de adsorción-desorción para bentazona en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo con alperujo y orujo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10)..... | 177 |
| Figura III.7. | Isotermas de adsorción-desorción para S-metolacloro en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo con alperujo y orujo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10)..... | 178 |
| Figura III.8. | Curvas de disipación para bentazona (izquierda) y S-metolacloro (derecha) y en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y laboratorio con OW (arriba) y DW (abajo)..... | 179 |
| Figura III.9. | Curvas de mineralización para bentazona en el suelo sin enmendar y enmendados con OW (izquierda) y DW (derecha)..... | 180 |
| Figura III.10. | Curvas de disipación de S-metolacloro (círculos blancos) junto con la monitorización de la actividad deshidrogenasa de los suelos usados (cuadrados negros)..... | 183 |

| | | |
|-----------------------|---|-----|
| Figura III.11. | Curvas relativas (A, B, C y D) y acumuladas (E, F, G y H) de lixiviación para bentazona en el suelo sin enmendar y enmendado en laboratorio y campo y curva relativa (I) y acumulada (J) en el suelo S para S-metolacloro..... | 185 |
| Figura III.12. | Porcentaje de bentazona extraído de las columnas alteradas de suelo a distinta profundidades..... | 187 |
| Figura III.13. | Porcentaje de S-metolacloro extraído de las columnas de suelo a distinta profundidades..... | 188 |
| Figura IV.1. | Estructura tridimensional de la molécula de terbutilazina. Círculos grises: átomos de carbono; azules: nitrógenos; blancos: hidrógenos y verde: cloro..... | 200 |
| Figura IV.2. | Estructura tridimensional de la molécula de glifosato. Círculos grises: átomos de carbono; azules: nitrógenos; blanco: hidrógenos y amarillo: fósforo..... | 201 |
| Figura IV.3. | Olivos para el ensayo en el interior del invernadero..... | 202 |
| Figura IV.4. | Fluorímetro modulado portátil..... | 204 |
| Figura IV.5. | Analizador de gases por infrarrojo (IRGA) usado para las mediciones durante el experimento..... | 206 |
| Figura IV.6. | Isotermas de adsorción de terbutilazina (arriba) y de glifosato (abajo) en el suelo (H) sin enmendar y enmendados al 5% y 10% con alperujo (H5J y H10J)..... | 209 |
| Figura IV.7. | Eficiencia fotoquímica potencial del PSII ($F_v F_m^{-1}$) (A-C), Eficiencia real del PSII (Φ PSII) (D-F), y quenching no fotoquímico (NPQ) (G-I) medido al mediodía en los tratamientos de <i>Olea europaea</i> tratados con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TJ) tras: 24 horas (A, D, G); 15 días (B, E, H); y 60 días (C, F, I). Los valores representan la media \pm SE, $n = 9$. Las distintas letras indican que las medias son significativamente diferentes entre sí (Tukey test, $P < 0.05$)..... | 210 |
| Figura IV.8. | Eficiencia fotoquímica potencial del PSII ($F_v F_{m-1}$) (A-C), medida al amanecer en los tratamientos de plantas <i>Olea europaea</i> tratadas con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TJ) tras 60 días. Los valores representan la media \pm SE, $n = 9$. Las distintas letras indica que las medias son significativamente diferentes entre sí (Tukey test, $P < 0.05$)..... | 211 |
| Figura IV.9. | Daño crónico (barras negras) y daño dinámico (barras grises) fotoinhibición de las hojas de plantas adultas de <i>Olea europaea</i> tratados con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TJ) tras: 24 horas (A, D, G); 15 días (B, E, H); y 60 días (C, F, I). Los valores representan las medias \pm SE, $n = 9$ | 214 |
| Figura IV.10. | Tasa fotosintética (A) (A-C), conductancia estomática (Gs) (D-F), y | 215 |

concentración intercelular de CO₂ (Ci) (G-I) en *Olea europaea* tratada con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TJ) tras: 24 horas (A, D, G); 15 días (B, E, H); y 60 días (C, F, I). Los valores representan la media \pm SE, $n = 9$

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura V.1. | Fundamento de la técnica DGGE. Fragmentos de ADN de la misma longitud (rojo: nucleótidos de Adenina; azul Timina; verde: Guanina y morado: Citosina) son separados en función de su contenido en bases Guanina-Citosina (G-C) en un gel con gradiente creciente de Urea-formamida. | 233 |
| Figura V.2. | Equipo de electroforesis D Gene System-Denaturing Gel Electrophoresis para DGGE (BIO RAD)..... | 235 |
| Figura V.3. | Placas medio TSA inoculadas con suelo T10J y T10J-MCPA tras 6 días a 30°C y oscuridad..... | 239 |
| Figura V.4 | Placas con medio TSA inoculado con extractos de los alperujos AJ (izquierda) y AM (derecha)..... | 245 |
| Figura V.5. | Perfil DGGE comparando ADN extraído del suelo T (T0) sin enmendar y enmendado con AJ y AM (T10J y T10M) (derecha) y del suelo S congelado, fresco y enmendados con AJ y AM (S CONGELADO, S FRESCO, S10J y S10M) (izquierda)..... | 247 |
| Figura V.6. | Perfil DGGE comparando ADN y ADNc de los suelos T10J-MCPA y T10J-S-metolacloro AJ y AM..... | 248 |
| Figura V.7. | Absorbancia del medio TSA respecto al tiempo de incubación con el herbicida MCPA (arriba) y cinética de degradación del herbicida (abajo)..... | 250 |
| Figura V.8. | Absorbancia del medio TSA respecto al tiempo de incubación con el herbicida S-metolacloro (arriba) y cinética de degradación del herbicida (abajo)..... | 251 |
| Figura V.9. | Arriba placa de Petri en medio TSA con evidencia de las formaciones circulares (calvas) consecuencia de la presencia de fagos en la población microbiana. Abajo, detalle de una calva..... | 252 |

ABREVIATURAS:

A: Tasa Fotosintética Neta.

ADH: Actividad deshidrogenasa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADN_c: Ácido desoxirribonucleico complementario.

AJ: Alperujo Jaén usado en Capítulo II.

AM: Alperujo Morón usado en Capítulo II.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNr 16S: Ácido ribonucleico que codifica para los ribosomas 16S.

ARNasas: Enzimas degradadoras de ARN.

C: Macetas control (sin tratar con herbicida ni con alperujo), Capítulo IV.

C: Porcentaje celulosa.

C: Suelo procedente de Las Cabezas de San Juan, Sevilla, Capítulo II.

CAF: Fracción de carbono asociada a los ácidos fúlvicos.

CAH: Fracción de carbono asociada a los ácidos húmicos.

CCC: Capacidad de cambio catiónico.

C_e: Concentración de soluto en equilibrio.

CE: Conductividad eléctrica.

C_i: Concentración de soluto inicial.

C_i: Conductancia intracelular de CO₂.

CO: Carbono orgánico.

COS: Carbono orgánico soluble.

COT: Carbono orgánico total.

C_s: Concentración de soluto adsorbida por unidad de masa del sólido.

CTAB: Solución tampón de bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

C5J: Suelo C enmendado al 5% (p/p) con alperujo AJ.

C5M: Suelo C enmendado al 5% (p/p) con alperujo AM.

C10J: Suelo C enmendado al 10% (p/p) con alperujo AJ.

C10M: Suelo C enmendado al 10% (p/p) con alperujo AM.

D: Porcentaje de desorción.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DGGE: Electroforesis en gel en gradiente desnaturizante.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

Dpm: Desintegraciones por minuto.

DW: Orujo usado en el Capítulo III.

DW5: Suelo S enmendado en laboratorio al 5% (p/p) con DW.

DW10: Suelo S enmendado en laboratorio al 10% (p/p) con DW.

DW27: Suelo S enmendado en el campo con 27 Tn Ha⁻¹ con DW.

DW54: Suelo S enmendado en el campo con 54 Tn Ha⁻¹ con DW.

F₀: Fluorescencia basal.

FTIR: Espectroscopia de infrarrojos.

F_vF_m⁻¹: Eficiencia Fotoquímica Potencial del PSII.

GJ: Macetas tratadas con glifosato y con AJ en el Capítulo IV.

GP: Grado de polimerización de la materia orgánica.

G_s: Conductancia estomática.

H: Coeficiente de histéresis.

H: Porcentaje de hemicelulosa.

H: Suelo contenido en las macetas usado para el Capítulo IV.

HIX: Índice de humificación.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

H5J: Suelo H enmendado al 5% (p/p) con AJ.

H10J: Suelo H enmendado al 10% (p/p) con AJ.

IF: Formazán idonitrotetazolio.

INT: 2-*p*-iodofenil-3 *p*-nitrofenil-5 cloruro de tetrazolio.

IRGA: Analizador de gases por infrarrojos.

K: Constante de disipación.

K_d: Coeficiente de distribución.

K_f o K_{fads}: Coeficiente de adsorción de Freundlich.

K_{fdes}: Coeficiente de desorción de Freundlich.

K_{oc}: Coeficiente de distribución en función del CO contenido del suelo.

K₀: Concentración inicial del herbicida en estudios de disipación.

LC: Porcentaje de lignina-cutina.

LOD: Límite inferior de detección de compuestos orgánicos por HPLC.

Log P: (log Kow) coeficiente de reparto octanol agua.

LOQ: Límite inferior de cuantificación de compuestos orgánicos por HPLC.

LSC: Conteo con líquido de centelleo.

MCPA: Ácido (4-cloro-2metilfenoxi) acético.

MOS: Materia orgánica soluble.

MOT: Materia orgánica total.

N: Porcentaje de Nitrógeno Kjeldahl (Nitrógeno biodisponible).

NPQ: Quenching no fotoquímico.

OW: Alperujo usado en Capítulo III.

OW5: Suelo S enmendado al 5% (p/p) con OW.

OW10: Suelo S enmendado al 10% (p/p) con OW.

OW30: Suelo S enmendado con 30 Tn Ha⁻¹ de OW.

OW60: Suelo S enmendado con 60 Tn Ha⁻¹ de OW.

PI_{chr}: Fotoinhibición crónica.

PI_{din}: Fotoinhibición dinámica.

PSII: Fotosistema II.

P2: Cebador P2.

P3: Cebador P3.

Φ_{PSII} : Eficiencia Real del PSII.

Rpm: Revoluciones por minuto.

S: Suelo arenoso de Coria del Río, Sevilla, usado en el Capítulo II.

S: Suelo procedente de Elvas, Portugal, usado en el Capítulo III.

SCONGELADO: Suelo S arenoso procedente de Coria del Río, usado en el Capítulo V.

S5J: Suelo S enmendado al 5% (p/p) con alperujo AJ.

S10J: Suelo S enmendado al 10% (p/p) con alperujo AJ.

S5M: Suelo S enmendado al 5% (p/p) con alperujo AM.

S10M: Suelo S enmendado al 10% (p/p) con alperujo AM.

T: Suelo procedente de Tocina, usado en Capítulo II.

T: Macetas tratadas con el herbicida terbutilazina en el Capítulo IV.

TEMED: N, N, N, N' - tetrametiletilendiamina.

TJ: Macetas tratadas con terbutilazina en combinación con AJ en el Capítulo IV.

T_{1/2}: Vida media.

TOC: Analizador de Carbono Orgánico Total.

TSA: Medio de crecimiento selectivo.

T0: Suelo T antes de realizar incubación con herbicidas.

T5J: Suelo T enmendado al 5% (p/p) con alperujo AJ.

T10J: Suelo T enmendado al 10% (p/p) con alperujo AJ.

T5M: Suelo T enmendado al 5% (p/p) con alperujo AM.

T10M: Suelo T enmendado al 5% (p/p) con alperujo AM.

1/nf: Constante considerada medida de la intensidad de adsorción.

UFC: Unidad formadora de colonias.

VTP: Volumen total de poro.

Capítulo I
Introducción general

I.1.-Antecedentes

Uno de los pilares de la economía española lo constituye la producción agrícola, y es que España cuenta con la segunda extensión agraria más importante de Europa (en torno a 16-18 millones de hectáreas), cuyo Valor Añadido Bruto (VAB) agrario, a precios básicos, se situó en 2010 en tercer lugar entre los países de la Unión Europea, después de Italia y de Francia, así como, constituye también la contribución más importante de Europa a la Red Natura 2000 (MAGRAMA, 2010). Sin embargo, el sector agrícola se ha visto durante años perjudicado por grandes pérdidas económicas generadas por la acción de patógenos y parásitos sobre los cultivos. En los últimos 50 años, la introducción del uso de sustancias xenobióticas, principalmente **plaguicidas**, con el fin de combatir plagas y enfermedades, ha conseguido compensar éstas pérdidas en los cultivos, haciendo que el uso de plaguicidas sea indispensable en el sector agrícola. Gracias a esto y a otras estrategias agrícolas, la producción en los cultivos se ha visto incrementada y se ha podido afrontar la gran demanda de alimentos que una población cada vez mayor solicitaba (FAO, 2012).

De acuerdo con los informes de la FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas), a pesar del uso de plaguicidas gran parte de las cosechas se pierden, llegando estas pérdidas a suponer hasta un 25% en los países desarrollados. Uno de los motivos de que ocurra esto es que frecuentemente sólo entre un 1 y un 20% del producto aplicado alcanza la plaga diana contra la que se pretendía actuar y, por tanto, gran parte del compuesto se dispersa en el ambiente, siendo tanto el producto, como sus residuos, susceptibles de sufrir procesos de degradación, lixiviación o escorrentía en los suelos. Esto ha conducido al aumento en las dosis de aplicación de estos compuestos en los suelos y plantas, hasta lograr obtener provecho en las cosechas. Sin duda, este incremento supone un beneficio en el sector agrícola, pero la aplicación repetida de plaguicidas en exceso a lo largo de los años, puede llegar a convertirse en fuente de contaminación puntual y/o difusa de suelos y aguas superficiales y subterráneas de plaguicidas y los residuos de éstos. Esta práctica causa que los plaguicidas alcancen lugares para los que no estaban destinados, como por ejemplo las aguas subterráneas y superficiales, suponiendo un grave riesgo tanto para el ecosistema y organismos que lo habitan, como para el ser humano. Actualmente, la Política Agraria Comunitaria (PAC)

legisla el uso adecuado de estas sustancias, desarrollando estrategias para un uso sostenible y racional de los mismos en el medio ambiente.

El suelo como sistema complejo, dinámico y vivo, es soporte para compartimentos de diversa naturaleza como tierra, agua, aire, así como para organismos vegetales, animales y microorganismos en continua interacción. Todo esto en su conjunto, presenta la capacidad dentro de una medida, de autodepuración frente a sustancias xenobióticas como son los plaguicidas, contrarrestando, o amortiguando el impacto producido por su aplicación (Cornejo et al., 2005). Sin embargo, en los últimos años el aporte de éstos al suelo supera la propia capacidad del mismo de amortiguar su daño, pasando los agroquímicos a ocupar espacios del ecosistema para los que no estaban destinados (aguas superficiales, subterráneas, etc). Y es aquí donde reside el origen de la problemática derivada del uso abusivo de plaguicidas. Este creciente conflicto ha despertado la necesidad de estudiar en profundidad el comportamiento de estos compuestos en suelo, y poder así minimizar su impacto sobre la salud humana y el medio ambiente.

Aragón et al. (2001) detectó valores máximos de 1.96 y 0.6 $\mu\text{g l}^{-1}$ de herbicidas como la terbutilazina y el glifosato, respectivamente, en aguas subterráneas, siendo la familia más representativa en este estudio la de las triazinas. Otros estudios han detectado otros compuestos orgánicos en aguas subterráneas a valores también superiores a los establecidos por la Directiva CE sobre agua potable 80/778/EC y la nueva directiva 98/83/CE en la que la máxima concentración para un plaguicida es 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ o la suma total de todos los plaguicidas presentes, 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Carabías-Martínez et al., 2003; Arias-Estévez et al., 2008; Hildebrandt et al., 2008; Hermosín et al., 2013).

Como consecuencia se modificaron la autorizaciones del uso de algunas materias activas, como es el caso de terbutilazina, por parte del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPYA), restricciones y suspensiones temporales a nivel nacional que se ideaban en determinados ámbitos territoriales de riesgo en base a su proximidad a embalses destinados a la producción de aguas de consumo humano, constituyéndose dosis máxima permitida de terbutilazina, 1 kg ha^{-1} y año de sustancia activa en el olivar, como ejemplo (Liñán, 2009).

Además de la restricción en el uso de las materias activas aplicadas, el Plan de Acción Nacional (PAN) para el uso sostenible de productos fitosanitarios recoge el

reglamento para la correcta gestión, manejo y control de estos productos con el objeto de preservar el paisaje agrícola y reducir los efectos derivados de su uso en salud humana, animales y medio ambiente. Esto es especialmente importante en escenarios de riesgo como es el cultivo del olivar, para el control de contaminación de aguas y optimización de la eficiencia en el uso de plaguicidas (Manual de buenas prácticas en el olivar, 2006).

I.2.-Dinámica de los plaguicidas en el suelo

Los plaguicidas pueden incorporarse al suelo a través de tres vías principales. En primer lugar como aplicación directa, típica de tratamientos sobre la superficie del suelo de los cultivos, en segundo lugar sobre las partes aéreas de las plantas, a través de la cual puede posteriormente ser arrastrado al suelo por la lluvia y/o el viento, y en tercer lugar, por medio de restos vegetales desprendidos durante el periodo de cosecha o deposición de partículas suspendidas en el aire, que transportan restos de plaguicidas y sus residuos al suelo.



Figura I.1. Procesos por los que se pueden incorporar los plaguicidas al suelo.

Una vez que el plaguicida se ha incorporado al suelo, sufre la acción de diversos procesos simultáneamente, los cuales se pueden agrupar en dos grandes tipos: procesos de transferencia o transporte y procesos de transformación o degradación (Tabla I.1).

Los **procesos de transferencia** son aquellos por los que el plaguicida se ve desplazado de unos a otros compartimentos del suelo sin experimentar ningún tipo de transformación química. En este grupo se engloban los procesos de adsorción, desorción, volatilización, lixiviación, escorrentía, difusión y arrastre por aire o suelo y absorción y exudación por organismos vivos. Los **procesos de transformación**, implican modificación de las propiedades químicas de los plaguicidas, transformándolos en otros compuestos distintos, que pueden presentar la misma, menor o mayor toxicidad. Estos procesos son la degradación química, biodegradación o fotodegradación.

Tabla I.1. Procesos que determinan el comportamiento de los plaguicidas en suelo.

| PROCESOS DE TRANSFERENCIA | PROCESOS DE TRANSFORMACIÓN |
|---|---|
| -Adsorción-desorción -Volatilización -Lixiviación -Escorrentía -Difusión-arrastre -Absorción-exudación | -Fotodegradación -Biodegradación -Degradación química |

Es de gran importancia considerar que todos los mecanismos que se mencionan en la Tabla I.1. se pueden dar simultáneamente en los distintos compartimentos que conforman el sistema suelo. Además, estos procesos pueden afectarse unos a otros en mayor o menor medida, siendo el comportamiento en suelo de los plaguicidas resultado de la acción conjunta de todos ellos. El proceso de adsorción constituye el mecanismo más relevante de todos, ya que condiciona el efecto de cada uno de los demás al modificar la cantidad de plaguicida en disolución y por ello la cantidad disponible para lixiviar, volatilizar, perderse por escorrentía o ser absorbida por plantas u otros organismos.

I.2.1.-Procesos de transferencia

I.2.1.1.-Procesos de adsorción-desorción

Los procesos de **adsorción** se definen como el paso de una especie química desde una fase líquida o gaseosa a la superficie de una fase sólida sin producir cambios en la estructura molecular de la misma (Osgerby, 1970). Los procesos de adsorción en el suelo ocurren con mayor frecuencia entre la disolución y la fase sólida del mismo, ya que ésta última se encuentra muchas veces rodeada de una fina capa de agua y sólo en casos de extrema aridez, se produciría la adsorción desde la fase gaseosa hasta la sólida (Pignatello, 1989). El proceso de adsorción se debe a la atracción o repulsión entre la superficie del adsorbente del suelo y las moléculas o iones del adsorbato (plaguicida) (Calvet, 1989). Ya se ha comentado anteriormente que los procesos de adsorción son determinantes en la dinámica del plaguicida en suelo, ya que dispone la cantidad libre del mismo en solución y por tanto que puede sufrir procesos de transformación o de transporte por otros procesos (Cornejo et al., 2005). Por ejemplo, la volatilización, la lixiviación o la biodisponibilidad, pueden verse reducidas con la adsorción (Ferreira et al., 2002), mientras que la degradación química o el transporte por partículas en suspensión pueden verse favorecidos (Cox et al., 1993).

Otro proceso también implicado en la cantidad de plaguicida que se encuentra disponible en la solución del suelo, es el proceso inverso a la adsorción: la **desorción**. Durante éste, las sustancias adsorbidas a la fase sólida vuelven a la disolución o a su fase gaseosa. En caso de desorción total de las moléculas adsorbidas, se habla de **adsorción reversible** (Wauchope y Myers, 1985; Monkiedje y Spiteller, 2002), pero si las moléculas adsorbidas se desorben parcialmente, se habla entonces de **adsorción irreversible** (Cox et al., 1995; Fogg et al., 2003). La irreversibilidad o también llamada histéresis, es un fenómeno esencial en la dinámica de plaguicidas ya que en gran medida, determina la biodisponibilidad del mismo en estos sistemas (Wauchope et al., 2002).

Las fuerzas de atracción responsables de los procesos de adsorción pueden ser de diferentes tipos y se identifican con distintos mecanismos de adsorción. En función de las propiedades de los solutos y de la superficie adsorbente, son posibles varios tipos de mecanismos que pueden ocurrir simultáneamente.

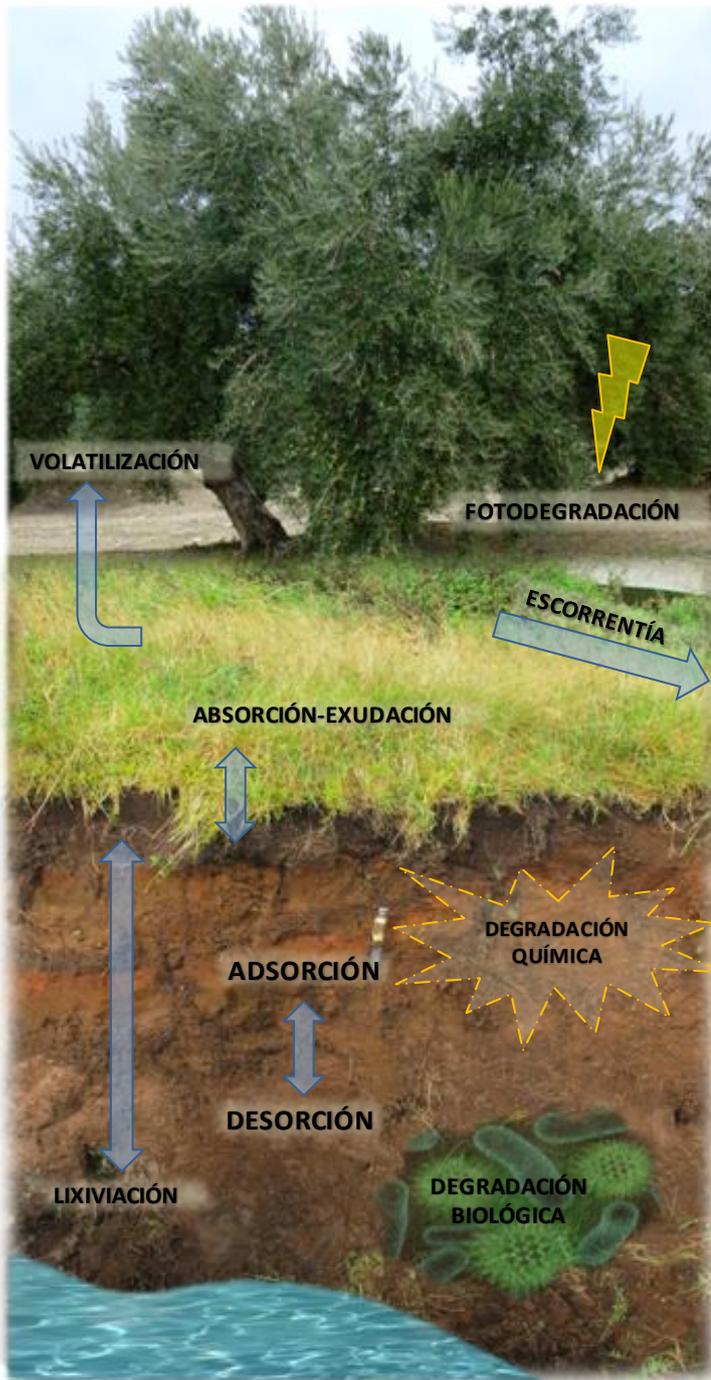


Figura I.2. Procesos que determinan el comportamiento de los plaguicidas en suelo.

a) *Mecanismos de adsorción*

La adsorción y retención de plaguicidas en la fase sólida del suelo se debe a una serie de mecanismos que implican fuerzas de atracción. Normalmente no se da un único mecanismo, ya que en la mayoría de los casos la retención de los plaguicidas se produce por una variedad de fuerzas y factores. Según Cornejo y Hermosín. (1996) existen mecanismos favorecidos por cambios de entalpía como son el enlace iónico, el enlace covalente, fuerzas de Van der Waals, puentes de Hidrógeno, transferencia de carga y cambio de ligando y otros mecanismos en los que la adsorción produce cambios de entropía, como ocurre en las interacciones hidrofóbicas.

b) *Medida de adsorción*

La medida y caracterización de la adsorción permite investigar los mecanismos de este tipo de interacciones y obtener por tanto, resultados comparativos entre adsorbatos (plaguicidas) y adsorbentes (partículas del suelo) diferentes y en diversas condiciones (Beck et al., 1993). El grado de adsorción al suelo se caracteriza normalmente por una constante de reparto K_d , con el subíndice "d" para indicar distribución. Se define como la proporción entre la cantidad de moléculas adsorbidas y la cantidad de moléculas en disolución en el equilibrio:

$$K_d = \frac{C_s}{C_e}$$

Siendo C_e la concentración de soluto en equilibrio con el suelo y C_s la cantidad adsorbida por unidad de masa del sólido.

Frecuentemente se asume que C_s depende linealmente de C_e y se define un coeficiente de distribución, K_d , como:

$$K_d = \frac{C_s}{C_e} \quad \text{Ecuación I.1.}$$

Esta forma lineal generalmente describe correctamente el equilibrio a bajas concentraciones de adsorbato en la fase líquida. El coeficiente K_d puede utilizarse para comparar el grado de adsorción de diferentes compuestos en un mismo suelo o de un mismo compuesto en diferentes suelos bajo condiciones experimentales determinadas y a la concentración inicial del compuesto en cuestión. Por lo general, valores elevados de K_d , indican que el plaguicida presenta una gran afinidad por el adsorbente y se suelen corresponder con plaguicidas de naturaleza hidrofóbica e insolubles en agua (Wauchope et al., 2002).

No obstante, en muchos de los casos la relación entre la cantidad adsorbida y la cantidad en disolución no es lineal, por lo que el valor de K_d depende de la concentración a la que se evalúe. En estos casos, una caracterización adecuada de la adsorción requiere la obtención de isotermas de adsorción.

Isotermas de adsorción

Las isotermas de adsorción representan la cantidad adsorbida por unidad de masa del sólido (C_s) en función de la concentración de soluto en equilibrio (C_e) a una determinada temperatura. Para eso se hacen interaccionar cantidades conocidas de sólido y soluciones de plaguicida con diferentes concentraciones iniciales (C_i). Una vez alcanzado el equilibrio, se determina la cantidad de plaguicida en disolución C_e , así como la cantidad adsorbida, C_s , para las distintas concentraciones conocidas.

El valor de C_s se puede obtener directamente, determinando la cantidad de plaguicida que queda adsorbida en suelo tras la extracción del mismo por técnicas adecuadas, o indirectamente, por diferencia entre la cantidad inicial del plaguicida y la cantidad en equilibrio, asumiendo que la desaparición del plaguicida se debe a la adsorción y no a otros procesos que puedan ocurrir.

La forma de estas isotermas es una característica de gran importancia porque proporciona mucha información acerca de los mecanismos de adsorción que se dan (Calvet, 1989) y está también relacionada con la naturaleza de la molécula a adsorber y de la superficie adsorbente. Según Giles et al. (1960), las isotermas de adsorción pueden ser clasificadas en cuatro tipos distintos, dependiendo de la forma de la pendiente del tramo inicial de la curva. A continuación se describen.

Isotermas tipo S

Estas isotermas son típicas de adsorbentes con una alta afinidad por el disolvente. La curvatura inicial de la isoterma indica que la adsorción en partículas del suelo se ve facilitada a medida que aumenta la concentración del soluto. Esto implica que ocurra una asociación entre las moléculas adsorbidas, y las moléculas aún en solución, constituyendo lo que se denomina “adsorción cooperativa”. Estas isotermas pueden observarse cuando ocurre una interacción específica entre el soluto y el adsorbente, una atracción intermolecular moderada o competencia entre el soluto, el disolvente y las moléculas adsorbidas por los sitios específicos de adsorción.

Isotermas tipo L

En ellas se observa una alta afinidad relativa entre el adsorbato y el adsorbente en la fase inicial de la curva. A medida que transcurre la adsorción, aumenta la dificultad para que las moléculas de soluto encuentren sitios de adsorción vacantes. Estas isotermas indican múltiples interacciones entre el soluto y el adsorbente, una fuerte atracción molecular entre las moléculas de soluto o poca competencia entre el soluto y el disolvente por los sitios de adsorción.

Isotermas tipo C o de reparto constante

Se caracterizan por representar una relación lineal entre la cantidad de soluto adsorbido y la concentración del mismo en disolución en equilibrio. Muestran una partición del adsorbato independiente a la concentración del mismo. Son típicas en las interacciones entre compuestos no iónicos y superficies orgánicas y la mayoría de los compuestos químicos en un estrecho rango de concentraciones.

Isotermas tipo H

Son isotermas muy poco comunes y se consideran un caso especial de las isotermas tipo L. Se observan cuando hay una afinidad muy elevada entre el soluto y la superficie adsorbente, sobre todo a bajas concentraciones del primero, donde todo o prácticamente todo, queda adsorbido en la superficie.

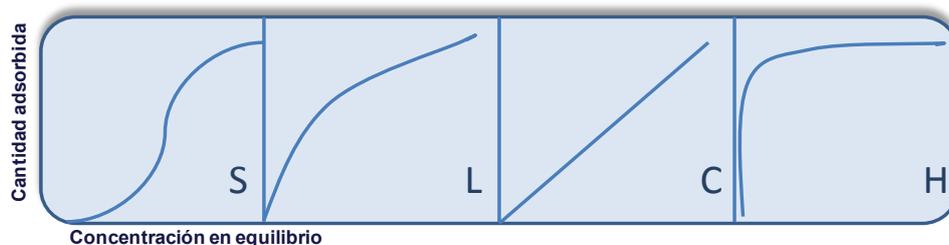


Figura I.3. Tipos de isothermas de adsorción según *Giles et al.* (1960).

Modelos de adsorción

Para la descripción cuantitativa de los procesos de adsorción, las isothermas obtenidas experimentalmente suelen ajustarse a diferentes ecuaciones matemáticas o modelos de adsorción. La más frecuentemente usada en estos casos es la de Freundlich.

La ecuación de Freundlich es una ecuación empírica que relaciona la cantidad de soluto adsorbido con la concentración en equilibrio existente en disolución y se expresa como:

$$C_s = K_f \times C_e^{1/n_f} \quad \text{Ecuación I.2.}$$

O su expresión logarítmica:

$$\text{Log}C_s = \text{log}K_f + 1/n_f \times \text{log}C_e \quad \text{Ecuación I.3.}$$

Donde C_s es la cantidad de plaguicida adsorbido, C_e la cantidad de plaguicida en el equilibrio y K_f y $1/n_f$ son constantes características que pueden obtenerse del ajuste lineal de los datos de $\text{log} C_s$ frente a $\text{log} C_e$.

El valor absoluto de K_f corresponde a la cantidad de plaguicida adsorbido cuando la concentración del plaguicida en el equilibrio es igual a la unidad y es considerada como una medida de la capacidad de adsorción del suelo para el plaguicida en cuestión. El parámetro $1/n_f$ es la pendiente de la representación lineal de $\text{log} C_s$ frente a $\text{log} C_e$ y se considera una medida de la intensidad de adsorción. Los valores de K_f permiten comparar la capacidad de adsorción de diferentes plaguicidas y de distintos suelos, siempre y cuando se hayan utilizado condiciones experimentales similares (Bowman y Sans, 1985) y los valores de $1/n_f$ sean parecidos (Hance, 1967). También es importante

que el valor de $C_e=1$ esté dentro o muy cerca del intervalo de concentraciones experimentales (Hermosín y Cornejo, 1987).

Cuando $1/n_f$ es igual a 1, la ecuación de Freundlich se expresa como: $C_s=K_f \times C_e$ y se cumple la relación lineal existente entre C_s y C_e , y además, K_f coincide con el coeficiente de distribución K_d , siendo independiente de la concentración. Cuando $1/n_f$ difiere de la unidad el error introducido al asumir una relación lineal entre C_s y C_e depende del valor de $1/n_f$ y de la concentración. A medida que el valor de $1/n_f$ se aleja de la unidad, las diferencias entre K_f y K_d se hacen mayores, especialmente para valores de C_e muy alejados de la unidad (Hamaker y Thompson, 1972; Green y Karichoff, 1990).

Al igual que las isothermas de adsorción, las isothermas de desorción se pueden ajustar a la ecuación de Freundlich. El estudio de la desorción suele llevarse a cabo mediante diluciones sucesivas, por las que, tras la medida de la adsorción, se sustituye parte de la disolución de equilibrio por una disolución libre de plaguicida permitiendo que se restablezca el equilibrio. Cuando la isoterma de desorción no coincide con la de adsorción, se dice que existe un fenómeno de histéresis. La diferencia entre las cantidades de plaguicida adsorbidas durante la desorción y en la adsorción indica el grado de histéresis. La magnitud de la reversibilidad del proceso de adsorción puede expresarse por el coeficiente de Histéresis o H que se pueden calcular como el cociente entre los valores de $1/n_f$ de la desorción y la adsorción (O'Connor et al., 1980; Barriuso et al., 1994).

Los fenómenos de histéresis pueden deberse a la presencia de moléculas de plaguicidas fuertemente adsorbidas o atrapadas en los poros de la materia orgánica o de las partículas de arcilla, y por tanto irreversiblemente adsorbidas a los coloides del suelo. (Wauchope y Myers, 1985).

$$H = \frac{1/n_{f \text{ des}}}{1/n_{f \text{ ads}}} \quad \text{Ecuación I.4.}$$

El coeficiente H puede oscilar entre 0, para procesos completamente irreversibles, y 1, cuando la isoterma de desorción sigue la misma tendencia que la de adsorción. La existencia de histéresis puede ser atribuible a artefactos experimentales como por ejemplo: no alcanzar las condiciones de equilibrio durante la adsorción, eliminación de partículas de suelo durante la desorción, formación de precipitados o pérdidas de plaguicida por volatilización, degradación o ambos, así como a cambios en la

composición del sistema producidos durante la dilución de la disolución de equilibrio tras la adsorción (Koskinen y Harper, 1990; Gu, 1994). Sin embargo, en otras ocasiones la existencia de histéresis puede ser causa de la deformación de los poros del suelo, lo que origina que el camino de la adsorción difiera del de la desorción (Braida et al., 2003), o bien por la formación de residuos irreversiblemente adsorbidos a las partículas de suelo, donde la desorción es cinéticamente tan lenta que hace que experimentalmente no sea posible observarla (Karickhoff, 1982; Celis y Koskinen., 1999). Así, por ejemplo, Celis y Koskinen (1999) cuantificaron, mediante un método basado en intercambio isotópico, la fracción del plaguicida adsorbido de forma irreversible en un experimento de adsorción, sugiriendo un incremento en el componente irreversible de la adsorción a bajas concentraciones de plaguicida y mayores tiempos de equilibrio. Este método podría, por tanto, tener utilidad para ser incorporado en modelos predictivos que tengan en cuenta la irreversibilidad.

c) Factores que influyen en los procesos de adsorción-desorción. Propiedades físico-químicas del plaguicida

Las características físicas y químicas del plaguicida pueden indicarnos su comportamiento en la adsorción. Entre las características más determinantes destacan la estructura, carga y tamaño molecular, además de su solubilidad en agua.

Con respecto a la *estructura molecular*, Gramática y Di Guardo. (2002) hacen una aproximación que permite una rápida pre-determinación y monitorización de la distribución medio ambiental de los plaguicidas conociendo sólo la estructura molecular de los mismos. Según Bailey y White. (1970), los factores estructurales que determinan el carácter químico de los plaguicidas, y por tanto, su influencia en la adsorción son: la naturaleza de los grupos funcionales, la naturaleza y posición de los grupos sustituyentes respecto al grupo funcional y la presencia y magnitud de insaturaciones en la molécula que puede afectar al balance hidrofílico-hidrofóbico.

La *carga molecular* del compuesto orgánico y su distribución son factores a tener en cuenta en el proceso de adsorción. Los compuestos que existen en disolución como los cationes, son rápidamente atraídos por las superficies con carga negativa de los minerales de la arcilla y de las sustancias húmicas. Por el contrario, los compuestos aniónicos son repelidos por éstos constituyentes del suelo, aunque son atraídos por las

superficies de carga positiva como son los óxidos metálicos. En ambos casos pueden establecerse enlaces iónicos y la adsorción será proporcional a la densidad de carga y dependerá del pH del suelo (Weber et al., 1980, 1986; Weber y Swain, 1993). En otros casos la carga molecular puede ser débil, produciéndose entonces una simple polaridad de molécula y la interacción con la superficie adsorbente como dipolos inducidos o permanentes. En disolución acuosa los plaguicidas con baja polaridad tienen gran dificultad en competir con las moléculas de agua por las superficies polares y, por ello, establecen interacciones con la materia orgánica.

El *tamaño molecular* del plaguicida puede influir en la adsorción por diferentes razones. Por una parte tiene una relación directa con las fuerzas de van der Waals, por lo que en moléculas voluminosas este tipo de interacción puede ser importante en la adsorción. Por otro lado, el mayor tamaño puede impedir que la molécula llegue a los microporos de los óxidos metálicos, minerales de la arcilla y otros componentes del suelo. Además, el tamaño molecular influye en la solubilidad en agua (a mayor tamaño, menor solubilidad) y, por tanto, de una forma indirecta en la magnitud de la adsorción ya que la relación entre el grado de adsorción y la solubilidad de éste no está clara (Nemeth-Konde et al., 2002).

De acuerdo con Calvet. (1989) y Chiou y Kile. (1994), parece haber una correlación negativa entre la solubilidad de los plaguicidas en agua y la adsorción a suelos, especialmente para moléculas apolares o de escasa polaridad como materia orgánica. Por otro lado, Bailey et al. (1968) y Bailey y White. (1970) encontraron una relación directa entre la solubilidad en agua y la adsorción de s-triazinas y ureas sustituidas a Namontmorillonita, aunque no observaron el mismo comportamiento en el caso de anilinas, fenilcarbamatos, anilida y amidas. Para una familia de plaguicidas, muchos factores pueden interactuar para determinar si existe o no una relación directa entre adsorción y solubilidad, éstos pueden incluir propiedades tales como la acidez de la superficie y la polaridad.

Composición coloidal del suelo

De los distintos componentes del suelo, los minerales de la arcilla, los óxihidróxidos metálicos y la materia orgánica (componentes coloidales del suelo) aportan gran parte de la superficie involucrada en los procesos de adsorción. La importancia relativa de cada uno de estos componentes depende en gran medida de las características

de carga del compuesto a adsorber. Por su elevada superficie específica y reactividad superficial, se considera a los componentes de la fracción arcilla como los principales responsables de las interacciones que tienen lugar entre la fase sólida del suelo y los compuestos orgánicos e inorgánicos que a él llegan, principalmente cuando están en disolución. Por eso es conocido también como la fracción activa del suelo y está formada por dos tipos de componentes: los componentes inorgánicos o minerales y los componentes orgánicos.

Componentes inorgánicos

La fracción coloidal inorgánica del suelo, de gran importancia en muchos procesos de adsorción de plaguicidas, está compuesta en su mayoría por filosilicatos y por óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos metálicos, fundamentalmente de Fe, Al y Si. El término “arcilla” se refiere generalmente al material inorgánico de tamaño inferior a 2 μm , mientras que “mineral de la arcilla” se refiere a un tipo específico de minerales que se encuentran en la fracción de tamaño arcilla (menor a 2 μm) de los suelos (Moore y Reynolds, 1987). Estas definiciones han sido objeto de muchas matizaciones, aunque manteniendo estos conceptos fundamentales (Guggenheim y Martin., 1995).

Los minerales de la arcilla están constituidos por láminas de unidades estructurales sobrepuestas, constituyendo una red regular en la que figuran las dos unidades siguientes: octaedros, constituidos por un ión metálico (Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) en el centro y en los vértices por iones O^{2-} ó OH^- y tetraedros formados por un ión Si^{4+} que ocupa el centro y los vértices ocupados por iones O^{2-} o excepcionalmente OH^- en ambos casos. Estas unidades se repiten formando unas capas octaédricas o tetraédricas, respectivamente. Las unidades estructurales (láminas) están en general formadas por la conexión de dos o tres capas (una o dos tetraédricas, respectivamente, y una octaédrica). La estructura global de los minerales resulta del apilamiento de láminas tridimensionales, existiendo entre ellas lo que se define como el espacio interlaminar, que contribuye a la elevada superficie específica de estos minerales.

Entre dos láminas adyacentes pueden intervenir fuerzas de van der Waals o fuerzas electrostáticas. En diversos minerales de la arcilla, la estructura está desequilibrada electrostáticamente como resultado de la sustitución de iones durante la formación de los minerales, sin alterar sus dimensiones. Estas alteraciones son denominadas sustituciones isomórficas. En el caso de la sustitución del ión Si^{4+} por el ión

Al^{3+} y del Al^{3+} por Fe^{2+} o Mg^{2+} , se origina un exceso de cargas negativas permanente. Este desequilibrio queda compensado por cationes, hidratados o no. Cuando en la disolución del suelo existen otros cationes, ocurren sustituciones de los que existen en la fase interlaminar, por los que permanecen en la solución hasta alcanzar un equilibrio, propiedad que se denomina: capacidad de cambio catiónico (CCC).

Las arcillas montmorillonita y vermiculita presentan alta superficie específica y CCC, y por ello su capacidad de adsorción de compuestos orgánicos es mayor que en el caso de otros minerales de la arcilla no expansibles (Cox et al., 1993; Hermosín et al., 1993). Según Green. (1974), el grado en que estas superficies adsorben moléculas orgánicas depende principalmente de la naturaleza de los cationes de cambio, del grado de hidratación de la arcilla y de las propiedades de la molécula orgánica en cuestión.

La adsorción de plaguicidas a los minerales de la arcilla puede ocurrir fundamentalmente en los cationes de cambio (bien por una interacción directa o por medio de moléculas de agua coordinadas a los cationes de cambio) o por interacción con los grupos -OH basales de la arcilla caolinita y los de los bordes de las láminas de los silicatos (Calvet, 1989). Laird. (1996) y Celis et al. (1997), pusieron de manifiesto la existencia de microespacios hidrófobos situados entre las cargas de los espacios interlaminares que pueden adsorber moléculas orgánicas neutras por simple interacción hidrofóbica. También en este espacio interlaminar, los plaguicidas se pueden adsorber por interacción donador-aceptor de electrones (Hederlain y Schwarzernebech., 1993).

Los óxidos metálicos coloidales que incluyen hidróxidos, oxihidróxidos y óxidos propiamente dichos son componentes muy importantes de la arcilla, siendo los de aluminio, silicio y sobre todo los de hierro, especialmente abundantes (Schwertmann y Taylor, 1989). En estos minerales los centros activos de adsorción son los hidroxilos superficiales que, según el pH del medio en que se encuentren, se pueden comportar como aceptores o donadores de electrones, es decir, presentan cargas dependientes del pH (Hingston et al., 1972). En suspensión acuosa, los átomos metálicos terminales del óxido completan su esfera de coordinación con grupos hidroxilos y moléculas de agua que adsorben H^+ ó OH^- dependiendo del pH de la disolución. El pH al cual las cantidades adsorbidas de H^+ y OH^- son la misma se denomina punto cero de carga del óxido. Los óxidos y oxihidróxidos poseen una elevada superficie específica, lo que significa que pueden ser buenos adsorbentes de compuestos orgánicos, fundamentalmente aniónicos

(Madrid y Díaz Barrientos, 1991; Hermosín y Cornejo, 1991; Celis et al., 1999; Dubus et al., 2001).

En general los compuestos orgánicos de baja polaridad no son capaces de competir con las moléculas de agua que solvatan las superficies hidrofóbicas de los coloides minerales por posibles sitios de adsorción. Además, la concentración del compuesto orgánico en la disolución del suelo suele ser demasiado baja para competir eficazmente con las moléculas de agua por los sitios de adsorción (Calvet, 1989). Por ello, frecuentemente se considera que los coloides minerales tienen un papel secundario en la adsorción de plaguicidas no iónicos salvo en el caso de suelos de muy bajo contenido en carbono orgánico. Para estos compuestos muy hidrofóbicos y en suelos con un contenido en materia orgánica superior al 2%, la adsorción ocurre fundamentalmente debido a la acción de ésta (Senesi, 1992; Schulten et al., 2001; Nemeth-Konda et al., 2002).

Muchos autores han puesto de manifiesto las limitaciones de considerar a la materia orgánica como la única responsable de la adsorción en el caso de compuestos polares (Weber et al., 1986; Reddy y Gambrell, 1987; Calvet, 1989; Hermosín y Cornejo, 1991; Cox et al., 1995, 1996; Wauchope et al., 2002; Fernandes et al., 2003). En muchos casos se ha encontrado una mayor correlación entre la adsorción y el contenido de arcilla de los suelos que con el de materia orgánica (Hermosín y Cornejo, 1991; Cox et al., 1993, 1994; Aguer et al., 2000; Hermosín et al., 2000). En estos casos el compuesto orgánico considerado presentaba siempre características polares, iónicas o ionizables. Para estas condiciones Hermosín y Cornejo. (1994) proponen el uso de un coeficiente de adsorción normalizado al contenido de arcilla, K_{clay} , similar al coeficiente de adsorción normalizado al contenido de carbono orgánico, (K_{oc}) que resalta la importancia de los coloides minerales en la adsorción y reduce la variabilidad en la adsorción.

Componentes orgánicos

La fracción orgánica del suelo es el principal componente del suelo implicado en los procesos de adsorción de muchos compuestos hidrofóbicos.

Aunque la fracción orgánica en el suelo está compuesta por organismos vivos y los restos de éstos sin descomponer, parcialmente descompuestos y completamente mineralizados, el término de materia orgánica en el suelo es usado para referirse más específicamente a los componentes no vivos, que constituyen la mezcla heterogénea

compuesta de un gran número de productos resultantes de las transformaciones químicas y microbianas de desechos orgánicos de animales y vegetales.

La fracción orgánica de los suelos ha adquirido durante las últimas décadas, gran importancia en la dinámica de plaguicidas en los suelos (Cox et al., 2004; Barriuso et al., 2011; Schnitzer y Monreal, 2011; Pignatello, 2012). A grandes rasgos, los componentes orgánicos del suelo se pueden dividir en **sustancias no húmicas** y **sustancias húmicas**.

Sustancias no húmicas

Son compuestos pertenecientes al grupo de los polisacáridos, polipéptidos, ácidos grasos y otros compuestos de bajo peso molecular procedentes de restos animales y vegetales y para los que es posible asignar una fórmula molecular precisa de las subunidades que los componen. Son, en general, fácilmente atacados o degradados por los microorganismos, lo que hace que el tiempo de vida media de estas sustancias en el suelo sea relativamente corto (Khan, 1980).

Sustancias húmicas

Grupo de compuestos orgánicos que se forma a partir de las sustancias no húmicas a través de procesos de biodegradación y de síntesis. Son mucho más estables, por lo que constituyen el grueso de la materia orgánica de la mayoría de los suelos (Khan, 1980).

Las sustancias húmicas se caracterizan por tener una estructura química compleja y amorfa, carácter ácido, color oscuro y elevado peso molecular (Aiken et al., 1985). Se considera que están formadas por un esqueleto fundamentalmente aromático, a base de heterociclos nitrogenados, quinonas, fenoles y ácidos benzoicos, con cadenas alifáticas laterales. Más que polímeros tridimensionales, las sustancias húmicas son predominantemente lineales con puentes de unión entre diferentes puntos de los tramos lineales (Oades, 1989).

Según su solubilidad las sustancias húmicas se dividen en tres grupos (Aiken et al., 1985): *huminas*, fracción de las sustancias húmicas que es insoluble en agua a cualquier pH, *ácidos húmicos*, fracción insoluble en ácido, pero soluble a pH más elevados y *ácidos fúlvicos*, solubles a cualquier pH de disolución.

Estructuralmente los ácidos húmicos y los ácidos fúlvicos son muy similares, diferenciándose sólo en el peso molecular y en el contenido en grupos funcionales. Las huminas pueden consistir, según Stevenson. (1985), en: ácidos húmicos íntimamente

ligados a la fracción mineral de la que no pueden ser separados y materia húmica altamente condensada con un contenido elevado en carbono (>60%) y por este motivo, insoluble en álcalis.

Los grupos funcionales presentes en las sustancias húmicas son muy numerosos y variados. Incluyen grupos carboxilos, carbonilos, hidroxilos, sulfidrilos, aminos, sulfónicos, etc. Los grupos carboxilos e hidroxilos son los principales responsables de su elevada CCC, dependiente del pH, así como de su capacidad para acomplejar metales e interactuar con los minerales de la arcilla (Theng, 1974; Cornejo y Hermosín, 1996).

Por su naturaleza aromática y contenido en grupos funcionales polares, las sustancias húmicas poseen un doble carácter hidrófobo e hidrófilo. Así, las estructuras lineales pueden adoptar en disolución acuosa una conformación esférica de forma que las regiones hidrófobas quedan hacia el interior mientras que la mayoría de los grupos polares quedan próximos a la periferia (Wershaw, 1986; Oades, 1989). Los grupos periféricos polares son los responsables del hinchamiento de las sustancias húmicas en disolución acuosa, donde pueden llegar a adsorber de 2 a 6 veces su propio peso de agua (Ahlrichs, 1972). Existen, no obstante, grupos internos responsables de una cierta capacidad de cambio iónico que ocurre lentamente en comparación con los grupos periféricos (Oades, 1989).

Los compuestos orgánicos apolares interactúan fundamentalmente con las regiones hidrofóbicas de la materia orgánica del suelo de forma que la adsorción es menor al aumentar el contenido en grupos funcionales polares (Rutherford et al., 1992). Por el contrario, las regiones hidrofílicas contribuyen a la retención de solutos polares, más aún teniendo en cuenta que la saturación en agua de la materia orgánica del suelo en disolución aumenta aún más su polaridad, y por tanto su compatibilidad con los solutos polares (Rutherford y Chiou, 1992; Negre et al., 2001).

Excepto en el caso de solutos polares o suelos con bajo contenido en materia orgánica, se considera que los coloides orgánicos del suelo juegan un papel esencial en los procesos de adsorción de sustancias hidrofóbicas sin carga. Es frecuente obtener una correlación bastante alta adsorción y el contenido de materia orgánica (Wolfe et al., 1990; Ferreira et al., 2002), lo que según Chiou et al. (1985) es una consecuencia de la alta afinidad de las moléculas de agua por las superficies minerales, quedando por tanto excluidas para la adsorción de compuestos orgánicos.

Tradicionalmente se habría sumido que la materia orgánica es el principal adsorbente de compuestos orgánicos como consecuencia del simple reparto de éstos entre la fase orgánica y acuosa, (Teoría de Partición) que da lugar a distintos tipos de adsorción lineal (Chiou, 1979; Karichoff, 1979). No obstante, investigaciones de las últimas décadas, revelan la heterogeneidad de la materia orgánica presenta su propio rol como adsorbente de compuestos orgánicos. Esta heterogeneidad, puede generar selectividad en la adsorción, como consecuencia de propiedades tales como aromaticidad, polaridad, estructura o configuración abundancia de ciertos grupos funcionales (Celis et al., 2006; Pignatello, 2012) Es por ello importante considerar que la materia orgánica puede presentar dos estados físicos: vidrioso o rígido y elástico. El primero da lugar a huecos a escala nanométrica que pueden incluso estar interconectados entre sí. Éstos han de preexistir para que la molécula orgánica se adsorba, mientras que para el segundo caso, las cavidades que se originan favorecen adsorciones más reversibles (Pignatello, 2012).

Características de la disolución del suelo

Los compuestos orgánicos se encuentran bajo los efectos de la fuerza iónica y el pH de la disolución del suelo. Numerosos trabajos han puesto de manifiesto la importancia del pH en los procesos de adsorción de plaguicidas (Hermosín y Cornejo., 1987; Li et al., 2001). El pH de la disolución del suelo determina la carga superficial de los componentes con carga variable del suelo y la ionización de los plaguicidas con propiedades ácidas o básicas.

La variación de la carga superficial de los coloides del suelo influye directamente en su capacidad de interaccionar con especies iónicas. Así, por ejemplo, la adsorción de compuestos aniónicos a óxidos metálicos aumenta al disminuir el pH como consecuencia del aumento del número de centros positivos en la superficie del óxido. La adsorción de compuestos catiónicos a sustancias húmicas disminuye con la disminución del pH debido a la protonación de los grupos $-\text{COO}^-$ y O^- del polímero orgánico. El pH también afecta a la ionización de los plaguicidas con características ácidas o básicas e influye directamente en el proceso de adsorción. El efecto del pH depende del carácter ácido o básico del compuesto así como de la carga de la superficie adsorbente. Se sabe que a valores de pH elevados, se conduce a disminuir la afinidad de compuestos orgánicos por la MO, debido al aumento en la polaridad de ésta (Real., 2010).

La fuerza iónica asume un papel relevante en los procesos de adsorción por fuerzas electrostáticas, ya que con el aumento de la fuerza iónica disminuye la adsorción debido a la competencia por los sitios de adsorción entre el soluto y los iones en solución (Watson et al., 1973). Según Calvet. (1989), en el caso de moléculas neutras se observa que un aumento de la fuerza iónica por encima de la unidad da lugar a un aumento de la adsorción, mientras que para valores por debajo de la unidad no existe una tendencia general.

Temperatura

Los procesos de adsorción son exotérmicos, mientras que los de desorción son endotérmicos (Clark, 1974), por lo que un incremento de temperatura dará lugar a una disminución de la adsorción y a un aumento de desorción. Por otra parte, la temperatura afecta a la solubilidad de los plaguicidas afectando también indirectamente a la adsorción. Según Hamaker y Thompson. (1972), el efecto de la temperatura en la adsorción depende de la fuerza de la interacción entre el soluto y la superficie, de manera que a mayor fuerza de interacción, mayor es la influencia de la temperatura.

Humedad

La importancia del contenido de humedad del suelo en la adsorción del plaguicida puede ser explicada por dos mecanismos, uno se relaciona con la solubilidad del plaguicida, ya que ésta varía con el contenido de agua (Bailey y White, 1970). El otro tiene que ver con la competencia del plaguicida por los lugares de adsorción a diferentes niveles de humedad. En condiciones de baja humedad, las moléculas de agua se encuentran muy fuertemente retenidas y esto deja pocos sitios activos libres para que el plaguicida pueda adsorberse (Navarro Blaya, 1986).

De acuerdo con Chiou y Shoup. (1985), la retención de los compuestos orgánicos por los constituyentes minerales y orgánicos depende de la humedad del suelo. En suelos secos, la adsorción de compuestos orgánicos resulta fundamentalmente de las interacciones del plaguicida con los componentes minerales, mientras que en suelos húmedos, es la materia orgánica la que tiene un papel más importante. Esto es debido a la fuerte interacción de dipolo entre la fracción mineral del suelo y las moléculas de agua, la cual excluye a los compuestos orgánicos, especialmente los pocos solubles en agua de esta fracción del suelo. Así, la solubilidad del plaguicida en el agua sería uno de los principales factores que afectan al fenómeno de adsorción (Chiou et al., 1983).

1.2.1.2.-Procesos de lixiviación. Factores que afectan a la movilidad de plaguicidas en el suelo

La lixiviación es el proceso por el cual el agua procedente de lluvia o de riego, arrastra o disuelve moléculas orgánicas dando lugar a un movimiento vertical de las mismas a lo largo del perfil del suelo. Esto incide en la efectividad biológica del plaguicida y favorece la contaminación de aguas subterráneas y acuíferos. El riesgo de esto último depende fundamentalmente de la velocidad de transporte y de su retención y degradación a lo largo del perfil del suelo, ya que se disminuye el riesgo de contaminación de las aguas subterráneas (Bowman, 1989).

La movilidad de los plaguicidas se ve afectada principalmente por factores como las propiedades físico-químicas del plaguicida, la adsorción por los coloides del suelo, las propiedades físicas, químicas, microbiológicas y estructurales del suelo, la climatología, la forma y momento de aplicación y las prácticas culturales.

Propiedades físico-químicas del plaguicida

La mayor o menor lixiviación de los plaguicidas se ve afectada por la retención del mismo en el suelo, determinada, como se ha dicho anteriormente entre otros factores, por las características físico-químicas de los plaguicidas. Características como la ionizabilidad, solubilidad en agua, presión de vapor y carácter hidrofóbico modifican el grado de retención del plaguicida por las partículas del suelo (Weber et al., 1980). Por esta razón, mientras mayor sea la adsorción menor será el riesgo de lavado, aunque si el lavado es continuo, el plaguicida puede desorberse y así aumentar la concentración de plaguicida en el lixiviado.

Los herbicidas catiónicos, como es el caso del paraquat y el diquat, son poco móviles, debido a los fuertes enlaces iónicos que forman con el complejo de cambio catiónico de los coloides del suelo. Herbicidas con propiedades básicas como las s-triazinas, presentan una movilidad de baja a moderada, dependiente del pH de los suelos: teniendo en cuenta que existe una relación inversa entre el pH y la adsorción, la movilidad será mayor bajo condiciones neutras o alcalinas que en condiciones ácidas. En cambio, los herbicidas ácidos, como es el caso del picloram, dicamba, 2,4-D, bentazona o MCPA, son muy móviles debido a su baja adsorptividad. Los herbicidas no iónicos, poco solubles en agua, como la trifluralina, son muy poco móviles en disolución, debido a su baja

solubilidad (Calderón et al., 1999). Los herbicidas muy solubles, como la hexazinona y el fenurón (Bouchard y Lavi, 1985) son muy móviles por su baja adsorptividad.

Adsorción por los coloides del suelo

La lixiviación de plaguicidas es un proceso que se ve afectado directamente por la adsorción al coloide del suelo, manteniendo una relación inversamente proporcional a ello, como se ha mencionado en párrafos anteriores (Beck et al., 1993). Los herbicidas muy solubles, como la hexazinona y el fenurón (Bouchard y Lavi, 1985) son muy móviles por su baja adsorptividad. Sin embargo, se ha visto que en ocasiones una alta adsorción puede llevar acompañada lixiviación. Estos son los casos en los que los plaguicidas se ven transportados al moverse las partículas a las que se encuentran adsorbidos (transporte facilitado) (Roy y Dzombak, 1997; Graber et al., 2001; McGechan y Lewis, 2002). Esto es frecuente en herbicidas de baja solubilidad que se adsorben a partículas orgánicas del suelo que se mueven a lo largo del perfil (González-Pradas et al., 1998; Nelson et al., 1998; Cox et al., 2000a, b; Graber et al., 2001). Los coloides minerales y la materia orgánica son los principales componentes del suelo responsables de los procesos de adsorción. En los horizontes más superficiales, la materia orgánica es, en general, el factor determinante de la adsorción, impidiendo o reduciendo los procesos de lixiviación (Bouchard y Lavi, 1985), mientras que al aumentar la profundidad, son la fracción mineral, las arcillas y los óxidos metálicos, los responsables de los procesos de adsorción-desorción (Beck et al., 1993). También hay que mencionar que la desorción de los plaguicidas vuelve a disponer en solución los plaguicidas previamente sorbidos, disponibles para lixiviar (Worrall et al., 1999).

Estructura del suelo

El suelo como compartimento heterogéneo está compuesto por partículas de distinto tamaño y naturaleza, construyendo un complejo sistema de poros. De éstos, los de mayor tamaño (llamados macroporos) son los conductos construidos por animales, canales de raíces, roturas y fisuras que se forman por el efecto del agua o por expansión y contracción del suelo, congelamiento y deshielo y conductos formados por la acción erosiva del agua, y que pueden existir a profundidades considerables del perfil del suelo. El movimiento de plaguicidas en el suelo se ve influenciado por la presencia de esos macroporos, originando flujos preferenciales (Beven y Germann, 1981, Larsson et al., 1999). En este caso, el transporte de los compuestos orgánicos se denomina

hidrodinámico, mientras que si el movimiento del plaguicida ocurre a través de la masa del suelo, predominan los procesos de difusión. Los poros de menor tamaño son los mesoporos y microporos, donde el movimiento vertical de los plaguicidas en el suelo ocurre lentamente predominando los procesos de difusión, adsorción y degradación.

Intensidad y frecuencia de lluvia y/o riego

El aporte de agua al suelo, ya sea procedente de lluvia o de agua de riego, es un factor de gran importancia en lo que se refiere a la persistencia y lixiviación de plaguicidas en suelos. La intensidad, frecuencia, distribución y estacionalidad del agua aplicada afectan enormemente al movimiento y distribución de los plaguicidas en el suelo. La retención de plaguicidas en el suelo aumenta progresivamente con el tiempo tras su aplicación (Pignatello et al., 1993), por tanto las lluvias al comienzo de la aplicación tendrán gran influencia en la cantidad de herbicida lavado (Wauchope, 1978) y, consecuentemente, en la contaminación de aguas.

Prácticas culturales

Las prácticas culturales tienen un efecto directo en la lixiviación de plaguicidas, creando o destruyendo rutas preferenciales de transporte, y modificando la estructura, naturaleza y actividad microbiana del suelo.

Una práctica cultural que tiene una gran influencia en la lixiviación es el tipo de laboreo. Ciertos estudios han determinado que el laboreo convencional tiende a destruir los canales y macroporos conectados (Ehlers, 1975). Por otra parte, la utilización de un mínimo laboreo aumenta la microfauna y microflora del suelo, con lo que puede favorecer la biodegradación y, consecuentemente, una disminución en el riesgo de contaminación al reducirse la cantidad de plaguicida presente en la solución del suelo (Cox et al., 1996, 1999; Calderón et al., 1999). También se ha encontrado que bajo laboreo de conservación la materia orgánica en los primeros milímetros del suelo es mayor que en suelos sometidos a laboreo convencional (Calderón et al., 1999), por lo que la adsorción se puede ver favorecida y la lixiviación reducida.

La adición de enmiendas orgánicas al suelo de cultivo como práctica cultural aumenta el contenido en materia orgánica del mismo, alterando su estructura y actividad microbiana. Por una parte, el aumento en materia orgánica tras la enmienda podría llevar a un aumento de adsorción de plaguicidas y/o a una mayor degradación dando lugar a menores pérdidas por lixiviación (Guo et al., 1993; Cox et al., 2000a). Por otra parte, el

cambio en la estructura del suelo puede dificultar o por el contrario favorecer el movimiento del plaguicida (Sánchez-Camazano et al., 1996; Cox et al., 1997). También puede haber un transporte facilitado del plaguicida cuando está adsorbido a la materia orgánica en solución en el caso de enmiendas con alto contenido en materia orgánica soluble (Cox et al., 2000a; Worrall et al., 2001; Williams et al., 2002). Worrall et al. (2001), al estudiar el efecto de la adición de enmiendas orgánicas en el comportamiento en suelo de carbofurano, encontraron que los fenómenos de histéresis desempeñan un papel más relevante que el de los coloides orgánicos en suelo, en lo que al control de pérdidas de plaguicidas por lixiviación a corto plazo se refiere.

1.2.1.3.-Volatilización

La volatilización es el proceso físico-químico por el cual un compuesto es transferido a la fase gaseosa. Puede resultar de la evaporación de la fase líquida, sublimación de la fase sólida o desorción de la matriz del suelo (Bedos et al., 2002). Los factores que influyen en la volatilización son: propiedades físico-químicas del plaguicida, las características del suelo, las condiciones climáticas (sobre todo la temperatura y humedad) y las prácticas de cultivo (Bedos et al., 2002). Este proceso se da principalmente en los primeros centímetros de la superficie del suelo, aunque también se da en la superficie de plantas y durante la presencia del plaguicida en la disolución del suelo (Thomas, 1982).

1.2.1.4.-Escorrentía

El proceso de escorrentía tiene lugar cuando las precipitaciones o el riego sobrepasan la tasa de infiltración de agua en el suelo. Según Wauchope. (1978), las pérdidas de plaguicidas por escorrentía tienen lugar en disolución en el caso de plaguicidas relativamente solubles en agua (plaguicidas con solubilidades mayores de 2 mg l^{-1}), o con el plaguicida adsorbido a los coloides del suelo, para plaguicidas con solubilidades inferiores a 2 mg l^{-1} . Los factores más importantes que determinan estas pérdidas por escorrentía son las condiciones climáticas, las características del suelo, del plaguicida y prácticas culturales. El proceso de arrastre que constituye la escorrentía y la

lixiviación están relacionados, ya que el movimiento lateral de los plaguicidas hacia aguas superficiales, no contribuirán al movimiento a través del perfil de suelo o lixiviación.

1.2.1.5.-Absorción y exudación por plantas y organismos

Las plantas y microorganismos del suelo asimilan plaguicidas, acumulándolos y metabolizándolos. Gran variedad de plantas y organismos resistentes a determinados plaguicidas han desarrollado esta capacidad gracias a que los metabolizan a compuestos menos tóxicos o carentes de toxicidad, constituyendo una vía natural de descomposición (Schmidt y Fedtke, 1977). Este proceso de absorción que ocurre por el sistema radical cuando el plaguicida se encuentra en disolución del suelo, está determinado en gran medida por el grado de retención del plaguicida por los coloides del suelo, ya que esto determina la cantidad de plaguicida en la solución del suelo.

1.2.2.-Procesos de transformación

Continuando con la descripción de los procesos implicados en la dinámica de plaguicidas en suelo, pasamos a describir los denominados de transformación. La desaparición de los plaguicidas en el suelo ocurre por procesos que conducen a su transformación en otros productos generalmente, aunque no siempre, de menor toxicidad (Cheng y Lehman, 1985) y que, por tanto, reducen la contaminación de aguas superficiales y subterráneas.

Los procesos de degradación se suelen dividir, según su naturaleza, en tres grupos: *degradación química*, mediada por gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos, *degradación microbiana o biodegradación*, catalizada exclusivamente por enzimas y los procesos de *fotodegradación*. Los factores que de forma general, afectan a estos procesos son: la estabilidad química de la molécula, la adsorción a componentes del suelo, el efecto del plaguicida en cuestión sobre la microflora del suelo, factores ambientales como la humedad del suelo, la radiación solar y temperatura y las propiedades físico-químicas de los suelos.

I.2.2.1.-Degradación química

Los procesos de degradación química más frecuentes son las reacciones de hidrólisis, sustitución y las reacciones redox, que pueden ocurrir tanto en disolución como ser catalizadas en mayor o menor grado por la superficie de las arcillas, óxidos metálicos, iones metálicos, superficies de sustancias húmicas y materiales orgánicos diversos (Cornejo et al., 1983). Entre los factores más importantes que afectan a los procesos de degradación química se encuentran el pH, el potencial redox, la temperatura y la composición de la disolución y de la fracción coloidal del suelo. La adsorción del plaguicida a los coloides del suelo puede tener un doble efecto, ya que puede proteger al mismo de la degradación química, pero también puede potenciarla, como en el caso de reacciones catalizadas por la superficie de los componentes coloidales.

Los cationes de cambio de los minerales de la arcilla y el agua de hidratación participan en muchas reacciones de degradación catalizadas por la superficie (Russell et al., 1968; Laird, 1996). Así, por ejemplo, se ha visto que la elevada acidez superficial de minerales de arcilla (como las esmectitas), originados por la elevada polarización del agua de hidratación de los cationes de cambio, favorece la degradación química de herbicidas como atrazina y simazina a los hidroxiderivados correspondientes (Laird, 1996; Celis et al., 1997).

I.2.2.2.-Biodegradación

Los procesos de biodegradación de plaguicidas se deben fundamentalmente a la microflora del suelo (bacterias y hongos) y generalmente se ven favorecidos a mayor temperatura y humedad, condiciones en las que aumenta la población microbiana (Yen et al., 2003). Las transformaciones que pueden ocurrir por parte de los microorganismos son diversas. Los microorganismos asimilan estos compuestos y los degradan hasta productos finales sencillos como CO_2 , H_2O y NH_4^+ (mineralización), o bien pueden llegar a producir sustancias de complejidad intermedia entre la original y la más sencilla. Estas formas en ocasiones son menos tóxicas y persistentes. Estos procesos afectan significativamente a las propiedades químicas o toxicológicas del compuesto, generando productos que pueden ser utilizados como sustrato por otros organismos y no como sustrato de crecimiento directo. Esto es lo que se llama cometabolismo, y es frecuente entre las distintas poblaciones microbianas del suelo.

La cinética de biodegradación de un plaguicida es importante porque dicta la disponibilidad del mismo en el sistema suelo. En el caso de los plaguicidas que no se usan como sustrato de crecimiento directo, se asume que su biodegradación describe una cinética de primer orden o pseudo-primer orden, donde la tasa de degradación depende tanto de la concentración de plaguicida, como de la densidad de microorganismos degradadores del mismo. Sin embargo, debido a las dificultades que entrañan contabilizar estos individuos, se usan las constantes de primer orden o la vida media. Los plaguicidas con una vida media inferior a 10 días, se consideran poco persistentes; mientras que los que superan los 100 días, se consideran relativamente persistentes (Kearney et al., 1997).

En caso de los plaguicidas que sí constituyen sustrato de crecimiento directo, es frecuente observar curvas sigmoidales de biodegradación. En este caso, la dificultad de interpretar los resultados es mayor que el caso anterior, debido a su no linealidad.

Las curvas de biodegradación tienden a ser específicas debido a las diferentes maneras de degradación de los plaguicidas, a la biodisponibilidad del mismo, y a parámetros como temperatura, humedad y pH del suelo. Muchos estudios indican que el plaguicida adsorbido a las partículas del suelo no está inmediatamente disponible para biodegradación (Ogram et al., 1985; Koskinen et al., 2001), sin embargo, recientemente algunos autores han sugerido que las bacterias pueden acceder a regiones específicas donde el plaguicida se encuentra adsorbido (Park et al., 2001; Singh et al., 2003; Hermosín et al., 2006). Bajo condiciones límite, existe una correlación positiva entre la curva del metabolismo y la temperatura del suelo, la humedad y el pH, aunque existe una excepción, como ocurre en las reacciones oxidativas, que son menos probables que ocurran en la fase acuosa del suelo, debido a la baja difusión de oxígeno, mientras que las transformaciones catalizadas por hongos son más frecuentes a bajo pH y/o en suelos húmedos (Kearney et al., 1997).

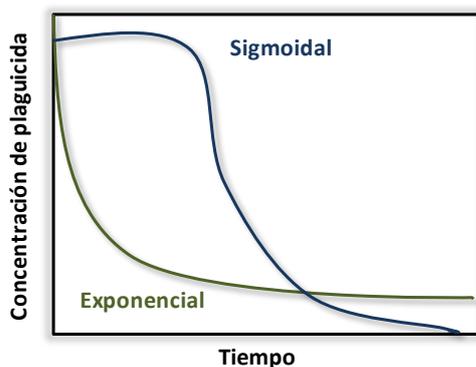


Figura I.4. Cinéticas de biodegradación de plaguicidas

La tasa de biodegradación está muy influenciada por el grado de adsorción del herbicida. La adsorción reduce la biodegradación en general, ya que las moléculas adsorbidas no suelen estar disponibles para los microorganismos. El efecto de la materia orgánica de los suelos en los procesos de biodegradación puede ser doble. Por una parte, al adsorber el plaguicida reduce la biodegradación (Barriuso et al., 1997; Guo et al., 2000). Por otra parte, la materia orgánica puede ser un sustrato nutritivo para la microflora, dando lugar a un aumento de la población microbiana y por tanto a una mayor tasa de degradación de plaguicidas biodegradables (Nair y Schnoor, 1994; Cox et al., 1999).

1.2.2.3.-Fotodegradación

La fotodegradación consiste en la transformación del plaguicida como consecuencia de la energía de la luz solar (Horspool, 1970). Esta reacción es importante en los primeros milímetros del suelo, en la superficie de las plantas y en ecosistemas acuáticos, donde los plaguicidas pueden ser transportados en disolución o bien adsorbidos a la materia particulada. A medida que el plaguicida penetra en el suelo, los procesos de fotodegradación son menos frecuentes, debido a que la radiación solar puede llegar a atenuarse hasta un 90% en los primeros 0.2 mm del suelo.

Según Burrows et al. (2003) la fotodegradación de plaguicidas se puede dar por cuatro procesos: fotodegradación o fotólisis directa, por fotosensibilización, degradación fotocatalizada y degradación por reacción con radicales hidroxilos.

El proceso de fotodescomposición depende de factores como la intensidad y el tiempo de exposición del plaguicida a la radiación solar, la presencia de catalizadores fotoquímicos, que pueden favorecer la descomposición, el pH del suelo, el grado de

aireación del suelo, el estado en el que se encuentra el plaguicida (sólido, en disolución, vapor, etc) el grado de adsorción y la estructura química del plaguicida.

La fotodegradación puede ser directa, cuando el plaguicida se degrada por la acción directa de la radiación solar, o indirecta, cuando la energía de la radiación solar es absorbida por otros compuestos que luego transmiten esa energía a la molécula del plaguicida o bien dan lugar a especies reactivas intermedias que pueden entrar en reacción con el plaguicida (Mansour et al., 1989).

I.3.-Importancia de la adición de enmiendas orgánicas al suelo. El alperujo como enmendante

En Andalucía la pobreza en materia orgánica característica de los suelos ha potenciado el efecto dispersante que sufren los plaguicidas y los residuos de éstos una vez que son incorporados a los cultivos. Una de las más eficaces maneras hasta ahora, de evitar pérdidas de plaguicidas por escorrentía o por lixiviación es incorporar al suelo **enmiendas orgánicas**. Se ha visto que en suelos con gran contenido en materia orgánica estas pérdidas son menores que en suelos con bajo contenido en materia orgánica, ya que se aumenta la retención del plaguicida a las partículas del suelo (Fernandes et al., 2006; Cabrera et al., 2009; Cañero et al., 2012).

Han sido muchos los tipos de enmiendas orgánicas que se han usado y que se están estudiando en la actualidad. Los primeros estudios sobre el efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas al comportamiento de plaguicidas se remontan a finales de los años 80 (Azam et al., 1988). Las enmiendas orgánicas aplicadas al suelo pueden ser muy variadas y entre las estudiadas que afectan al comportamiento de plaguicidas en suelo se encuentran: los compost de residuos sólidos urbanos (Cox et al., 2001) lodos de depuradora (Celis et al., 1998a, b) restos de paja (Houot et al., 1998), residuos de la industria vinícola (Andrades et al., 2004), bioproductos de la fermentación de maíz, serrín, compost de residuos de jardines municipales, abono de ganado madurado (Moorman et al., 2001), turba (González-Pradas et al., 1998; Socías-Vicián et al., 1999; Flores-Céspedes et al., 2002; Si et al., 2006), restos de madera (Menasserri et al., 2004), residuos líquidos de almazara (Cox et al., 1997, 2001; Fernandes et al., 2006) y recientemente se han publicado trabajos sobre el uso de residuos sólidos de almazara (alperujo y orujo) utilizados como

enmiendas orgánicas en suelos (Albarrán et al., 2003, 2004; Fernandes et al., 2006; Delgado-Moreno y Peña, 2007; Delgado-Moreno et al., 2007; Cabrera et al., 2007, 2008 y 2009; Cañero et al., 2010, 2012). El estudio que se presenta en esta Memoria se centra en esta última clase de residuos orgánicos.

En cuanto a los aspectos positivos de la adición de estas enmiendas, se encuentra la incorporación de materia orgánica exógena a los suelos y con ello incremento del carbono orgánico, que como se ha mencionado antes, resulta muy beneficioso en la región Mediterránea, donde la mayoría de los suelos, entre ellos los agrícolas, se caracterizan por tener un bajo contenido en la misma (en torno al 1% de carbono orgánico, frente un 4% en suelos no cultivados) (Hontoria et al., 2004; Cucci et al., 2008). Entre otras ventajas, se encuentra la mejora de la estructura del suelo, disponibilidad de nutrientes, actividad biológica y fertilidad, ayudando a la restauración de suelos degradados (Melero et al., 2007; Badalucco et al., 2010). Piotrowska et al. (2006) estudiaron el efecto a corto plazo de la aplicación de dos dosis diferentes de un residuo de la extracción de aceite de oliva por el proceso de tres fases (alpechín), sobre las propiedades físico-químicas de un suelo y observaron incremento del C orgánico total, cantidad de N y C extraíble, P disponible y del contenido en Fe y Mg extraíbles. La aplicación de estos productos en suelo para remediar el déficit en materia orgánica, supone además una práctica ecológica sostenible reconocida (Rodríguez-Lucena et al., 2010).

En lo que respecta a su efecto en el comportamiento en suelos de plaguicidas, el uso de enmiendas orgánicas no siempre es garantía del control y reducción de la pérdida por lixiviación de estos compuestos, especialmente de aquellos muy solubles en agua (Worrall et al., 2001). Celis et al. (1998b) observaron en este caso una disminución de la adsorción de atrazina en suelos enmendados con lodos de depuradora, sugiriendo que debido al pequeño peso molecular de la materia orgánica soluble, ésta podría competir con las moléculas de atrazina por los sitios de adsorción en la superficie del suelo. Del mismo modo, Fernandes et al. (2006), no observaron ningún aumento en la adsorción del fungicida metalaxil en suelos enmendados con alperujo respecto al suelo sin enmendar, y lo atribuyeron a las moléculas de bajo peso molecular y no humificadas de la fracción soluble del alperujo que se adsorbían a los componentes minerales de la fracción arcilla del suelo y competían con el fungicida por los sitios de adsorción, lo cual se traducían en

una mayor lixiviación. Resultados similares fueron observados por Cox et al. (2007) en la adsorción del herbicida diurón en un suelo arcilloso enmendado con alperujo.

Por otro lado, se ha considerado la aplicación de enmiendas orgánicas para aumentar la biodegradación de herbicidas en suelos contaminados. Moorman et al. (2001) estudiaron el efecto de una serie de enmiendas sobre la mineralización de herbicidas y vieron un aumento en la mineralización de atrazina en presencia de turba, tallos de maíz y estiércol en suelos. Esto muestra el doble papel que ejerce de la materia orgánica que aportaba la enmienda al suelo sobre la degradación de los plaguicidas: por un lado aumentando su persistencia en suelo al potenciar su adsorción, y por otro, favoreciendo su degradación al aumentar la actividad biológica del suelo.

Como se ha dicho en párrafos anteriores, durante los últimos años se está centrando la investigación en el uso de residuos sólidos procedentes de almazara, como es el **alperujo** para enmendar suelos. Cabe destacar también el uso de otro residuo procedente de almazara como es el orujo, sin bien, su aplicación hoy en día como enmienda es menos frecuente que la del primero, ya que su obtención se basa en el sistema de centrifugación en tres fases, cada vez más en desuso en el área mediterránea (Roig et al., 2006).

En la actualidad, el hábitat del olivo se encuentra entre las latitudes 30º y 45º, tanto en el Hemisferio Norte como en el Sur, en regiones climáticas del tipo del Mediterráneo caracterizadas por veranos muy secos y calurosos. El patrimonio oleícola existente se estima en aproximadamente 960 millones de olivos, de los que unos 945 millones (98% del total) se sitúan en los países de la cuenca mediterránea, ocupando 9.5 millones de hectáreas. La importancia del cultivo del olivar desde el punto de vista de la producción agraria, es incuestionable. La ventas de aceite de oliva y aceituna de mesa representan en torno al 30% de la producción final agraria y un 3% PIB total de Andalucía. (Guzmán-Alvárez et al., 2009). Estas altas ventas suponen la generación de productos de gran cantidad de desechos, con la consecuente problemática del manejo de los mismos y es que España es el mayor productor del mundo de aceite de oliva, con una producción de 1.100.000 toneladas por año durante el periodo de 2001-2007, (Base de datos del Consejo Internacional del Olivo, 2008) generando enormes cantidades de restos orgánicos en el proceso.

La tecnología de extracción de aceite de oliva ha sufrido modificaciones a lo largo del tiempo, impulsando notablemente la producción de aceite a partir de los años 70, especialmente en España, con la introducción del sistema continuo de **centrifugación en tres fases**, que sustituía al sistema tradicional de prensado de aceitunas (Figura I.5.). Con este nuevo proceso se obtienen dos residuos, uno sólido (orujo) y uno líquido (alpechín) y aceite de oliva. Mientras que el primero no puede considerarse residuo como tal, sino más bien un subproducto, ya que tras un segundo tratamiento puede producir aceite de orujo de oliva, las grandes cantidades de **alpechín** generadas (alrededor de 750 l por tonelada de aceituna molida) (Morillo et al., 2009), constituyen un serio problema de gestión ambiental debido a su alto contenido en materia orgánica y su fitotoxicidad (Roig et al., 2006).

La introducción en la década de los 90 de un nuevo sistema de **centrifugación en dos fases**, redujo tanto las cantidades de los residuos producidos en el proceso (hasta un 75%), como el volumen de agua usado en la extracción (Roig et al., 2006, Morillo et al., 2009). En la actualidad, este proceso ha sustituido casi al 100% al de dos fases en toda España, mientras que en otros países mediterráneos como Italia y Grecia, está teniendo lugar una incorporación más lenta (Roig et al., 2006).

La nueva tecnología de extracción de aceite de oliva consiste en un proceso de dos fases que genera una parte líquida (aceite de oliva) y una parte residual sólida, conocida por **alperujo** (Albuquerque et al., 2004, 2009). Usando este sistema, las almazaras generan aproximadamente 4.000.000 de toneladas al año de este residuo durante periodos muy cortos en el tiempo como es la cosecha de la aceituna, constituyendo su gestión y eliminación un problema técnico, financiero y medioambiental (Rodríguez-Lucena et al., 2010).

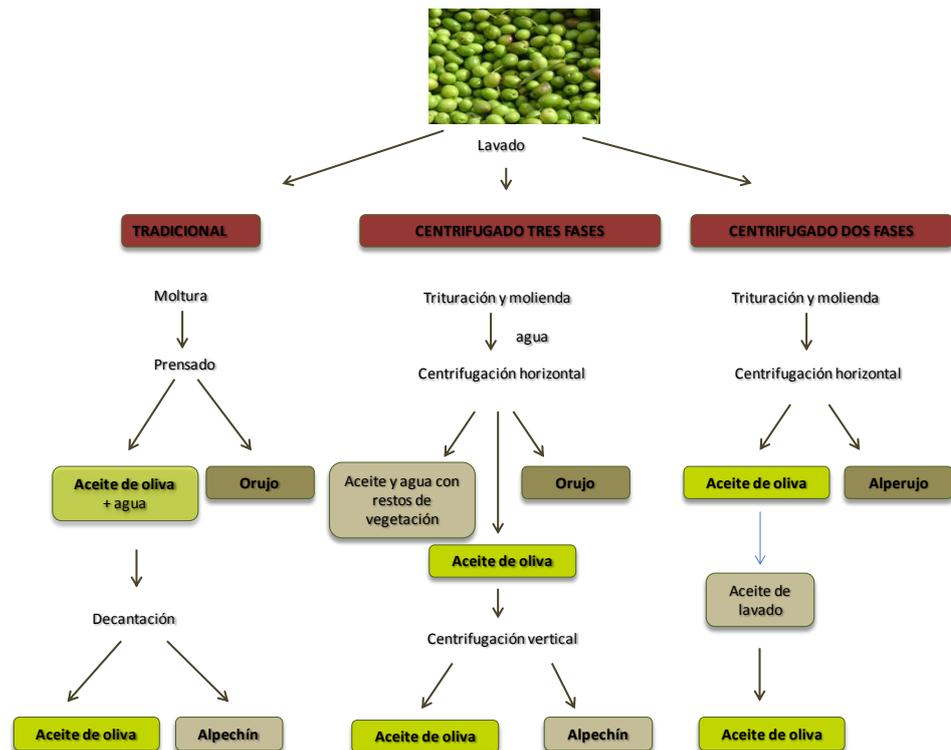


Figura I.5. Esquema de los sistemas de centrifugación tradicional, en tres fases y el actualmente más usado, de dos fases. Adaptación de *Morillo et al., 2009*.

La introducción del uso de sustancias xenobióticas, como son los plaguicidas, ha mejorado la producción del cultivo del olivar en todo el mundo durante los últimos 50 años. Antes de ser lanzados al mercado, los plaguicidas sufren rigurosas pruebas, con el objetivo de alcanzar una alta eficacia hacia su especie diana y producir mínimos daños ambientales. Sin embargo, en ocasiones la actividad del plaguicida no actúa exclusivamente sobre los organismos para los que están dirigidos y afectan directa o indirectamente a organismos no-diana, bien sean organismos animales, o vegetales, entre los que puede verse afectado el propio cultivo. Por otro lado, ocurren pérdidas de plaguicidas por escorrentía, ya que el 74% de la superficie de los olivares se encuentra en pendientes de al menos un 7% (Junta de Andalucía, 2003). Esto favorece la desestructuración del suelo y el lavado de nutrientes y como consecuencia, reduce la fertilidad en las zonas altas del cultivo y pérdida de plaguicida, dando lugar a nuevas aplicaciones, provocando en ocasiones restricciones en la capacidad de adquirir recursos por parte del cultivo y, por tanto, reducción en su productividad (Galmés et al., 2011).

I.4.-Bibliografía

- Aguer, J. P., Cox, L., Richard, C., Hermosín, M. C., Cornejo, J. Sorption and photolysis studies in soil and sediment of the herbicide Napropamide. *J. Environ. Sci. Health B*. **2000**, 35, 725-738.
- Ahlich, J.L. The soil environment. En: *Organic Chemicals in the soil Environment*. (eds. C.A.I. Gtoring y J.W. Hamarker). Vol 1 Marcel Dekker, New.
- Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., McCarthy, P. **1985**. An introduction to humic substances in soil, sediment, and water. En: *Humic substances in soil, sediment, and water*. (eds.) Wiley-Interscience, New York, pp. 1-9.
- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñeiro, A., Ortega-Calvo, J.J., Cornejo, J. Effects of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use Manage*. **2003**, 19, 150-156.
- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñeiro, A., Cornejo, J. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere*. **2004**, 54, 717-724.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Biores. Technol*. **2004**, 91, 195-200.
- Albuquerque, J.A., González, J., Tortosa, G., Cegarra, J. Evaluation of "alperujo" composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation*. **2009**, 20, 257-270.
- Andrades, M.S., Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Sánchez-Camazano, M. Effect of the addition of wine distillery wastes to vineyard soils on the adsorption and mobility of fungicides. *J. Agric. Food Chem*. **2004**, 52, 3022-3029.
- Aragón, R., García, J.L., Morell, I., Hernández, F., Turón, J., Pozo, O., Grimalt, S. Investigación de las aguas subterráneas de la Vega mediana del Segura (Murcia). *Hidrología y Recursos hidráulicos*. **2001**, 24, 363-377.
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.C., García-Río, L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst Environ*. **2008**, 123, 247-260.

- Azam, F., Fuhr, F., Mittelstaedt, W. Fate of [Carbonyl-C-14] Methabenzthiazuron in an arid region soil - Effect of organic amendment, soil disturbance and fumigation. *Plant Soil*. **1988**, 107, 149-158.
- Badalucco, L., Rao, M., Colombo, C., Palumbo, G., Laudicina, V.A., Gianfreda, L. Reversing agriculture from intensive to sustainable improves soil quality in a semiarid South Italian soil. *Biol. Fertil. Soils*. **2010**, 46, 481-489.
- Bailey, G.W., White, J.L., Rothberg, T. Adsorption of organic herbicides by montmorillonite: role of pH and chemical character of adsorbate. *Soil Sci. Soc. Amer.* **1968**, Proc. 32, 222.
- Bailey, G.W. y White, J.L. Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticides in soils. *Residue Rev.* **1970**, 32, 29-92.
- Barriuso, E., Laird, D.A., Koskinen, W.C., Dowdy, R.H. Atrazine desorption from smectites. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **1994**, 58, 1632-1638.
- Barriuso, E., Houot, S., Serra-Wittling, C. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pest. Sci.* **1997**, 49, 65-75.
- Barriuso, E., Andrades, M.S., Benoit, P., Houot, S. Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from composts: experimental data and modelling approach. *Biogeochemistry*. **2011**, 106, 117-133.
- Base de datos del Consejo Internacional del Olivo, **2008**.
- Beck, A. J., Johnston, A. E. J., Jones, K. C. Movement of nonionic organic chemicals in agricultural soils. *Crit. Reviews in Environ Sci. Techn.* **1993**, 23, 3, 219-248.
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso, E., Gabrielle, B. Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: Overview. *Agronomie*. **2002**, 22, 21-33.
- Beven, K y Germann, P. Water flow in soil macropores. A combined model. *J. Soil Sci.* **1981**, 32, 15-29.
- Bouchard, D. C. y Lavi, T. L. Hexazinone adsorption-desorption studies with soil and organic adsorbents. *J. Environ. Qual.* **1985**, 14, 181-186.
- Bowman, B. T. y Sans, W.W. Partitioning behaviour of insecticides in soil-water systems. Adsorbent concentration effects. *J. Environ. Qual.* **1985**, 14, 265-269.

- Bowman, B.T. Mobility and persistence of the herbicides atrazina, metolachlor y terbuthylazine in plainfield sand determined using field lysimeters. *Environ. Toxicol. Chem.* **1989**, 8, 485-491
- Burrows, H.D., Canle L., M., Santaballa, J.A., Steenken, S. Reaction pathway and mechanisms of photodegradation of pesticides. *J. Photochem. Photobiol. B. Biology.* **2003**, 67, 71-108.
- Cabrera, A., Cox, L., Velarde, P., Koskinen, W.C., Cornejo, J. Fate of diuron and terbuthylazine in soils amended with two-phase olive oil mill waste. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 4828-4834.
- Cabrera, A., Cox, L., Koskinen, W.C., Sadowsky, M.J. Availability of triazine herbicides in aged soils amended with olive oil mill waste. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 4112-4119.
- Cabrera, A., Cox, L., Fernández-Hernández, A., García-Ortiz Civantos, C., Cornejo, J. Field appraisalment of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2009**, 132, 260-266.
- Calderón, M. J., Hermosín, M. C., Moreno, F., Cornejo, J. Movilidad de trifluralina en laboreo tradicional y de conservación. En: *Estudios de la zona no saturada del suelo*. R. Muñoz-Carpena, A.Ritter, C. Tascón (eds.). Tenerife. **1999**, 83-88.
- Calvet, R. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Perspec.* **1989**, 83, 145-177.
- Cañero, A.I., Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Effect of soil amendment with an organic residue on S-metolachlor fate. 14th Ramiran International Conference, Lisboa, Portugal. **2010**, C7, 0086.
- Cañero, A.I., Becerra, D., Cornejo, J., Hermosín, M.C. Albarrán, A. López-Piñeiro, A., Cox, L. Transformation of organic wastes in soil: Effect on bentazone behaviour. *Sci. Tot. Environ.* **2012**, 433, 198-208.
- Carabías-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Fernandes-Laespada, M.E., Calvo-Seronero, L., Sánchez-San Román, R.J. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). **2003**, 37, 4, 928-938.
- Celis, R., Cox, L., Hermosín, M. C., Cornejo, J. Sorption of thiazufluron by iron and humic acid-coated montmorillonite. *J. Environ. Qual.* **1997**, 26, 472-479.

- Celis, R., Barriuso, E., Houot, S. Effect of liquid sewage sludge addition on atrazine sorption and desorption by soil. *Chemosphere*. **1998a**, 37, 1091-1107.
- Celis, R., Barriuso, E., Houot, S., Sorption and desorption of atrazine by sludge-amended soil: Dissolved organic matter effects. *J. Environ. Qual.* **1998b**, 27, 1348-1356.
- Celis, R., Hermosín, M. C., Cox, L., Cornejo, J. Sorption of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid by model particles simulations naturally occurring soil colloids. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 1200-1206.
- Celis, R., y Koskinen W.C. An isotopic exchange method for the characterization of their reversibility of pesticide sorption-desorption in soil. *J. Agric. Food.* **1999**, 782-790.
- Celis, R., De Jonge, H., De Jonge, L.W., Real, M., Hermosín, M.C., Cornejo, J. The role of mineral and organic components in phenanthrene and dibenzofuran sorption by soil. *Eur. J. Soil Sci.* **2006**, 308-319.
- Cheng, H. H. y Lehman, R. G. Characterization of herbicide degradation under field conditions. *Weed Sci.* **1985**, 33, 7-10.
- Chiou, C.T., Peters, Freed, V.H. A Physical concept of soil-water equilibria for nonionic organic compounds. *Science.* **1979**, 206, 831-832.
- Chiou, C.T., Porters, P.E., Shmedding, D.W. Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. *Environ. Sci. Technol.* **1983**, 17, 227-231.
- Chiou, C.T. y Shoup, T. D. Soil sorption of organic vapors and effect of humidity on sorptive mechanism and capacity. *Environ. Sci. Technol.* **1985**, 16, 4-10.
- Chiou, C.T., Shoup, T.D., Porter, P.E. Mechanistic roles of soil humus and minerals in the sorption of nonionic organic-compounds from aqueous and organic solutions. *Org. Geochem.* **1985**, 8, 9-14.
- Chiou, C.T., y Kile, D.E. Effects of polar and nonpolar groups on the solubility of organic compounds in soil organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 1139-1144.
- Clark, A. **1974**. The Chemisorptive bond: basic concepts. Academic Press, New York and London.
- Cornejo, J., Hermosín, M.C., White, J.L., Barnes, J.R., Hem, S.L. Role of ferric iron in oxidation of hydrocortisone by sepiolite and palygorskite. *Clays Clay Min.* **1983**, 31, 109-112.

- Cornejo, J. y Hermosín, M.C. **1996**. Interaction of humic substances and soil clay. En: Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. A. Piccolo (ed.), Elsevier Sci., Amsterdam.
- Cornejo J., Hermosín, M. C., Celis, R., Cox, L. **2005**. Methods to determine sorption of Pesticides and Other Organic Compounds. *En: Soil-Water-Solute process characterization. An integrated approach.* (Edits) CRC PRESS. 435-463.
- Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Adsorption of methomil by soils of Southern Spain and soil components. *Chemosphere*. **1993**, 27, 837-849.
- Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Retention of thiazafluron by surface horizons of some Spanish soils. *Fresenius Environ. Bull.* **1994**, 3, 129-134.
- Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Adsorption and desorption of the herbicide Thiazafluron as a function of soil properties. *Internat. J. Environ. Anal. Chem.* **1995**, 58, 305-314.
- Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Sorption of metamilon on soils with low organic matter content. *Chemosphere*. **1996**, 32, 1391-1400.
- Cox, L., Celis, R., Hermosín, M.C., Becker, A., Cornejo, J. Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1997**, 65, 151-161.
- Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Leaching of simazine in organic-amended soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **1999**, 30, 1697-1706.
- Cox, L., Celis, R., Hermosín, M. C., Cornejo, J. Natural soil colloids to retard simazine and 2,4-D leaching in soil. *J. Agric. Food Chem.* **2000a**, 48, 93-99.
- Cox, L., Celis, R., Hermosín, M. C., Cornejo, J., Zsolnay, A., Zeller, K. Effect of organic amendments on herbicide sorption as related to the nature of dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **2000b**, 34, 4600-4605.
- Cox, L., Cecchi, A., Celis, R., Hermosín, M.C., Koskinen, W.C., Cornejo, J. Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2001**, 65, 1688-1695.
- Cox, L., Fernandes, M.C., Zsolnay, A., Hermosín, M. C., Cornejo, J. Changes in dissolved organic carbon of soil amendment with aging: Effect on pesticide adsorption behavior. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 5635-5642.

- Cox, L., Velarde, P., Cabrera, A., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Dissolved organic carbon interactions with sorption and leaching of diuron in organic-amended soils. *Eur. J. Soil Sci.* **2007**, 58, 714-721.
- Cucci, G., Laolla, G., Caranfa, L. Improvement of soil properties by application of olive oil waste. *Agron. Sustain. Dev.* **2008**, 28, 521-526.
- Delgado-Moreno, L. y Peña, A. Organic amendments from olive cake as a strategy to modify the degradation of sulfonylurea herbicides in soil. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 6213-6218.
- Delgado-Moreno, L., Almendros, G., Peña, A. Raw or incubated olive-mill wastes and its biotransformed products as agricultural soil amendments - Effect on sorption-desorption of triazine herbicides. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 836-843.
- Dubus, I. G., Barriuso, E., Calvet, R. Sorption of weak organic acids in soils: clofencet, 2,4-D and salicylic acid. *Chemosphere.* **2001**, 45, 767-774.
- Ehlers, W. Observation on earthworm channels and infiltration on tilled and untilled loess soils. *Soil Sci.* **1975**, 119, 242-249.
- FAO, **2012**.
- Fernandes, M.C., Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Organic amendments affecting sorption, leaching and dissipation of fungicides in soils. *Pest Manag. Sci.* **2006**, 62, 1207-1215.
- Ferreira, J.A., Martín-Neto, L., Vaz, C. M. P., Regitano, J.B. Sorption interactions between imazaquin and a humic acid extracted from a typical Brazilian Oxisol. *J. Environ. Qual.* **2002**, 31, 1665-1670.
- Flores-Céspedes, F., González-Pradas, E., Fernández-Pérez, M., Villafranca-Sánchez, M. Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. *J. Environ. Qual.* **2002**, 31, 880-888.
- Fogg, P., Boxall, A.B.A., Walker, A., Jokes, A.A. Pesticides degradation in a "biobed" composting substrate. *Pest. Manag. Sci.* **2003**, 59, 527-537.
- Galmés, J., Conesa, M.A., Ochogavía, J.M., Perdomo, J.A., Francis, D.M., Ribas-Carbó, M., Savé, R., Flexas, J., Medrano, H., Cifre, J. Physiological and morphological adaptations in relation to water use efficiency in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Environ.* **2011**, 34, 2, 245-260.

- Giles, C.H., McEwan, S.N., Nakhwa, S.N. Smith, D. Studies in adsorption. Part XI. A system of clasification of solution adsorption isotherm, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface area in solids. J. Chem. Soc. **1960**, 3973-3993.
- González-Pradas, E., Villafranca-Sánchez, M., Fernández-Pérez, M., Socias-Viciano, M., Ureña-Amate, M.D. Sorption and leaching of diuron on natural and peat-amended calcareous soil from Spain. Water Res. **1998**, 32, 2814-2820.
- Graber, E.R., Dror, I., Bercovich, F.C., Rosner, M. Enhanced transport of pesticides in a field trial with treated sewage sludge. Chemosphere. **2001**, 44, 805-811.
- Gramatica, P., Guardo, A. Di. Screening of pesticides for environmental partitioning tendency. Chemosphere. **2002**, 47, 947-956.
- Green, R.E. **1974**. Pesticide-clay-water interactions. En: Pesticides in Soil and Water. W.D. Guenzi (ed.), SSSA, WI, Madison, pp. 3-33.
- Green, R. E. y Karichoff, S.W. **1990**. Sorption estimates for modeling. En "Pesticides in the Soil Envirnoment: Processes, Impacts, and Modeling" (ed. H.H. Cheng), SSSA, WI, Madison, pp. 79-101.
- Gu, B., Schmitt, J., Chen, Z., Liang, L., McCarthy, J., F. Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: Mechanisms and models. Environ. Sci. Technol. **1994**, 1, 38-46.
- Guggenheim, S., Martin, R.T. Definition of clay and clay mineral: joint report of the aipea and cms nomenclature committees. Clay Minerals. **1995**, 30, 257-259.
- Guzmán-Alvárez, J.R., Gómez, J.A., Rallo, L. **2009**. Sostenibilidad de la producción de Olivar en Andalucía (eds) Junta de Andalucía y Consejería de Agricultura y pesca.
- Guo, L., Bicki, T.J., Felsot, A.S. Hinesly, T. D. Sorption and movement of alachlor in soil modified carbo-rich wastes. J. Environ. Qual. **1993**, 22, 186-194.
- Guo, L., Jury, W.A., Wagenet, R.J., Flury, M. Dependence of pesticide degradation on sorption: nonequilibrium model and application to soil reactors. J. Contam. Hydrology. **2000**, 43, 45-62.
- Hamaker, J.W. y Thompson, J.M. **1972**. Adsorption. En *Organic Chemicals in the Soil Environment*. (eds.) C.A.I. Goring y J.W. Hamaker. Vol. I, Marcel Dekker, New York, pp. 49-143.

- Hance, R.J. The speed of attainment of sorption equilibria in some systems involving herbicides. *Weed Res.* **1967**, 7, 29-36.
- Hederlain, S. B. y Schwarzenbach, R. P. Adsorption of substituted nitrobenzenes and nitrophenols to mineral surfaces. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, 27, 316-328.
- Hermosín, M. C. y Cornejo, J. Maleic hydrazide adsorption by soil and the use of the mole fraction form of Freundlich equation. *Soil Sci.* **1987**, 144, 250-256.
- Hermosín, M. C. y Cornejo, J. Soil adsorption of 2,4-D as affected by clay mineralogy. *Toxicol. Environ. Chem.* **1991**, 31-32, 69-77.
- Hermosín, M. C., Martín, P., Cornejo, J. Adsorption mechanism of monobutylin in clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, 27, 2606-2611.
- Hermosín, M. C. y Cornejo, J. **1994**. Suggesting soil clay fraction (K_{clay}) as predictor for polar or ionic pesticide adsorption. En: Proceedings of the 5th International Workshop of Environmental Behaviour of Pesticides and Regulatory Aspects A. Copin et al. (eds.) ESS, Rixensart, Belgium, pp. 206-207.
- Hermosín, M.C., Cornejo, J., Cox, L. **2000**. Calculation and validation of K_{clay} as predictor for polar or ionic pesticide adsorption by soils. Pesticide-soil interactions: Some current research methods. J. Cornejo, P. Jamet (eds.) INRA, Paris, pp 131-139.
- Hermosín, M.C., veils, M.C., Facenda, G., Carrizosa, M.J., Ortega-Calvo, J., Cornejo. Bioavailability of the herbicide 2,4- D formulated with organoclays. *Soil Bio. Biochem.* **2006**, 38, 8, 2117-2124.
- Hermosín, M.C., Calderón, M.J., Real, M., Cornejo, J. Impact of herbicides used in olive groves in waters of Guadalquivir River basin (SW Spain). *Agric. Ecosyst. Environ.* **2013**, 164, 229-243.
- Hildegardt, A., Guillamón, M., Lacorte, S., Tauler, R., Barceló, D. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and ground water quality (North Spain) *Water Research.* **2008**, 42, 3315-3326.
- Hingston, F. J. Posner, A. M., Quirk, J.P. Anion adsorption by goethite and gibbsite. The role of the proton in determining adsorption envelopes. *J. Soil. Sci.* **1972**, 23, 177-192.
- Hontoria, C., Rodríguez-Murillo, J.C., Saa, A. Contenido de carbono orgánico en el suelo y factores de control en la España peninsular. *Edafología.* **2004**, 11, 2, 149-157.
- Horspool, W.N. **1970**. Aspects of organic photochemistry. Ed. Academic Press. Londres.

- Houot, S., Barriuso, E., Bergheaud, V. Modifications to atrazine degradation pathways in a loamy soil after addition of organic amendments. *Soil Biol. Biochem.* **1998**, 30, 2147-2157.
- Junta de Andalucía, **2003**. El olivar Andaluz, Consejería de Agricultura y Pesca.
- Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Resource. Res.* **1979**, 13, 241-248.
- Karickhoff, S.W. **1982**. Sorption kinetics of hydrophobic pollutants in natural sediments. En: *Contaminants and Sediments*, vol.2. (R.A. Baker, Ed.), Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Mich. Pp 193-205.
- Kearney, P.C., Shelton, D.R., Koskinen, W.C. **1997**. Soil chemistry of pesticides. En: *Encyclopaedia of chemical technology*, 4ª Edición, Vol, 22, (M. Howe-Grant Ed.), New York. John Wiley & Sons. Pp 419-451.
- Khan, S.U. **1980**. Physicochemical processes affecting pesticides in soils. En: *Pesticides in the soil environment*. R.J. Wakeman (ed.). Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, pp. 29-118.
- Koskinen, W.C., Harper, S.S. **1990**. The retention process: mechanism. En: *Pesticides in soil environment: Processes, impacts and modelling* (H.H. Cheng, Ed), SSA, Madison, WI, pp.51-57.
- Koskinen, W.C., Cox, L., Yen, P.Y. Changes in sorption/bioavailability on imidacloprid metabolites in soil with incubation time. *Biol. Fertil. Soils.* **2001**, 33, 546-550.
- Laird, D. A. **1996**. Interactions between atrazine and smectite surfaces. En: *Herbicides metabolites in surface waters and ground waters*. Meyers y Truman (eds.) Am. Chem. Soc., Washington D. C., pp. 86-100.
- Larsson, M.H., Jarvis, N.J., Torstensson, G., Kasteel, R. Quantifying the impact of preferential flow on solute transport to tile drains in sandy field soil. *J. Hydrology.* **1999**, 215, 116-134.
- Lewis, A. G., Locke, M.A., Wager, S.C., Zablotowicz, R., Redd, K.N. Sorption of bentazone and degradation products in two Mississippi soils. *Weed Sci.* **1996**, 44, 678-682.
- Li, H., Lee, L.S., Fabrege J.R., Jatvert, C.T. Role of pH in partitioning and cation exchange of aromatic amine on water-saturated soils. *Chemosphere.* **2001**, 44, 4, 627-635.
- Liñán, C. Vademecum de productos fitosanitarios. **2006**.

- Madrid, L. y Díaz-Barrientos, E. Effect of phosphate on the adsorption of 2,4-D on lepidocrocite. *Aust. J. Soil. Res.* **1991**, 29, 15-23.
- MAGRAMA. **2010**. Perfil Ambiental de España 2009: informe basado en indicadores. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. <http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/informacion-ambiental-indicadores-ambientales/indicadores-ambientales-perfil-ambiental-de-espana/default.aspx>
- Mansour, M., Feicht, E., Mealiar, P. Improvement of the photostability of selected substances in aqueous medium. *Toxicol. Environ. Chem.* **1989**, 20-21, 139-147.
- Manual de Buenas prácticas del Olivar. Consejería de Agricultura y Pesca, **2006**.
- McGechan, M.B. y Lewis, D.R. Transport of particulated and colloid-sorbed contaminants through soil, Part 1: General principles. *Biosyst. Engin.* **2002**, 83, 3, 255-273.
- Melero, S., Madejón, E., Ruiz, J. C., Herencia, J.F. Chemical and biochemical properties of a clay soil under dryland agriculture system as affected by organic fertilization. *Europ J. Agronomy.* **2007**, 26, 327-334.
- Menasseri, S., Koskinen, W.C., Yen, P.Y. Sorption of aged dicamba residues in soil. *Pest. Manage. Sci.* **2004**, 60, 297-304.
- Monkiedje, A. y Spiteller, M. Sorptive behavior of the phenylamide fungicides, mefenoxam and metalaxyl, and their acid metabolite in typical Cameroonian and German soils. *Chemosphere.* **2002**, 49, 659-668.
- Moore, D.M. y Reynolds, Jr. R.C. **1987**. X-Ray diffraction, identification and analysis of Clay Minerals. Eds. Oxford University Press. New York
- Moorman, T.B., Cowan, J.K., Arthur, E.L., Coats, J.R. Organic amendments to enhance herbicide biodegradation in contaminated soils. *Biol. Fertility Soils.* **2001**, 33, 541-545.
- Morillo, J. A., Antizar-Ladislao, B., Moteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A., Russell, N.J. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2009**, 82, 25-39.
- Nair, D.R y Schnoor, J.L. Effect of soil conditions on model parameters and atrazine mineralization rates. *Water Res.* **1994**, 28, 1199-1205.

- Navarro-Blaya, S. **1986**. Dinámica de los plaguicidas en el suelo. En: *Plaguicidas en Suelos, Serie: Monografías del Medio Ambiente nº 4* J. Cornejo y J.L. Pérez Rodríguez (Eds.), Agencia de Medio Ambiente. Junta de Andalucía, Sevilla, pp.11-41.
- Negre, M., Schulten, H.R., Gennari, M., Vindrola, D. Interaction of imidazolinone herbicides with soil humic acids. Experimental results and molecular modeling. J. Environ. Sci. Health B. **2001**, 36, 107-125.
- Nelson, S.D., Letey, J., Farmer, W.J., Williams, C.F., Ben-Hur, M. Facilitated transport of napropamide by dissolved organic matter in sewage sludge-amended soil. J. Environ. Qual. **1998**, 27, 1194-1200.
- Nemeth-Konda, L., Füleky, G., Morovjan, G., Csokan, P. Sorption behaviour of acetochlor, atrazine, carbendazin, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil. Chemosphere. **2002**, 48, 545-552.
- O'Connor, G.A., Wierenga, P.J., Cheng, H.H., Doxtader, K.G. Movement of 2,4,5-T through large soil columns. Soil Sci. **1980**, 130, 157-162.
- Oades, J.M. **1989**. An introduction to organic matter in mineral soils. En: *Minerals in soil environments*. J.B. Dixon y S.B. Weed (eds.). 2nd Ed., Wiley-Interscience, Madison, pp. 89-159.
- Ogram, A., Jessup, R.E., Ou, L.T., Rao, P.C.C. Effects of sorption on biological degradation rates of (2, 4-dichloro-phenoxy)-acetic acid in soils. Appl. Environ. Microbiol. **1985**, 49, 582-287.
- Osgerby, J.M. Sorption of un-ionized pesticides by soils. En: *Sorption and Transport Processes in Soils*. SCI Monograph. **1970**, 37, 63-78.
- Park, J.H., Feng, Y.C., Feng, J., P.S. Voice, T.C., Boyd, S.A. Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. Appl. Environ. Microbiol. **2001**, 69, 3288-3299.
- Pignatello, J.J. **1989**. Sorption dynamics of organic chemicals in soils and sediments. En: *Reaction and Movement of Organic Chemicals in Soils* (eds. B.L. Sawhney y K. Brown). Amer. Soc. Agr., Madison, WI. 45-80.
- Pignatello, J.J., Ferrandino, F.J., Huang, L.Q. Elution of aged and freshly added herbicides from a soil. Environ. Sci. Technol. **1993**, 27, 1563-1571.
- Pignatello, J.J. Dynamic interactions of natural organic matter and organic compounds. J. Soils Sediments. Published online. **2012**.

- Piotrowska, A., Lamarino, G., Rao, M.A., Gianfreda, L. Short-term effects of olive mill waste water (OMW) on chemical and biochemical properties of a semiarid Mediterranean soil. *Soil Biol. Biochem.* **2006**, 38, 600-610.
- Real, M. **2010**. Tesis Doctoral. Adsorción, persistencia y movilidad de compuestos orgánicos polares contaminantes de suelos.
- Reddy, K. S. y Gambrell, R.P. Factors affecting the adsorption of 2,4-D and methyl parathion in soils and sediments. *Agric. Ecosys. Environ.* **1987**, 18, 231-241.
- Rodríguez-Lucena, P., Hernández, D., Hernández-Apaolaza, L., Lucena, J.J. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 1085-1092.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manag.* **2006**, 26, 960-969.
- Roy, S.B. y Dzombak, D.A. Chemical factors influencing colloidal-facilitated transport of contaminants in porous media. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 656-664.
- Rutherford, D.W. y Chiou, C.T. Effect of Water Saturation in Soil Organic-Matter on the Partition of Organic-Compounds. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, 26, 965-970.
- Rutherford, D.W., Chiou, C. T., Kile, D.E. Influence of soil organic matter on the partition of organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, 26, 965-970.
- Russell, J.D., Cruz, M.I., White, J.L. The adsorption of 3-aminotriazole by montmorillonite. *J. Agric. Food Chem.* **1968**, 16, 21-24.
- Sánchez-Camazano, M., Sánchez-Martín, M.J., Poveda, E., Iglesias-Jiménez, E. Study of the effect of exogenous organic matter on the mobility of pesticides in soils using soil thin-layer chromatography. *J. Chromatography A.* **1996**, 754, 279-284.
- Schmidt, R.R., y Fedtke, C. Metamitron activity in tolerant and susceptible plants. *Pest Sci.* **1977**, 8, 611-617.
- Schnitzer, M.I., Monreal, C.M. **2011**. Quo vadis Soil Organic Matter Research? A Biological Link to the Chemistry of Humification, en *Advances in Agronomy*, 113, 139-213.
- Schulten, H.R., Thomsen, M., Carlsen, L. Humic complexes of diethyl phthalate: molecular modelling of sorption process. *Chemosphere.* **2001**, 45, 357-369.
- Schwertmann, U. y Taylor, R. M. **1989**. Iron oxides. En: *Minerals in Soil Environments*. J. B. Dixon y S. B. Weed (eds.). 2nd Ed., Madison WI, pp. 379-439.

- Senesi, N. Binding Mechanisms of Pesticides to Soil Humic Substances. *Sci. Total Environ.* **1992**, 123, 63-76.
- Si, Y., Zhang, J., Wang, S., Zhang, L., Zhou, D. Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethametsulfuron-methyl in acidic soils in China. *Geoderma.* **2006**, 130, 66-76.
- Singh, N., Megharaj, . Gates, W.P, Churchman, G.J., Anderson, J., Kookana, R.S., Naidu, R., Chen, Z., Slade, P.G., Sethunathan, N. Bioavailability of an organosphosphorous pesticide, fenamiphos, sorbed on an organo clay. *J. Agric Food Chem.* **2003**. 51, 2653-2658.
- Socías-Viciana, M.M, Fernández-Pérez, M., Villafranca-Sánchez, M., González-Pradas, E., Flores-Céspedes, F. Sorption and leaching of atrazine and MCPA in natural and peat-amended calcareous soil from Spain. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1236-1241.
- Stevenson, F.J. **1985**. Geochemistry of soil humic substances. En: *Humic substances in soil, sediment, and water*. Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P. (eds.), Wiley-Interscience, New York, pp. 13-52.
- Theng, B.K.G. **1974**. The chemistry of clay-organic reactions, Wiley-Interscience, New York.
- Thomas R.G. **1982**. Volatilization from soil. En : *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*. W.J. Lyon W. P. Reehl Y D.H. Rosenblatt (eds). McGraw Hill, New York. Cap. 16, pp.1-50.
- Watson, J.R., Posner, A. M., Quirk, J.P. Adsorption of the herbicide 2,4-D on goethite. *J. Soil Sci.* **1973**, 24, 503-511.
- Wauchope, R. D. The pesticide content of surface water drainage from agricultural fields: a review. *J. Environ. Qual.* **1978**, 7, 459-472.
- Wauchope, R. D. y Myers, R. S. Adsorption-desorption kinetics of atrazine and linuron in freshwater sediments aqueous slurries. *J. Environ. Qual.* **1985**, 14, 132-136.
- Wauchope, R.D., Yeh, S., Linders, J.B.H.J., Kloskowski, R., Tanaka, K., Rubin, B., Katayama, A., Kördel, W., Gerstl, Z., Lane, M., Unsworth, J.B. Review: Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest. Manag. Sci.* **2002**, 58, 419-445.
- Braida, W.J., Pignatello, J.J., Lu, Y., Ravikovitch, P.I., Neimark, A.V., Xing, B. Sorption hysteresis of benzene in charcoal particles. **2003**, 37, 2, 409-417.

- Weber J.B., Shea, P.H., Weed, S.B. Fluoridona retention and release in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1986**, 50, 582-588.
- Weber, J. B., Swain, L. R., Streck, H. J. Sartori, J. L. **1980**. Herbicide mobility in soil leaching columns. En: *Research Methods in Weed Science*. N. D. Camper (ed.). Southern Weed Science Society. Champaign, IL. 189-200.
- Weber, J.B., y Swain, L.R. Sorption of dinicolazole and metolachlor by four soils, calcium-organic matter and calcium-montmorillonite. *Soil Sci.* **1993**, 156, 171-177.
- Wershaw, R.L. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. *J. Contam. Hydrol.* **1986**, 1, 29-45.
- Williams, C.F., Letey, J., Farmer, W.J. Molecular weight of dissolved organic matter-napropamide complex transported through soil columns. *J. Environ. Qual.* **2002**, 31, 619-627.
- Wolfe, N. L., Mingelgrin, U., Miller, G.C. **1990**. Abiotic transformations in water, sediments, and soil. En: *Pesticides in the soil environment: Processes, impacts, and modeling*. H. H. Cheng (ed.). SSSA, Madison, WI, pp. 103-168.
- Worrall, F., Parker, A., Rae, J. E., John, A. C. A study of suspended and colloidal matter in the leachate from lysimeters and its role in pesticide transport. *J. Environ. Qual.* **1999**, 28, 595-604.
- Worrall, F., Fernández-Pérez, M., Johnson, A.C., Flores-Céspedes, F., González-Pradas, E. Limitation of the role of incorporated organic matter in reducing pesticide leaching. *J. Contam. Hydrol.* **2001**, 49, 241-262.
- Yen, J.H., Sheu, W.S., Wang, Y.S. Dissipation of the herbicide oxyfluorfen in subtropical soils and its potential to contaminate groundwater. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **2003**, 54, 151-156.

Capítulo II
Efecto de la adición de alperujo sobre el comportamiento
en suelo de los herbicidas MCPA y S-metolaclo-ro bajo
condiciones de laboratorio. Estudios de adsorción-
desorción, disipación, mineralización, lixiviación y
bioensayos

II.1-Introducción

En los últimos años se está intensificando la investigación en el uso de residuos sólidos generados durante el proceso de extracción de aceite de oliva en almazaras, como el **alperujo**, para enmendar suelos agrícolas. El alperujo es un residuo muy húmedo (57-75% de humedad), altamente rico en materia orgánica, en K, N total, sustancias fenólicas hidrosolubles (ya que constituye un residuo de origen vegetal) y en grasas (Alburquerque et al., 2004, 2009; Morillo et al., 2009). La adición de alperujo al suelo, constituido principalmente por hemicelulosa y lignina (Alburquerque et al., 2004; Serramiá et al., 2011), incrementa el contenido en materia orgánica, mejora la estructura y enriquece la población microbiana de los suelos, a la vez que pueden reducir la pérdida de plaguicidas, con la gran ventaja frente a otros tipos de residuos, de su bajo contenido en metales pesados, y patógenos. Teniendo en cuenta todo esto y el impacto medioambiental que genera la gestión de las grandes cantidades de alperujo producidas en las almazaras andaluzas, su reutilización como enmendante en suelo supone un modo ecológico, eficaz y barato de mejorar las propiedades de los suelos andaluces (Rodríguez-Lucena et al., 2010), además de controlar la contaminación del medio ambiente, al reducir las pérdidas de plaguicidas, jugando un papel importante en el mantenimiento de los ecosistemas naturales (Roig et al., 2006). Es importante considerar entre todas las ventajas que su aporte a los suelos proporcionan, que la aplicación directa de estos residuos en ocasiones tiene efectos tóxicos sobre los organismos vegetales del suelo, consecuencia de su alto contenido en compuestos fitotóxicos como los fenoles, por lo que para una aplicación segura, es necesario comprobar el estado de madurez de esos componentes (Alburquerque et al., 2009). Además, estos residuos son pobres en general en P, Ca, y Mg e incrementan el contenido en sales y la acidez de los suelos (Alburquerque et al., 2004).

Tal y como se ha dicho en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral, la adición al suelo de enmiendas no siempre es garantía del control y disminución de la lixiviación de plaguicidas, especialmente de aquellos que son muy solubles en agua (Celis et al., 1998; Worrall et al., 2001; Fernandes et al., 2006).

II.2.-Objetivos

El objetivo general de este capítulo ha sido conocer en profundidad el efecto que tiene la adición de dos alperujos con similar contenido en materia orgánica pero distinta calidad de la misma, sobre el comportamiento de un herbicida de carácter ácido como es MCPA y otro de carácter neutro, como S-metolacoloro, en suelos dedicados a cultivos intensivos en el valle del Guadalquivir. Los objetivos específicos a desarrollar en este Capítulo han sido, por un lado evaluar el efecto que la adición de los alperujos producen sobre las propiedades fisicoquímicas y superficiales de los suelos usados, caracterizar la materia orgánica soluble de los alperujos por las técnicas de espectroscopia de fluorescencia y espectroscopia infrarroja y estudiar la influencia que tiene la adición de estos residuos de almazara al suelo, sobre los procesos de adsorción, desorción, lixiviación, disipación, mineralización y efectividad biológica de los herbicidas MCPA y S-metolacoloro bajo condiciones de laboratorio.

II.3.-Materiales y Métodos

II.3.1.-Herbicidas

II.3.1.1.-MCPA

MCPA es un ácido químicamente muy estable ((4-cloro-2-metilfenoxi) acético). Posee un peso molecular de 200.6 g mol⁻¹ y un coeficiente de partición octanol agua log P = 0.59 a pH 5 y -0.81 a pH 7 (ambos a 20 °C). Su solubilidad en agua es 0.395 g l⁻¹ a pH 1 y 25 °C, a la misma temperatura y con las mismas unidades, 26.2 a pH 5, 293.9 a pH 7 y 320.1 a pH 9 y en metanol 775.6 g l⁻¹ a 25°C. Presenta un pKa de 3.73 a 25 °C (Tomlin, 2008).

Es un herbicida auxínico, sistémico y selectivo. Se absorbe tanto por vía foliar como radicular y se trasloca hacia toda la planta. Se acumula en el tejido meristemático, donde inhibe el crecimiento de éste, ya que interfiere en la división y diferenciación celular, así como en la síntesis de proteínas (Liñán, 2006). Se utiliza para el control de post-emergencia de malas hierbas anuales y perennes de hoja ancha en cereales, lino, arroz, vides, guisantes, patatas, espárragos y olivo. La dosis agroquímica para MCPA oscila entre 0.28 y 2.25 kg ha⁻¹ y con frecuencia se usa en combinación con otros herbicidas.

El producto técnico empleado para los estudios de adsorción-desorción, lixiviación, disipación y bioensayos fue suministrado por Sigma Aldrich GmbH (Seelze, Alemania) con una pureza de 98.8%. Para los estudios de mineralización se usó el producto MCPA-[U¹⁴-C-ring] marcado radiactivamente con actividad específica de 5.55 MBq mg⁻¹ y proporcionado por IZOTOP (Budapest, Hungría).

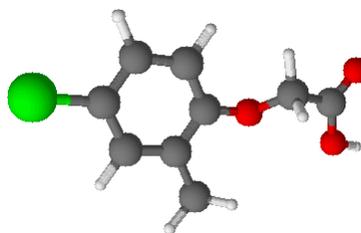


Figura II.1. Estructura tridimensional de la molécula de MCPA. Círculos rojos: átomos de oxígeno; grises: carbonos; blancos: hidrógenos y verde: átomo de cloro.

II.3.1.2.-S-metolacloro

S-metolacloro(S-2-cloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-(2-metoxi-1-metiletil)acetamida) pertenece a la familia de las cloroacetamidas. Posee un peso molecular de 283.8 g mol⁻¹ y coeficiente de partición octanol agua log P= 3.05 (20 °C y pH 7). Su solubilidad en agua es de 0.480 g l⁻¹ a 25 °C y es totalmente miscible en solventes orgánicos (Tomlin, 2008).

Es un herbicida selectivo de preemergencia o temprana postemergencia, es comúnmente usado para el control de adventicias (principalmente hierbas anuales y algunas hierbas de hoja ancha) en cultivos de maíz, algodón, soja, remolacha, girasol y patata entre otros (Cao et al., 2008). Se absorbe principalmente por los hipocótilos y brotes y actúa inhibiendo la división celular y la germinación. Su dosis de aplicación varía entre 0.8 y 1.6 kg ha⁻¹.

S-metolacloro es un producto mezcla de isómeros en una proporción 80-100% (S- isómeros) y hasta un 20% (R- isómeros). Moser et al. (1982) encontraron en un estudio con 10 especies distintas de malas hierbas, que los S- isómeros poseen al menos 20 veces más actividad biológica en preemergencia que los R- isómeros.

El producto técnico usado para los estudios de adsorción-desorción, lixiviación, disipación y bioensayos fue suministrado por Dr Ehrenstorfer GMBH (96% de pureza). No

se realizaron ensayos de mineralización debido a que no se disponía del herbicida S-metolacloro marcado radiactivamente.

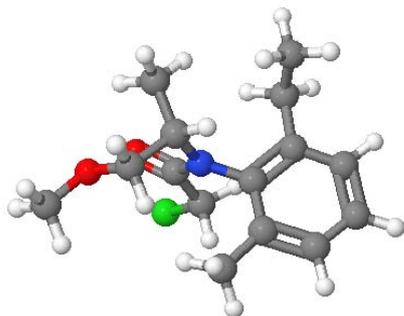


Figura II.2. Estructura tridimensional de la molécula de S-metolacloro. Círculos rojos: átomos de oxígeno; grises: carbonos; blancos: hidrógenos; verde: átomo de cloro y azul: nitrógeno.

II.3.1.3.-Método de análisis de los herbicidas

Para el análisis de los herbicidas descritos en este capítulo se usaron dos técnicas analíticas que se describen a continuación. Para la determinación de los herbicidas MCPA y S-metolacloro sin marcar con C^{14} se usó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El cromatógrafo usado pertenece a la marca comercial "Waters Milipore" y está constituido por una bomba WATERS 1525, un inyector automático WATERS 717 Autosampler y un detector de fotodiodos WATERS 2996 Photodiode Array Detector. El sistema está controlado por un ordenador a través del software "Millenium 2010 Chromatography manager versión 2.15.01. Se empleó una columna Nova Pack C_{18} de 150 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno. El volumen de inyección fue de 25 μ l y el flujo del sistema eluyente de 1 ml min^{-1} en modo isocrático.

Previo análisis de las muestras de herbicidas por HPLC se realizó la puesta a punto de los métodos de detección para cada uno de los herbicidas. Se determinaron los límites inferiores de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) según el protocolo descrito por Camacho-Muñoz et al. (2009) y se seleccionó como sistema eluyente más óptimo (es decir, sistema eluyente con el que se obtuvo mayor porcentaje de recuperación del herbicida tras una extracción) una mezcla de metanol y ácido fosfórico (1 N) a pH 2 para el análisis de MCPA, en una proporción 60:40 (v/v) y para S-metolacloro una mezcla acetonitrilo y agua Mili-Q en una proporción 55:45 (v/v). La concentración de los

herbicidas MCPA y S-metolacloro en solución de las muestras se cuantificó a las longitudes de onda de 230 y 204 nm, respectivamente, y en un tiempo de análisis de 7 minutos. Los valores para LOD y LOQ encontrados se reflejan en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Límites inferiores de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) por HPLC para MCPA y S-metolacloro.

| Herbicidas | LOD (mg l ⁻¹) | LOQ (mg l ⁻¹) |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| MCPA | 0.02 | 0.05 |
| S-metolacloro | 0.01 | 0.03 |

Para el análisis de MCPA marcado con C¹⁴ se utilizó LSC. Las muestras se recogían en unos viales de propileno especiales para el análisis, con capacidad para 6.5 ml y se mezclaban homogéneamente con 5 ml de líquido de centelleo Ecolite suministrado por Biomedicals. Las muestras permanecían 24 horas en oscuridad y posteriormente eran analizadas con un contador de centelleo BECKMAN LD 5000 TD.

A diferencia del HPLC, que presenta límites inferiores de detección y cuantificación específicos para cada molécula química que se analice, el conteo por centelleo posee un límite de detección general para todas las moléculas, determinado por el aparato, que en este caso y el líquido de centelleo usado en particular, se encontraba dentro del rango 18-22 dpm.



Figura II.3. HPLC (izquierda) y contador de centelleo (derecha).

II.3.2.-Alperujos

Se han utilizado dos subproductos orgánicos de la producción de aceite de oliva: un alperujo procedente de una almazara de la finca experimental del Instituto de Investigación Agraria y Pesquera (IFAPA) de Mengíbar, Jaén, (AJ), y otro proporcionado por la empresa Hijos de Espuny Osuna S.L. de Morón, (AM). Para reducir su alto contenido en humedad se dejaron secar al aire libre mediante volteo con pala mecánica.

II.3.2.1.-Propiedades físicas y químicas

Propiedades físico-químicas (como contenido en COT, contenido en nitrógeno, pH, CE, etc ...) de estos alperujos fueron determinadas por el Servicio de Análisis del IRNAS con la metodología habitual para residuos orgánicos. El contenido en MO total de los alperujos se determinó por calcinación a 540 °C, y el pH en una relación 1:5 (p/v) residuo/agua destilada. El contenido en hemicelulosa, celulosa y lignina fue determinado usando el método descrito por Goering y Van Shoest. (1970). Además se analizó el contenido en algunos macronutrientes y micronutrientes de estos residuos, entre ellos algunos metales pesados por ICP-OES, también en el Servicio de Análisis del IRNAS. Estas propiedades se encuentran recogidas en la Tabla.II.4.

II.3.2.2.-Caracterización de la materia orgánica soluble (MOS)

Debido a la dificultad para determinar experimentalmente la verdadera MOS en muestras de suelo, suele estudiarse en su defecto la materia orgánica total o COT extraíble en agua o solución de CaCl₂ (0.01 M) (Zsolnay y Görlitz, 1994).

Las técnicas usadas para la caracterización de la MOS han sido la espectroscopia de fluorescencia y la espectroscopia de infrarrojos (FTIR), técnicas ampliamente empleadas para la caracterización de la MOS (Cox et al., 2000, 2004; Ohno et al., 2007).

Determinación del carbono orgánico soluble total

También fue determinado el contenido en CO de los extractos de MOS. Para ello se pusieron a interaccionar triplicados de 1 g de AJ y AM con 20 ml de CaCl₂ (0.01 M). Las suspensiones fueron agitadas durante 24 h a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 15 min a 8000 rpm. El sobrenadante se filtró usando filtros de vidrio de 0.45 µm de tamaño de poro. Se hicieron diluciones 1:100 (v/v) y el COT de los extractos se analizó

en el Servicio de Análisis del IRNAS con un Analizador de Carbono Orgánico Total y módulo de Nitrógeno Shimadzu TOC-V sch (TOC).

Estudios por espectroscopia de fluorescencia

Triplicados de 1 g de muestras de AJ y AM se extrajeron con 20 ml de una solución CaCl₂ (0.01 M). Las suspensiones fueron agitadas durante 15 min a temperatura ambiente, se centrifugaron durante 15 min a 8000 rpm y finalmente se filtraron usando filtros de fibra de vidrio.

La MOS en estas muestras se analizó por espectroscopia de fluorescencia en el espectrofotómetro F-2500 FL-SPECTROPHOTOMETER de HITACHI, en el rango de longitudes de onda de entre 300 y 480 nm, ya que para valores inferiores y superiores se observa el fenómeno de dispersión (Zsolnay y Görlitz., 1994). Por otro lado se acidificaron las muestras añadiendo HCl (2 N) hasta alcanzar pH 2. Se midió la absorbancia a 254 nm de los extractos de alperujo a temperatura ambiente y a pH de extracto. Se excitó la muestra a la longitud de onda de 254 nm y se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia. A partir de estos espectros de fluorescencia, se ha calculado el índice de Humificación (HIX) según Zsolnay et al. (1999):

$$\text{HIX} = \frac{\sum_{\text{WI}=435}^{480} I_{\text{WI}}}{\sum_{\text{WI}=300}^{345} I_{\text{WI}}} \quad \text{Ecuación II.1}$$

Donde WI es la longitud de onda en nanómetros e I_{WI} es la intensidad a una longitud de onda determinada.

Estudios por espectroscopia infrarroja

Triplicados de 5 g de los distintos residuos se hicieron interaccionar con 10 ml de CaCl₂ (0.01 M), se agitaron durante 24 h y se centrifugaron 15 min a 8000 rpm. El sobrenadante se filtró usando filtros de fibra de vidrio de 0.45 µm de poro y se pasó a unas placas de cerámica donde se congelaron a -4 °C durante 24 h. Una vez congeladas se liofilizaron durante 24 h y posteriormente se molieron en mortero de ágata y se secaron a

100 °C en una estufa durante 24 h. Las muestras se analizaron por espectroscopia de infrarrojos FT-IR en un NICOLET 5PC y el barrido utilizado estuvo comprendido entre 400 y 4000 cm^{-1} usando un promedio de 4 registros y una resolución nominal de 4 cm^{-1} .

Esta técnica se basa en la aplicación de frecuencias de vibración conocidas a una muestra, en función de las cuales, van a vibrar unos u otros enlaces de las moléculas contenidas en la muestra, representándose en picos (bandas) de transmitancia a diferentes números de onda, correspondiendo a los distintos grupos funcionales.

II.3.3.-Suelos

Se seleccionaron tres suelos (S, C y T) procedentes de cultivos intensivos de la Vega del río Guadalquivir en base a sus distintas características físico-químicas, contenido en CO y a su uso. El suelo S, de textura arenosa, procede de la finca experimental “La Hampa” perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en la localidad de Coria del Río, provincia de Sevilla (37°17'N, 6°03'O), mientras que los otros dos (C y T), de textura arcillosa, pertenecen a los municipios de Las Cabezas de San Juan (36°59'N, 5°56'O) y Tocina (37°36'N, 5°44'O), respectivamente (Figura II.5.) de la provincia de Sevilla, España.



Figura II.4. Situación de los puntos de muestreo de los suelos procedente de Coria del Río, Las Cabezas de San Juan y Tocina (S, C y T) (amarillo) y procedencia de los alperujos de Jaén y Morón (blanco).

Los suelos se muestrearon a una profundidad de 0-20 cm y fueron llevados al laboratorio donde se secaron al aire, se tamizaron con un tamiz de 2 mm de luz de malla y se congelaron a -4 °C hasta su caracterización y/o utilización.

Los estudios de adsorción-desorción, lixiviación, disipación y mineralización de los herbicidas se realizaron en los suelos sin enmendar y enmendados con los alperujos AJ y AM a las dosis de 5% y 10% (p/p) (S, S5J, S10J, S5M, S10M, C, C5J, C10J, C5M, C10M, T, T5J, T10J, T5M y T10M).

II.3.3.1.-Análisis elemental

Las propiedades físico-químicas de los suelos fueron determinadas por el Servicio de Análisis de Suelos del IRNAS por la metodología habitual. La textura de los suelos sin enmendar se determinó por el método de la pipeta (Gee y Bauder, 1982). El contenido de MO se determinó por oxidación con dicromato potásico, según Nelson y Sommers. (1982). El pH del suelo se midió en una mezcla de suelo/agua destilada en una relación 1:2 (p/v). Para determinar el contenido en COS de los extractos de suelo (S, C y T) sin enmendar y enmendados, para lo que se pesaron triplicados de 5 g y se pusieron a interactuar con 10 ml de CaCl₂ (0.01 M), las suspensiones se agitaron durante 24 h a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 15 min a 8000 rpm. El sobrenadante se filtró usando filtros de fibra de vidrio de 0.45 µm de tamaño de poro. Se hicieron diluciones a la relación 1:25 (v/v) y se analizaron con un TOC del Servicio de Análisis del IRNAS. Los valores se recogen en la Tabla II.3. La determinación del contenido de Fe de las muestras de suelo se llevó a cabo por el Servicio de Análisis del IRNAS usando un ICP-OES.

II.3.3.2.-Mineralogía

La fracción arcilla de los suelos (fracción de tamaño de partícula < 2µm) se obtuvo por sedimentación, tras una eliminación previa de carbonatos con una solución de acetato/acético (pH 5) (Jackson, 1975). La composición de las fracciones arcilla se determinó por difracción de rayos X sobre agregados orientados saturados en Mg²⁺ y K⁺ tratados con etilenglicol y calcinadas a 500 °C, respectivamente (Brown, 1961).

II.3.3.3.-Porosimetría

Para la determinación de la estructura de poros de los distintos suelos usados (sin enmendar y enmendados al 5% y 10%) se tomaron muestras de 1 g de agregados de suelo, se secaron en una estufa a 90 °C durante 24 h y se determinó la distribución de tamaños de poro (de 0.004 a 400µm) presentes en las muestras de suelo por Porosimetría de Intrusión de Mercurio usando un Quantachrome Poremaster 33 GT, se realizó bajo una superficie de tensión de mercurio de $\gamma=0.48 \text{ N m}^{-1}$ y un ángulo de contacto de mercurio de $\theta=140^\circ$ y poder calcular la distribución del tamaño de poro con la ecuación de Washburn (Washburn, 1921).

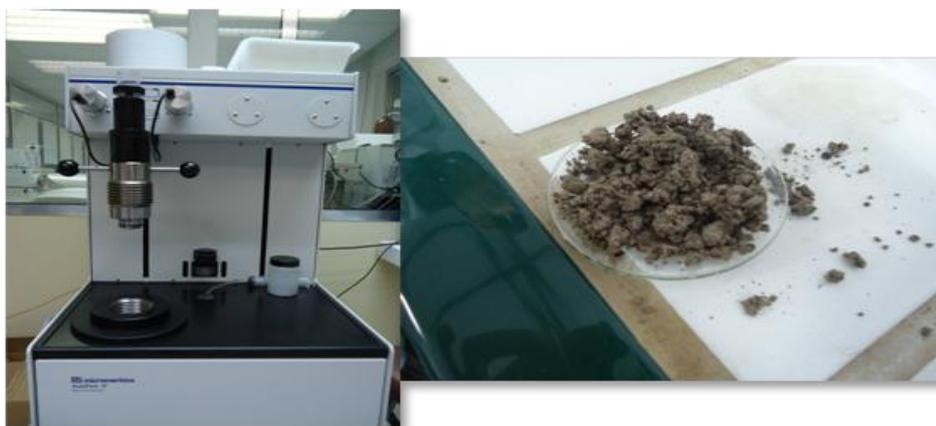


Figura II.5. Porosímetro de Intrusión de Mercurio (Quantachrome Poremaster 33 GT) (Izquierda) y agregados de suelo seco para analizar (derecha).

II.3.3.4.-Determinación de capacidad de retención de agua

Los estudios de disipación, mineralización y respiración se realizaron al 40% de la capacidad máxima de retención de agua de los suelos originales y los suelos enmendados en laboratorio. Por duplicado y para cada suelo sin enmendar y enmendado con los dos alperujos al 5% y 10% por separado (p/p) (S, S5J, S10J, S5M, S10M, C, C5J, C10J, C5M, C10M, T, T5J, T10J, T5M y T10M,) se usaron embudos de vidrio sobre los que se colocó un papel de filtro y 30 g de suelo sin enmendar y enmendado, saturados con agua. Todo esto se colocó sobre un matraz Erlenmeyer para favorecer el drenaje de agua. Se anotaron los pesos del conjunto embudo+suelo+matraz inmediatamente después de saturar los suelos y tras 24 h a temperatura ambiente. La diferencia entre estos dos pesos representó la cantidad máxima de retención de agua del suelo, a partir de la cual se

calculó el 40% de la capacidad de retención. El volumen de agua fue aplicado al inicio y conservado constante en todos los suelos durante todo el periodo de estudio en los experimentos de disipación y mineralización de los herbicidas y respiración de los suelos.

II.3.3.5.-Respiración basal

Se monitorizó la respiración basal (la producción de CO₂ por parte de organismos vivos del suelo) durante 42 d en los suelos frescos sin enmendar y enmendados (tras 24 h de su muestreo en campo y previo a su congelación a -4°C). Para ello, se usaron matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 25 g de suelo sin enmendar y enmendados, por duplicado para cada tratamiento, con alperujo de Jaén al 5 y 10% (p/p) (S, S5J, S10J, S5M, S10M, T, T5J, T10J, T, T5M, T10M, C, C5J y C10J, C5M y C10M). Se añadió agua destilada al suelo hasta ajustar su contenido de humedad al 40% de la capacidad máxima de retención de los suelos. En el brazo del matraz biométrico se añadieron 15 ml de NaOH (1 N) que actuarían como trampa de CO₂ resultado de la respiración de los organismos presentes en el suelo. El peso del matraz biométrico se controlaba semanalmente con el fin de mantener el contenido en humedad constante del suelo durante el periodo de estudio. En caso de que el peso disminuyera, se le añadía agua destilada al suelo hasta reponer la pérdida de humedad de los matraces y alcanzar el peso inicial. Debido a la rápida saturación en CO₂ que puede sufrir la solución de NaOH (1 N), los 15 ml eran retirados y reemplazados semanalmente durante los 42 d de estudio (constituyendo las tomas de muestreo a los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42) y eran diluidos en agua ultrapura Mili Q (relación 1:25 (v/v)). Estos extractos diluidos eran analizados por el Servicio de Análisis de Suelos del IRNAS usando un Analizador de TOC, como el citado en el apartado II.3.2.2.



Figura II.7. Matraces biométricos usados en los estudios de respiración basal de los suelos.

II.3.4.-Estudios con herbicidas en laboratorio

II.3.4.1.-Estudios de adsorción

La adsorción de los herbicidas en los suelos sin enmendar y enmendados al 5% y 10% (p/p) se determinó haciendo interaccionar 5 g (por duplicado) de los suelos con 10 ml de disoluciones iniciales en CaCl_2 (0.01 M) como disolvente, para mantener constante la fuerza iónica, de MCPA y S-metolacloro las concentraciones iniciales (C_i) fueron de 5, 10, 20, 40 y 50 μM . El uso de disoluciones de extracción con baja concentración de iones bivalentes (CaCl_2), minimiza la dispersión de arcillas e imita de alguna forma la fuerza iónica del agua en los poros del suelo (Zsolnay y Picolo, 1996). Las muestras de suelo se pesaron en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml de capacidad, se agitaron mecánicamente durante 24 h a temperatura ambiente, ya que previamente se había comprobado que este periodo era tiempo suficiente para que se alcanzara el equilibrio entre la solución y las partículas del suelo. Las muestras se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 min, los sobrenadantes se filtraron con filtros de fibra de vidrio y se analizaron por HPLC, obteniéndose los valores de concentración de MCPA y S-metolacloro en el equilibrio en solución (C_e (mg l^{-1})). Se asumió que las diferencias entre C_i y C_e se debían a procesos de adsorción de los herbicidas en los suelos.

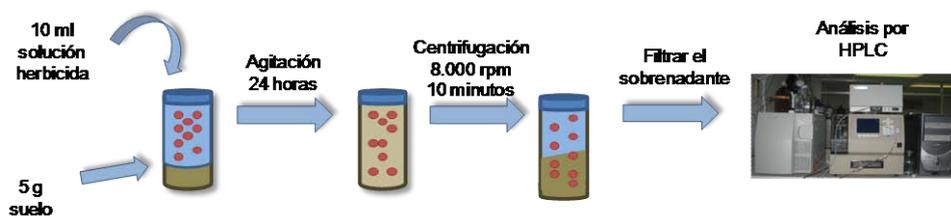


Figura II.7. Esquema del método batch de adsorción de herbicidas (círculos rojos) en los suelos.

Las isotermas de adsorción se obtuvieron representando las cantidades de los herbicidas adsorbidos (C_s ($mg\ kg^{-1}$)) frente a las concentraciones de equilibrio (C_e ($mg\ l^{-1}$)) correspondientes a cada concentración inicial.

$$C_s = \frac{(C_i - C_e) \times V}{m} \quad \text{Ecuación II.2.}$$

Siendo V (ml) el volumen de la disolución de herbicida y m (kg) el peso del suelo.

Para la descripción cuantitativa de los procesos de adsorción, las isotermas obtenidas experimentalmente se ajustaron a la ecuación logarítmica de Freundlich, como se ha descrito en el apartado I.2.1. del Capítulo I.

$$C_s = K_f \times C_e^{1/n_f} \quad \text{Ecuación II.3.}$$

Siendo K_f el coeficiente de adsorción que corresponde a la cantidad de plaguicida adsorbido cuando C_e es igual a la unidad y $1/n_f$ es otra constante que indica la intensidad de la adsorción. Del ajuste lineal de la expresión logarítmica de la ecuación de Freundlich (Ver Ecuación I.3.) se obtienen los valores de K_f como la ordenada en el origen y de $1/n_f$ como la pendiente de la recta de la representación de $\log C_s$ frente a $\log C_e$.

II.3.4.2.-Estudios de desorción

Tras la adsorción se realizaron tres desorciones sucesivas a partir de la disolución de mayor concentración de cada herbicida (50 μM). Para ello, una vez agitadas y centrifugadas las muestras de suelo con las disoluciones de herbicidas correspondientes en equilibrio, se retiraron 5 ml de sobrenadante (que fueron analizados posteriormente por HPLC) constituyendo el valor C_s a la concentraciones de 50 μM , para MCPA y S-metolacloro y se añadieron otros 5 ml de CaCl_2 (0.01 M). El suelo fue resuspendido con la nueva disolución y se dejó de nuevo en agitación durante 24 h. Se volvió a centrifugar a 8.000 rpm durante 10 min y se retiraron 5 ml de sobrenadante, constituyendo este sobrenadante la primera desorción (1ªD) y se añadieron de nuevo 5 ml de CaCl_2 (0.01 M). Se repitió el mismo procedimiento 3 veces hasta conseguir la primera ($C_{s\text{des}1^a}$), segunda ($C_{s\text{des}2^a}$) y tercera ($C_{s\text{des}3^a}$).

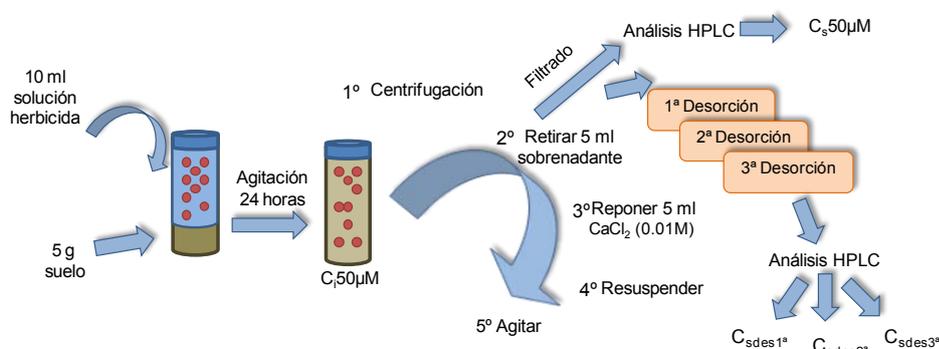


Figura II.8. Esquema del proceso de desorción de MCPA a partir de suelos con una solución de MCPA 50 μM .

Al igual que en los estudios de adsorción, la cantidad de herbicida en los sobrenadantes en los ciclos de desorción ($C_{s\text{des}1^a}$, $C_{s\text{des}2^a}$, $C_{s\text{des}3^a}$) fue determinada también por HPLC.

Para obtener las isotermas de desorción se representó el valor de C_e frente a la cantidad de herbicida adsorbida por el suelo en la desorción (C_{sd}).

Los coeficientes de histéresis expresados en porcentaje, se calcularon según la ecuación I.4. (ver Capítulo I). El porcentaje de desorción se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$D = \frac{C_{S\text{Ads}} 50 - C_{S\text{Des}3^a} 50}{C_{S\text{Ads}} 50} \times 100 \quad \text{Ecuación II.4.}$$

II.3.4.3.-Estudios de disipación

El estudio de disipación de los herbicidas se llevó a cabo en tarros de vidrio herméticos de 1 l de capacidad que contenían 500 g de suelo sin enmendar y enmendados con AJ y AM al 10% (p/p) para el caso del herbicida MCPA y a las dosis de 5% y 10% para S-metolacloro. Para ello, en primer lugar se añadió a los suelos una solución en etanol (solvente orgánico que produce menor efecto tóxico sobre los organismos presentes en el suelo) de los herbicidas MCPA y S-metolacloro a las dosis de 1.5 y 1 kg ha⁻¹, respectivamente. Posteriormente se añadió agua destilada suficiente para llevar al suelo al 40% de su capacidad máxima de retención de agua y se tamizó 2 veces usando un tamiz de luz de malla 2 mm con el fin de distribuir homogéneamente el herbicida en las muestras de suelo. Los suelos se traspasaron a envases con cierres herméticos y se guardaron en oscuridad a 25±1 °C durante todo el experimento (118 días). Con el objeto de controlar que la humedad del suelo a lo largo del estudio no variaba, se controló el peso semanalmente de los tarros y en caso de pérdida de humedad se reponía con agua destilada.



Figura II.9. Tarros herméticos para estudio de disipación de los herbicidas.

Se tomaron muestras a los tiempos: 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 77 y 118 días tras la aplicación de MCPA y 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 77, 90 y 118 días tras la aplicación de S-metolacloro. Cada uno de esos días se recogía 30 g de muestra de cada tratamiento que eran congeladas hasta el momento de extracción de los herbicidas. Las extracciones se realizaron con una relación 1:2 (p/v) de 5 g de suelo y 10 ml de extractante, una mezcla de ácido fosfórico (1 N y pH 2) y metanol en proporción (40:60) (v/v) para MCPA y solución únicamente de metanol para S-metolacloro. Las interacciones suelo-extractante

se agitaron durante 24 h, y posteriormente se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 min. El extracto se filtró utilizando filtros vidrio de 0.45 µm de tamaño de poro y se analizó por HPLC. Se representaron los logaritmos neperianos de la cantidad de herbicida extraído frente al tiempo y del ajuste lineal se calculó la vida media ($T_{1/2}$) de los herbicidas en los suelos originales y enmendados. Se asumió que la disipación de los herbicidas en los suelos siguió una cinética de primer orden:

$$C = C_0 e^{-kt} \quad \text{Ecuación II.5.}$$

La expresión logarítmica de la ecuación es:

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad \text{Ecuación II.6.}$$

Siendo C_0 la concentración inicial de herbicida, C la concentración de herbicida en el tiempo y k , una constante de disipación.

La vida media se calculó utilizando la ecuación:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Ecuación II.7.}$$

II.3.4.4.-Estudios de mineralización

Los estudios de mineralización se llevaron a cabo sólo con el herbicida MCPA. Para ello se usó C^{14} -MCPA (marcado uniformemente en el anillo bencénico), que presentaba una actividad específica de 5.55 MBq mg^{-1} . Se determinó su mineralización en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados con alperujo AJ al 5% y 10 % (p/p). Para ello se colocaron 25 g por duplicado en matraces biométricos de 250 ml de capacidad y se añadió la disolución de herbicida marcado con C^{14} para conseguir una radiactividad final de 0.05 µCi en 25 g de suelo (unas 4000 dpm g^{-1} de suelo aproximadamente). También se aplicó al suelo el herbicida sin marcar hasta alcanzar una concentración de 1.5 kg ha^{-1} . A continuación, se añadió agua destilada para ajustar el contenido al 40% de la capacidad máxima de retención de agua. En el brazo del matraz biométrico se añadió 1 ml de NaOH (1 N) que actuaría como trampa de CO_2 resultado de la mineralización MCPA y se selló con un tapón de goma. El matraz biométrico se pesaba semanalmente para controlar que la

humedad permaneciera constante durante el transcurso del estudio. También se retiraba el mililitro de NaOH semanalmente, y reemplazado por una disolución nueva mientras que el retirado se mezclaba con 5 ml de líquido de centelleo, se dejaba durante 24 horas bajo condiciones de oscuridad tras lo que se registraba la cantidad de herbicida mineralizado por LSC.



Figura II.11. Columnas de vidrio empaquetadas a mano con los suelos sin enmendar y enmendados para los estudios de movilidad.

II.3.4.5.-Estudios de lixiviación

Para los estudios de lixiviación de MCPA y S-metolacloro en suelos alterados, se empaquetaron manualmente columnas de vidrio de 24 cm de longitud y diámetro interno de 3.1 cm con 140 g de los suelos sin enmendar y con los suelos enmendados. Con el fin de evitar la pérdida de partículas de suelo durante el estudio de lixiviación, se colocó en la parte inferior de la columna lana de vidrio y sobre ésta, 10 g de arena de mar lavada de grano grueso (Panreac). Otros 10 g de arena se colocaron en la parte superior de la columna para que la distribución de la disolución inicial del herbicida y las disoluciones de lavado fuera lo más uniforme posible en la columna. Además, con esta arena de mar también se reducían pérdidas por evaporación de dichas disoluciones.

Antes de aplicar el herbicida al suelo de las columnas, se procedió a determinar el volumen de poro de los suelos originales y enmendados empaquetados en las columnas

de vidrio, es decir, la cantidad de agua que es capaz de retener el suelo bajo condiciones de saturación. Para ello se añadieron 80 ml de CaCl_2 (0.01 M) y una vez transcurridas 24 h se midió el volumen lixiviado. La diferencia entre el volumen aplicado y el recogido, corresponde al volumen de poro de los suelos.

La dosis de aplicación de los distintos herbicidas fueron: 1.5 kg ha^{-1} para MCPA y 1 kg ha^{-1} para S-metolacloro. Después de 24 h de la aplicación del herbicida se procedió a aplicar diariamente 10 ml de CaCl_2 (0.01 M) durante 30 d para MCPA y 50 d para S-metolacloro. El volumen del lixiviado era medido y guardado en una cámara frigorífica ($-4 \text{ }^\circ\text{C}$) hasta el momento de ser filtradas y analizados por HPLC.

Las concentraciones de herbicidas medidas en los lixiviados se representaron frente al volumen de poro obteniéndose las curvas de elución relativa. Las curvas de elución acumuladas resultaron de representar el porcentaje de plaguicida acumulado en los lixiviados frente al volumen de poro calculado.

Al final del estudio, se determinó la cantidad residual de los herbicidas en el suelo de las columnas de vidrio. Para ello se extrajo el suelo y se dividió en 4 fragmentos de 5 cm aproximadamente, correspondiendo con 4 profundidades: 0-5, 5-10, 10-15 y 15-20 cm.

Las extracciones se realizaron con 100 ml de extractante, una mezcla de ácido fosfórico (pH 2) y metanol (40:60) (v/v) como extractante para MCPA y solución únicamente de metanol para S-metolacloro. Una vez puesto a interaccionar el suelo con el extractante en un tubo de centrifuga, se dejó agitando durante 24 h y, posteriormente se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 min. El extracto se filtró y se analizó por HPLC la cantidad de herbicida residual.

II.3.4.6.-Bioensayo

Para comprobar que la efectividad biológica de los herbicidas MCPA y S-metolacloro no se veía afectada por la adición de alperujo al suelo y al mismo tiempo comprobar que el residuo no produce efecto fitotóxico, se llevó a cabo un bioensayo bajo condiciones de laboratorio con semillas de *Lepidium sativum* (nombre común, berro, para el herbicida MCPA) y *Lolium perenne* (nombre común, raigrás inglés, para S-metolacloro) en macetas con suelo C sin enmendar y enmendado al 10% (p/p).

Se usaron macetas de plástico de 50 cm² en cuyo fondo se dispusieron 30 g de arena de mar lavada de grano grueso (Panreac) y lana de vidrio para facilitar el drenaje de agua y reducir la pérdida de partículas de suelo. Una vez se hubieron rellenado las macetas con 200 g del suelo C, se saturaron con agua y dejaron drenar durante 24 h. Tras eso, se colocaron 15 semillas de berro y 0.5 g de semillas de raigrás inglés en la superficie del suelo de la maceta para después semienterrarlas con 5 g de suelo.

Se realizaron cuatro tratamientos distintos por triplicado: macetas con el herbicida a la dosis de 1.5 kg ha⁻¹ (para MCPA) y 1 kg ha⁻¹ (para S-metolacloro), macetas a las que se le añadió alperujo AJ al suelo al 10% (p/p), macetas tratadas con herbicida y con AJ y macetas sin herbicida ni residuo orgánico, constituyendo los controles (C).

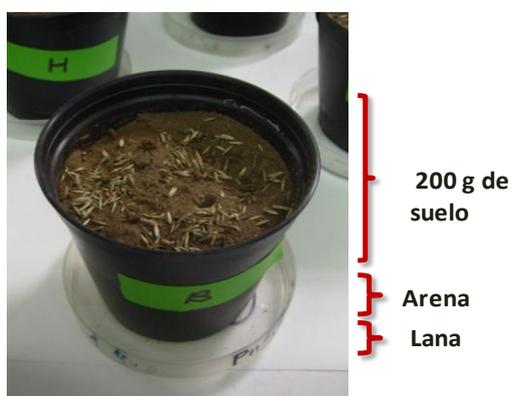


Figura II.11. Preparación de macetas para los bioensayos con MCPA y S-metolacloro.

Las macetas se dispusieron en un lugar idóneo para la germinación y se regaron diariamente con agua. La determinación de la eficacia biológica de los herbicidas se determinó transcurridos 20 días desde su aplicación mediante un control visual del crecimiento de las plantas y posterior peso de la biomasa aérea germinada.

II.4.-Resultados y discusión

II.4.1.-Caracterización de alperujos

II.4.1.1.-Propiedades físicas y químicas

La caracterización de los alperujos Jaén (AJ) y Morón (AM) usados en este trabajo se realizó según la metodología descrita en el apartado II.3.2. En la Tabla II.2. se muestran algunas de sus propiedades físico-químicas y el Índice de Humificación (HIX) calculado a partir de los espectros de fluorescencia, como se describirá más adelante. Además, se determinó el contenido de algunos macronutrientes y micronutrientes de estos alperujos, entre ellos algunos metales pesados, cuyos valores se recogen en la Tabla II.3.

Tabla II.2. Propiedades físico-químicas e índice de humificación (HIX) de los dos alperujos utilizados.

| Alperujos | pH | MOT (%) [^] | COS (g l ⁻¹) | N Kjeldahl (%) | CE (mS cm ⁻¹) | H | C | LC | HIX |
|-----------|-----|----------------------|--------------------------|----------------|---------------------------|----------------|---------------|---------------|-----|
| AJ | 6.7 | 81 | 2.2 | 1.5 | 3.1 | 12.4 ±1.33* | 16.5 ±0.66 | 10.5 ±0.61 | 9.5 |
| AM | 4.8 | 91 | 4.1 | 1.1 | 9.1 | 15.9 ±0.34 | 23.8 ±0.27 | 23.5 ±0.31 | 1.3 |

[^] calcinada a 540 °C; H: hemicelulosa; C: celulosa; LC: lignina-cutina; * error estándar

Como se puede observar en la Tabla II.2., el pH de AM es más bajo que el presentado por AJ. Esta diferencia afectará al pH de la solución del suelo y puede ser importante en lo que respecta a la adsorción de herbicidas ácidos, como MCPA, que se presentan en forma aniónica a los pH normales de suelos agrícolas (pka 3.73). El valor de COS de AM fue dos veces mayores que para AJ (4.1 frente a 2.2 g l⁻¹). Tanto el contenido en materia orgánica, como el contenido en N (ambos más bajos en AJ que en AM), se encuentran dentro de los valores normales para este tipo de residuos, al compararse con los valores publicados por Albuquerque et al. (2004) en un estudio de caracterización de once alperujos procedentes de distintas localidades de España. Los contenidos en hemicelulosa, celulosa y la lignina (Tabla II.2.), productos finales de la humificación, fueron más altos en el caso del alperujo AM, que en AJ. Esto es indicativo del menor grado de madurez de este primer alperujo, ya que se ha constatado que con el proceso de compostaje disminuyen los niveles de lignina y celulosa (Komilis y Ham, 2003; Albuquerque et al., 2009). Esto se confirma además, con el menor pH de este alperujo

(4.8), respecto al de AJ (6.7), que se atribuye a la presencia de compuestos que le confieren acidez al residuo, como son los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, lípidos y fenoles, que se ven reducidos durante el proceso de compostaje (Alburquerque et al., 2006). Esto confirma la naturaleza más compostada y humificada del residuo AJ, respecto al alperujo AM.

La conductividad eléctrica (CE) es una variable que puede presentar valores muy dispares en función del origen del residuo (Madejón et al., 1998). Como se puede ver en la Tabla II.2., AJ presenta 3 veces menor CE que AM, (3.1 respecto a 9.1 mS cm⁻¹), valores que se encuentran entre los recogidos en una revisión de propiedades físico-químicas de ocho alperujos presentada por Roig et al. (2006). La diferencia en CE entre los dos alperujos usados en este estudio se puede deber a que en el caso del residuo procedente de Morón, las aguas del lavado de la aceituna en su tratamiento en la almazara, presentaran mayor contenido en especies iónicas (potasio, cloro, sulfatos, amonio y nitratos) ya que el contenido en sodio de este alperujo fue 24 veces mayor que para AJ. Al contrario, se encontró cuatro veces más Calcio en AJ que AM (Tabla II.3.), lo que se ha atribuido a la naturaleza más calcárea de las aguas de lavado de la aceituna, o algún otro proceso ocurrido durante la extracción del aceite de oliva o incluso el agua de riego del cultivo, en el caso de alperujo procedente de Jaén. Los valores de micronutrientes y macronutrientes (Tabla II.3.) fueron similares a los encontrados en otros estudios (Alburquerque et al., 2004; Roig et al., 2006). Los valores presentados por As, Cd, Co, S y Zn se encontraban dentro de los valores normales para este tipo de residuos. El contenido en Cu fue mayor de lo normalmente detectado en otros alperujos (Roig et al., 2006), lo que puede ser debido a los tratamientos con sulfato de cobre que se aplican en ocasiones al olivar con el fin de reducir infecciones fúngicas como las producidas en las hojas por el Repilo (*Spilocaea oleagina*) (Tabla II.3.). También se encontró que Pb, Ni y Fe presentaron valores ligeramente más altos de los generalmente encontrados (Tabla II.3.), elementos cuya presencia en los alperujos se encuentra asociada entre sí y se relaciona a la maquinaria que se usa en las almazaras durante el proceso de extracción de aceite de oliva (Alburquerque et al., 2009; Roig et al., 2006).

Tabla II.3. Porcentajes para algunos macronutrientes y micronutrientes metálicos y no metálicos contenidos en los dos alperujos utilizados (AJ y AM).

| | Al | Co | Cu | Fe | Mg | Mn | Ni | Pb |
|-----------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|
| | (%) | | | | | | | |
| AJ | 0.213 | 0.007 | 0.003 | 0.197 | 0.32 | 0.006 | <0.001 | 0.006 |
| AM | 0.217 | <0.001 | 0.002 | 0.057 | 0.22 | 0.021 | <0.001 | 0.003 |
| | As | Ca | Cd | K | Na | P | S | Zn |
| | (%) | | | | | | | |
| AJ | <0.001 | 3.95 | <0.001 | 1.70 | 0.032 | 0.390 | 0.452 | 0.003 |
| AM | <0.001 | 1.06 | <0.001 | 2.02 | 0.771 | 0.370 | 0.374 | 0.002 |

II.4.1.2.-Caracterización MOS

Estudios por espectroscopia de fluorescencia

Debido a la relevancia que la MOS puede desempeñar sobre el movimiento de los plaguicidas en el perfil del suelo, se llevó a cabo una caracterización de la misma. Los estudios por espectroscopia de fluorescencia de la MOS de los alperujos se realizó según la metodología descrita en el apartado II.3.2.2. Los espectros de fluorescencia de los extractos de MOS de los dos alperujos utilizados en este estudio se muestran en la Figura II.12. En ella se representa la intensidad de fluorescencia con excitación a 254 nm de la MOS normalizada al máximo registrado, frente a la longitud de onda comprendida en el rango 300-480 nm a pH del extracto y acidificado a pH 2.

En la Figura II.12. se puede observar que la forma de los espectros de la MOS de los alperujos a pH de extracto (línea continua), es distinta: el espectro de fluorescencia de AM (línea azul) muestra dos máximos de emisión bien definidos, uno en la región de absorbancia de los 300-360 nm y otra a longitudes de onda mayores de 400 nm, mientras que AJ (línea amarilla) muestra un único máximo a longitudes de onda superiores a 400 nm. Las diferencias entre los espectros de fluorescencia de los alperujos indican que, aunque los dos residuos contengan similares cantidades de MO (AJ= 81% y AM= 91%), la MOS, la cual es indicativa de la MOT, es cualitativamente distinta.

A longitudes de onda próximas a 300 nm fluorescen moléculas de menor peso molecular, polares y no humificadas (Kumke et al., 1995; Zsolnay et al., 1999; Cox et al., 2000, 2004; Ohno et al., 2007), mientras que a longitudes de ondas superiores a 400 nm, lo hacen moléculas mayores y más complejas, probablemente aromáticas, típicas del material humificado (Senesi et al., 1991; Zsolnay et al., 1999; Cox et al., 2000, 2004; Ohno

et al., 2007). Esto es lo que ocurre en el caso del alperujo AJ y nos sugiere que su MOS se encuentra en un estado de humificación más avanzado que la de AM.

A partir de estos espectros de fluorescencia, se ha calculado el índice de Humificación (HIX) según Zsolnay et al. (1999), usando la Ecuación II.1. Los valores para este índice se muestran en la Tabla II.1. Éstos indican que la materia orgánica soluble de AJ, indicativa de la MOT, se encuentra más humificada que la de AM, lo que coincide con los espectros de fluorescencia. Los valores son, en el caso del alperujo AJ, superiores a los HIX de suelos de la zona de las marismas del Guadalquivir y en el caso del alperujo AM, inferiores (Cox et al., 2004). Estos resultados coinciden con la caracterización elemental de los residuos, que mostraron menores MOT y COS en AJ que AM, compuestos que se han visto reducidos durante el proceso de compostaje, más avanzado para el primero que el segundo. (Barriuso, et al., 2011).

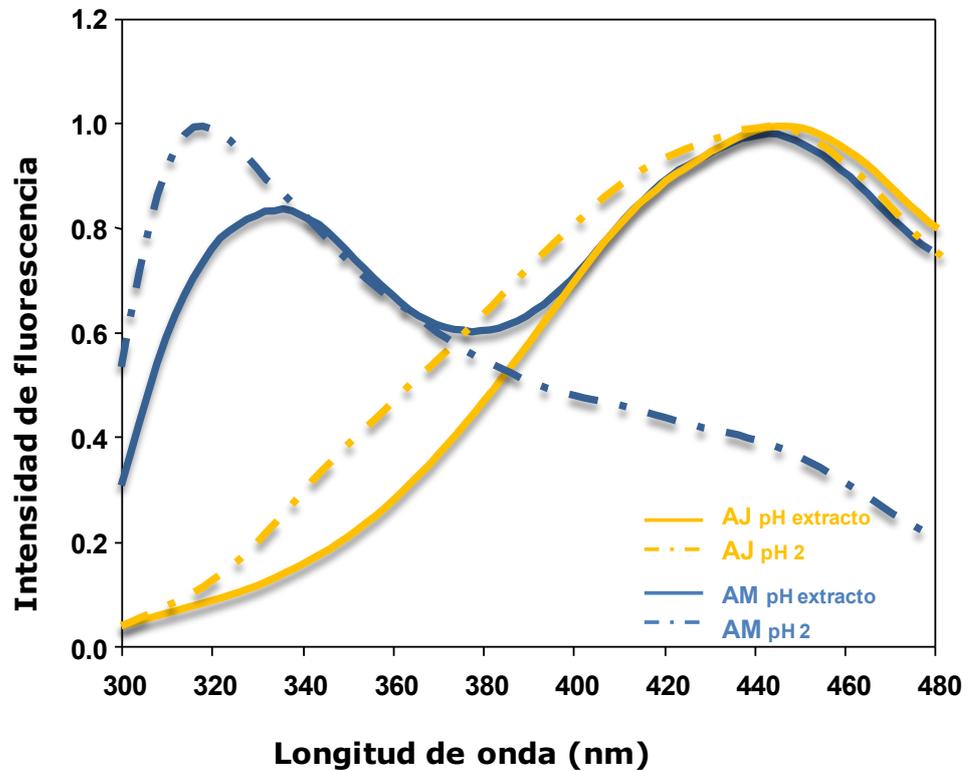


Figura II.12. Espectro de fluorescencia normalizados al máximo de emisión para la MOS extraída de los alperujos Jaén (AJ, línea amarilla) y Morón (AM, línea azul) a pH de extracto (línea continua) y a pH 2 (línea discontinua).

De acuerdo con la bibliografía (Ewald et al., 1988; Spark y Swift, 1994) se sabe que la fluorescencia de las moléculas es función del pH al que se mida. Esto puede ser debido a grupos funcionales que al pH de los extractos se encuentran cargados negativamente y hacen que el tamaño de las moléculas de MO sea mayor causa de la repulsión entre las cargas negativas, dando lugar a una mayor fluorescencia. Por este motivo se acidificaron los extractos a pH 2 con el fin de eliminar así las diferencias debidas al distinto grado de protonación de los grupos funcionales en los dos alperujos estudiados. Estos grupos quedan protonados a pH 2 y la repulsión entre los distintos grupos funcionales es menor que al pH de extracto, haciendo que las moléculas de MO se “encojan”, emitiendo así menor fluorescencia (Wit et al., 1993; Murphy et al., 1994). En la Figura II.12. se observa que acidificar los extractos a pH 2 (línea punteada) altera especialmente el espectro de fluorescencia de la MOS de AM de menor pH (Tabla II.2.), ya que el pico de emisión a longitudes de onda superiores a 400 nm, desaparece. El diferente comportamiento de la MOS de los alperujos frente a la acidificación, refleja la diferente composición, en lo que a grupos funcionales se refiere, del componente soluble de la MO de estas enmiendas.

Estudios por espectroscopia infrarroja

Las muestras secas de los extractos de MOS de los alperujos fueron analizadas por espectroscopia de infrarrojos FT-IR según la metodología descrita en el apartado II.3.2.2. Los espectros FT-IR se muestran en la Figura II.13. La asignación de bandas a los distintos grupos funcionales se llevó a cabo según Bellamy. (1975). Estos espectros confirman junto con los resultados de los estudios de fluorescencia, la diferencia en la calidad de la MOS de los alperujos.

Entre las bandas que más destacan en los espectros de FT-IR se encuentra una a 1739 cm^{-1} que corresponde con la absorción del grupo carbonilo (C-O) del grupo carboxílico protonado (-COOH) (Cox et al., 2004) y la banda a 1596 cm^{-1} que corresponde con el grupo carbonilo del ión carboxilato (-COO⁻) (Bellamy, 1975). La enmienda AM, de pH más ácido (Tabla II.2.), contiene más cantidad de protones en solución, por lo que los grupos carboxilos de las moléculas en solución se encuentran tanto en forma -COOH como -COO⁻, de modo que se observa un pico a 1596 cm^{-1} (grupos COO⁻) y también otro a 1739 cm^{-1} (grupos -COOH) (Bellamy, 1975). En la enmienda AJ, de pH más alto (Tabla II.2.), el pico de absorción correspondiente a los grupos COOH (1739 cm^{-1}) es menor en relación

con el pico que corresponde al grupo COO^- (1596 cm^{-1}). En este alperujo, como consecuencia de un mayor estado de humificación y compostaje, los compuestos fenólicos que le proporcionan el carácter ácido a la enmienda, se han visto reducidos (Albuquerque et al., 2006).

Por otro lado, en la región comprendida entre $3200\text{-}3400 \text{ cm}^{-1}$, aparece una banda ancha para el caso de AM, que puede ser asignada al modo de vibración de los grupos hidroxilos de los -COOH y que presenta menor intensidad en AJ, probablemente por su menor contenido en grupos carboxílicos y fenólicos protonados.

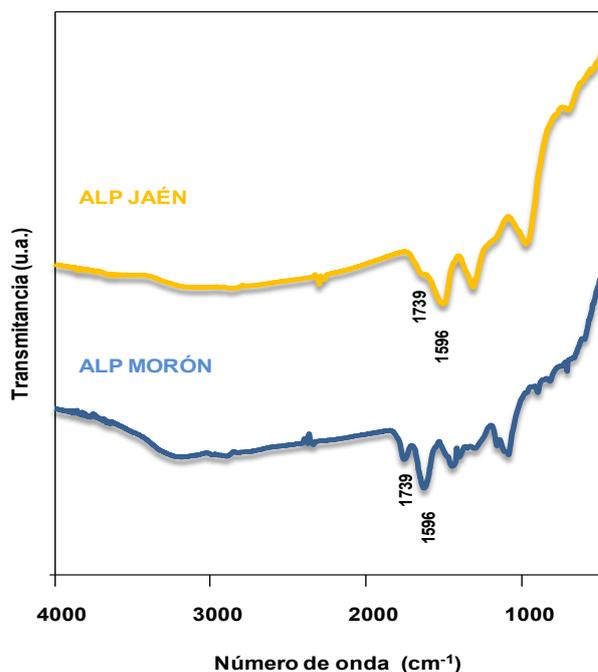


Figura II.13. Bandas de absorción expresadas en transmitancia de los espectros FT-IR de los extractos de MOS para AJ (amarillo) y AM (azul).

La humificación constituye un proceso de estabilización y maduración de los compuestos poco transformados que constituyen la MO de los suelos. Es decir, una conversión de la MO fácilmente degradable, en sustancias húmicas (Schnitzer y Monreal, 2011). Estos componentes húmicos son los principales responsables de muchos procesos y funciones del sistema suelo. Como consecuencia, la calidad y la cantidad de las sustancias húmicas en los residuos orgánicos se consideran factores determinantes desde el punto de vista agronómico, medioambiental y en lo que a su valor económico se refiere (Senesi et al., 2007). Básicamente, el compostaje no es más que el mismo proceso de degradación

y maduración de restos orgánicos que ocurre en la naturaleza pero a mayor velocidad, manteniéndose la relación de que a medida que el periodo de tiempo del proceso de compostaje aumenta, menor heterogeneidad molecular, reducción del contenido en sustancias fitotóxicas como los fenoles, mayor tamaño molecular, mayor condensación aromática y por tanto, mayor grado de humificación de los restos orgánicos ocurre.

Es importante hacer hincapié en la diferencia entre los conceptos de estabilidad y madurez. Mientras que estabilidad de la MO de los suelos se refiere al grado de descomposición de la misma, madurez se refiere al grado de descomposición de compuestos fitotóxicos contenidos en las sustancias orgánicas. La aplicación de residuos orgánicos poco maduros, es decir, con un alto contenido fenólico, puede tener como efecto negativo la reducción de la vitalidad o productividad de cultivos o incluso contaminar aguas. Por ello, previa aplicación en el campo, los alperujos u otros residuos orgánicos, se someten a diversos tratamientos, bien dirigidos a reducir su carga tóxica mediante biorremediación y/o a mejora su manejo y gestión, con ayuda de métodos para la bioconversión en productos de alto valor añadido (Roig et al., 2006; Morillo et al., 2009). Estos tratamientos pueden ser el compostaje, vermicompostaje y procesos anaeróbicos o aeróbicos. Sin embargo, un factor que encarece y dificulta el proceso, es que para ser compostado, el alperujo necesita ser mezclado con restos orgánicos de otra procedencia, como pueden ser tallos de uvas (Alburquerque et al., 2006) o paja (Madejón et al., 1998) debido a su consistencia semisólida y baja porosidad.

II.4.2.-Suelos

II.4.2.1.-Análisis elemental. Propiedades físico-químicas y superficiales

Algunas propiedades físico-químicas de los suelos sin enmendar (S, C, T) y enmendados con los alperujos Jaén (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J), y Morón (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M) a las dosis de 5% y 10% (p/p) se presentan en la Tabla II.4.

Los suelos usados en este estudio se recolectaron en zonas agrícolas de la cuenca del río Guadalquivir cultivadas con trigo, algodón y cítricos en el momento del muestreo (Tabla II.4.). Mientras que el suelo S presentó una textura gruesa con un 76% de arena, los otros dos suelos (C y T) fueron fundamentalmente arcillosos (59 y 48% arcilla, respectivamente).

Tabla II.4. Propiedades físico-químicas de los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M).

| Suelos | Cultivo | Arcilla | Limo (%) | Arena | Fe (%) | pH (1:2) (agua) | CO (%) | COS (mg l ⁻¹) | N Kjeldahl (%) | CE (mS cm ⁻¹) |
|-------------|------------------|---------|----------|-------|------------------------------|-----------------|--------|---------------------------|----------------|---------------------------|
| S | T* | 15 | 9 | 76 | 0.498 ±0.013 [^] | 8.30 | 0.495 | 10.3 | 0.049 | 0.075 |
| S5J | | | | | | 7.50 | 1.30 | 15.4 | 0.13 | 0.204 |
| S10J | | | | | | 6.80 | 2.73 | 22.0 | 0.320 | 0.202 |
| S5M | | | | | | 7.26 | 2.11 | 13.2 | 0.189 | 1.04 |
| S10M | | | | | | 6.95 | 2.36 | 20.0 | 0.215 | 0.816 |
| C | A* G** R** | 59 | 24 | 17 | 0.398 ±0.013 [^] | 8.15 | 0.729 | 16.0 | 0.117 | 0.698 |
| C5J | | | | | | 7.86 | 1.59 | 21.3 | 0.286 | 1.08 |
| C10J | | | | | | 7.15 | 3.08 | 29.5 | 0.368 | 1.04 |
| C5M | | | | | | 7.83 | 1.54 | 23.4 | 0.146 | 0.844 |
| C10M | | | | | | 7.22 | 3.89 | 31.1 | 0.338 | 1.39 |
| T | C* | 48 | 19 | 33 | 0.403 ±0.04 [^] | 8.40 | 1.09 | 15.3 | 0.157 | 0.719 |
| T5J | | | | | | 7.78 | 2.29 | 17.4 | 0.217 | 0.789 |
| T10J | | | | | | 6.65 | 2.38 | 22.5 | 0.206 | 0.809 |
| T5M | | | | | | 7.30 | 2.12 | 18.2 | 0.189 | 0.770 |
| T10M | | | | | | 7.00 | 2.95 | 22.0 | 0.262 | 1.29 |

*cultivo presente en el momento de la recolección de la muestra de suelo. **cultivos años previos a la recolección del suelo. T: trigo; A: algodón; G: girasol; R: remolacha; C: cítricos; [^]error estándar respecto a la media.

Los valores iniciales de pH de los tres suelos (S, C, T) de naturaleza ligeramente alcalina, fueron similares entre sí (8.3, 8.15 y 8.4), y se vieron reducidos tras enmendarse, (Tabla II.4.). Este descenso es debido al pH ácido de los alperujos (Tabla II.2) y corrobora previos estudios de adición de residuos de almazara al suelo donde el pH se veía reducido al enmendar (Fernandes et al., 2006; Roig et al., 2006).

La adición de alperujo aumentó el contenido de CO en todos los suelos enmendados tanto a la dosis de 5% como a 10% con el alperujo AJ, así como con AM, mostrando un aumento de hasta 5.4 veces en S10J, respecto al suelo sin enmendar (S) (Tabla II.4.).

El contenido en COS de los dos suelos arcillosos sin enmendar (C y T), de mayor CO iniciales, fueron similares entre sí y superiores al encontrado para S, de menor CO inicial (Tabla II.4.). El COS se vio incrementado al enmendar los tres suelos estudiados

causa del alto contenido en COS de las enmiendas (hasta 100 veces superior que en los suelos) (Tabla II.2.). Cabe destacar el aumento del contenido en N biodisponible (N Kjeldahl) de los suelos, siendo el incremento más significativo para el suelo arenoso, que inicialmente contenía muy poco (0.049%), mientras que los valores más altos se hallaron para los suelos C10J y C10M (Tabla II.4.). Estos datos corroboran los obtenidos en otros estudios que han revelado que la adición de alperujo como fertilizante al suelo de los cultivos, supone al mismo tiempo ventajas e inconvenientes. Entre las ventajas se encuentran, como se ha dicho anteriormente, el aumento de nutrientes como K, N y contenido en CO (Albuquerque et al., 2004, 2009). En ocasiones, la adición de alperujo puede tener como inconveniente el incremento del contenido en sales, y con ello, la CE de los suelos (Albuquerque et al., 2004). Nuestros resultados revelaron un aumento en CE en los suelos enmendados, sobre todo con el alperujo AM, de mayor CE inicial (9.1 mS cm^{-1}). El aumento en la CE fue más intenso en el suelo S (hasta 14 veces mayor) al enmendar con AM) (Tabla II.4.).

El estudio mineralógico de los suelos reveló predominancia de arcillas Ilíticas respecto a la cantidad de Montmorillonita y Caolita (Tabla II.5.). Llama la atención la diferente mineralogía de los suelos arcillosos C y T (de similar contenido en arcillas totales, 59% y 48%), el primero con casi un 30 % de arcillas expansivas mientras que el segundo presentó prácticamente un 90 % de Ilita/Mica.

Tabla II.5. Porcentajes relativos de filosilicatos presentes en la fracción arcilla de los tres suelos estudiados sin enmendar (S, C y T).

| Suelos | % Relativo | | |
|----------|------------|----|----|
| | M* | I* | C* |
| S | 34 | 46 | 20 |
| C | 27 | 56 | 17 |
| T | 0 | 88 | 12 |

*M: Montmorillonita; I: Ilita/Mica; C: Caolita

La estructura porosa de los agregados del suelo determina la superficie expuesta de suelo y condiciona los procesos de retención y transformación que tienen lugar durante las interacciones que se dan entre los compuestos orgánicos y las partículas coloidales naturales del suelo (Celis et al., 1996). Entre las técnicas que determinan la superficie de poro de los suelos, la Porosimetría de Mercurio se considera generalmente

como el método existente más riguroso para determinar la porosidad en el rango de macroporos y el rango superior de mesoporos (Gregg y Sing, 1982). Los volúmenes de poro relativos y el volumen total de poro (VT) de los suelos sin enmendar y enmendados con los dos alperujos se muestran en la Figura II.14. y en la Tabla II.6. Las barras verticales de la Figura II.14. indican la contribución del intervalo de radio de poro correspondiente a la curva del volumen de poro acumulado durante la medición.

Tabla II.6. Volúmenes relativos y totales (VT) de poro ($\text{mm}^3 \text{g}^{-1}$) para distintos rangos de tamaño de poro de los suelos sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M).

| Rango (μm) | S | S5J | S10J | S5M | S10M |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| >100 | 45.5 | 62.1 | 50.5 | 60.1 | 67.2 |
| 100-1 | 119 | 165 | 151 | 156 | 127 |
| 10-1 | 36.6 | 32.4 | 51.7 | 30.3 | 45.2 |
| 1-0.1 | 8.13 | 9.42 | 11.9 | 9.40 | 196 |
| < 0.1 | 0.407 | 0.781 | 1.12 | 0.84 | 0.833 |
| VT | 210 | 270 | 266 | 257 | 250 |

| Rango (μm) | C | C5J | C10J | C5M | C10M |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| >100 | 68.8 | 66.0 | 52.3 | 71.9 | 48.6 |
| 100-1 | 47.8 | 91.8 | 72.3 | 84.9 | 65.2 |
| 10-1 | 18.5 | 48.6 | 25.4 | 31.7 | 34.9 |
| 1-0.1 | 8.40 | 17.7 | 7.93 | 11.6 | 9.34 |
| < 0.1 | 49.7 | 38.7 | 46.4 | 46.7 | 60.1 |
| VT | 193 | 263 | 204 | 240 | 204 |

| Rango (μm) | T | T5J | T10J | T5M | T10M |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| >100 | 30.5 | 42.8 | 49.6 | 42.9 | 44.3 |
| 100-1 | 79.9 | 126 | 85.7 | 117 | 141 |
| 10-1 | 50.1 | 60.9 | 56.0 | 60.1 | 56.8 |
| 1-0.1 | 21.6 | 25.5 | 26.9 | 23.1 | 23.1 |
| < 0.1 | 33.5 | 31.7 | 32.6 | 30.4 | 32.3 |
| VT | 215 | 287 | 251 | 274 | 298 |

El suelo S, de alto contenido en arena (76%), y por ello de textura gruesa, mostró una distribución de tamaño de poro (Figura II.14., diagrama de barras verticales) con un máximo relativo de volumen de poro entre 1-100 μm , o poros de gran tamaño (macroporos) y conductores (Di Bonito et al., 2005), típicos de suelos arenosos, lo que

también explica el bajo volumen de poros de pequeño tamaño (inferiores a 0.1 μm , Figura II.14.). Por el contrario, los suelos arcillosos C y T (59% y 48% de arcilla, respectivamente) mostraron además de alto volumen de poro en la zona de macroporos, un máximo alrededor de la zona de poro entorno a 0.01 μm , poros de menor tamaño, frecuentes en suelos arcillosos.

Tras enmendar los tres suelos con los alperujos, se observó un aumento en el VT (Tabla II.6. y línea continua en Figura II.4.). Este aumento es debido a un incremento del volumen de poro en el rango comprendido entre 10 y 100 μm , es decir, los poros de mayor tamaño en el rango estudiado en los suelos S, C y T. En el suelo C, además se encontró un aumento en el rango comprendido entre 1-10 μm (Tabla II.6.). Estas diferencias en porosidad entre los suelos arcillosos pueden deberse a su diferente mineralogía (Tabla II.5.), la cual va a determinar las diferentes interacciones entre componentes coloidales en el suelo (Cox et al., 1997). Igualmente, Albarrán et al. (2003) comprobaron que la adición de un alperujo, provocaba un aumento en el volumen de poros con un radio aproximado de 10 μm . En un estudio llevado a cabo por Fernandes et al. (2006) también se observó que la adición de alperujo al suelo provocaba un aumento general en la porosidad debido a un aumento del volumen de poros de mayor rango estudiado (10-100 μm), coincidiendo con los resultados aquí mostrados. Dicho aumento se atribuyó a una menor interacción con las partículas de suelo, originando con ello poros de mayor tamaño. Por el contrario, estos resultados difieren de los presentados por Cox et al. (2001) y Fernandes et al. (2006), que encontraron una reducción en VT al enmendar suelos con un residuo líquido procedente de la extracción del aceite de oliva. La reducción de la porosidad en estos suelos enmendados se ha atribuido al alto contenido en COS y sales de la enmienda líquida, los cuales agregan las partículas del suelo, bloqueando los poros de gran tamaño (Tisdall y Oades, 1982). Este hecho ha sido observado con anterioridad en suelos que fueron regados durante tres años consecutivos con alpechín, el residuo líquido de la producción del aceite de oliva por el sistema de extracción de tres fases, con un alto contenido en COS (Cox et al., 1997).

Además de la porosidad, se ha visto que otros parámetros físicos del suelo pueden verse alterados al enmendarse con residuos orgánicos de almazara. Kavdir y Killi. (2008) encontraron que la adición de un residuo sólido de almazara a la dosis del 8% (p/p)

a suelos agrícolas modificó la estabilidad de los agregados del mismo suelo, la cual se vió favorecida tras dos meses de incubación dicho tratamiento.

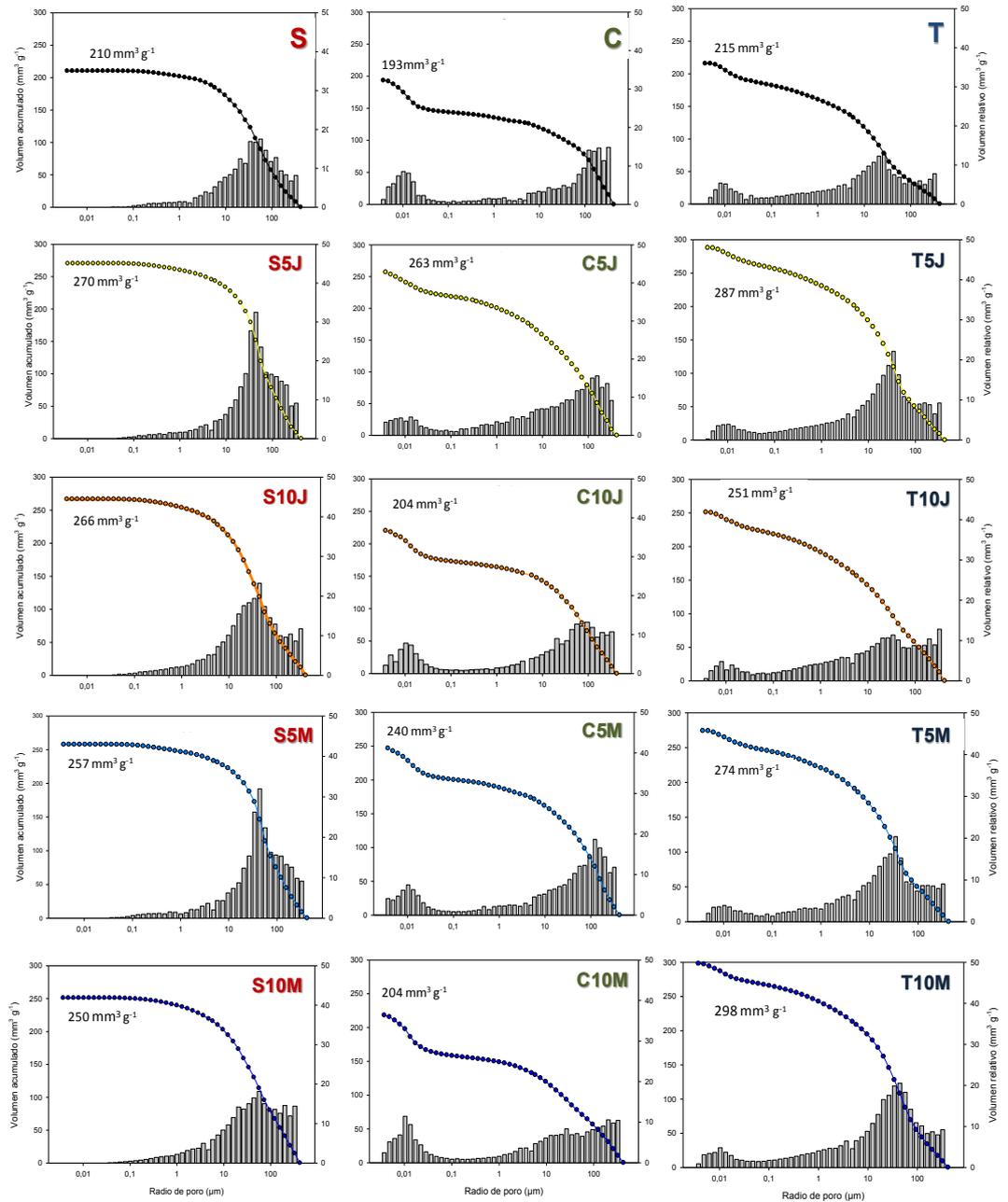


Figura II.14. Volúmenes relativos (histograma) y acumulados (curva) de poro ($\text{mm}^3 \text{g}^{-1}$) para distintos rangos de tamaño de poro de los suelos usados sin enmendar (S, C, T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M). El volumen total de poro (VT) se representa como el número sobre la curva relativa.

II.4.2.1.-Respiración basal

La producción de CO₂ está directamente relacionada con la fracción viva y activa de los suelos (Badalucco et al., 2010), debido a que es resultado de la respiración de los organismos vivos. Para los estudios de respiración basal se seleccionaron los suelos C y T, de mayor contenido en MO (Tabla II.4.), sin enmendar y enmendados al 5% y 10% (p/p) con el alperujo AJ. En la Figura II.15. se muestran los mg de CO₂ producidos por los microorganismos vivos presentes en los suelos tras 42 días de experimento a 24±1 °C y al 40% de humedad del suelo.

Nuestros resultados revelaron que la adición de alperujo no producía un efecto negativo sobre las comunidades vivas de organismos de los suelos C y T (Figura II.15.), por el contrario, la cantidad de CO₂ se veía incrementada con la enmienda.

La MOS parece jugar un papel importante en los procesos de respiración en suelos enmendados, ya que existe una correlación positiva entre el contenido de COS y la producción de CO₂, debido al aumento en el contenido de COS y por tanto de carbono fácilmente utilizable para los microorganismos del suelo, explicando la mayor respiración en éstos (Qualls et al., 2005).

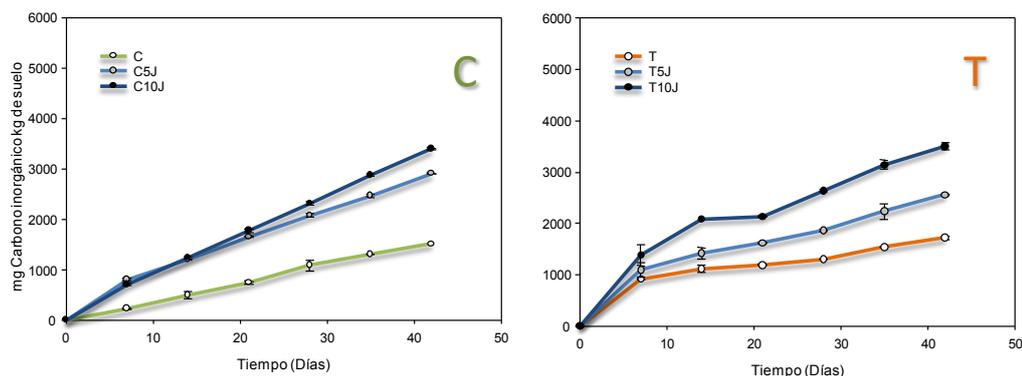


Figura II.15. Producción de CO₂ kg⁻¹ por los microorganismos presentes de suelo C (izquierda) y T (derecha) sin enmendar y enmendados con AJ a las dosis de 5% y 10% (p/p) (C5J, T5J, C10J y T10J).

II.4.3.-Estudios con MCPA

Los estudios con MCPA se realizaron con los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados al 10% (p/p). Se hicieron pruebas previas aplicando al suelo la dosis de 5% de los alperujos y no se obtuvieron diferencias significativas en la adsorción de MCPA respecto al suelo sin enmendar, por lo que los ensayos que se presentan a continuación se realizaron únicamente a la dosis de 10% (p/p) de alperujos.

II.4.3.1.-Estudios de adsorción

Las isotermas de adsorción de MCPA en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados al 10% (p/p) con los alperujos AJ y AM (S, S10J, S10M, C, C10J, C10M, T, T10J y T10M) se muestran en la Figura II.16., donde se representa gráficamente la cantidad de MCPA adsorbido (C_s , $\mu\text{mol kg}^{-1}$) frente a las distintas concentraciones de equilibrio (C_e , μM) de MCPA.

Las isotermas de adsorción de MCPA obtenidas se corresponden con el tipo L según la clasificación de Giles et al. (1960). Esto indica que la adsorción se ve afectada por la concentración del herbicida, al reflejar una alta afinidad relativa entre el soluto y el adsorbente en la fase inicial de la curva, que se ve disminuida a medida que aumenta la concentración de herbicida en solución y los sitios específicos de adsorción van siendo ocupados.

Los correspondientes valores de los parámetros de adsorción tras ajustar las isotermas de adsorción a la ecuación de Freundlich (Ecuación II.5.), se presentan en la Tabla II.7. El ajuste a la ecuación de Freundlich es bueno en general ($R^2= 0.989-0.996$), a excepción del suelo arenoso sin enmendar (S) ($R^2= 0.097$). Esto último se atribuye a falta de precisión asociada a las medidas de adsorción (Green y Yamame, 1970), especialmente en este suelo, donde se adsorbe muy poco. Los coeficientes K_f permiten comparar la capacidad de adsorción de distintos sistemas adsorbato-adsorbente si las condiciones experimentales y los valores de n_f (coeficiente que indica la intensidad de la adsorción) son similares entre ellos para los distintos suelos estudiados.

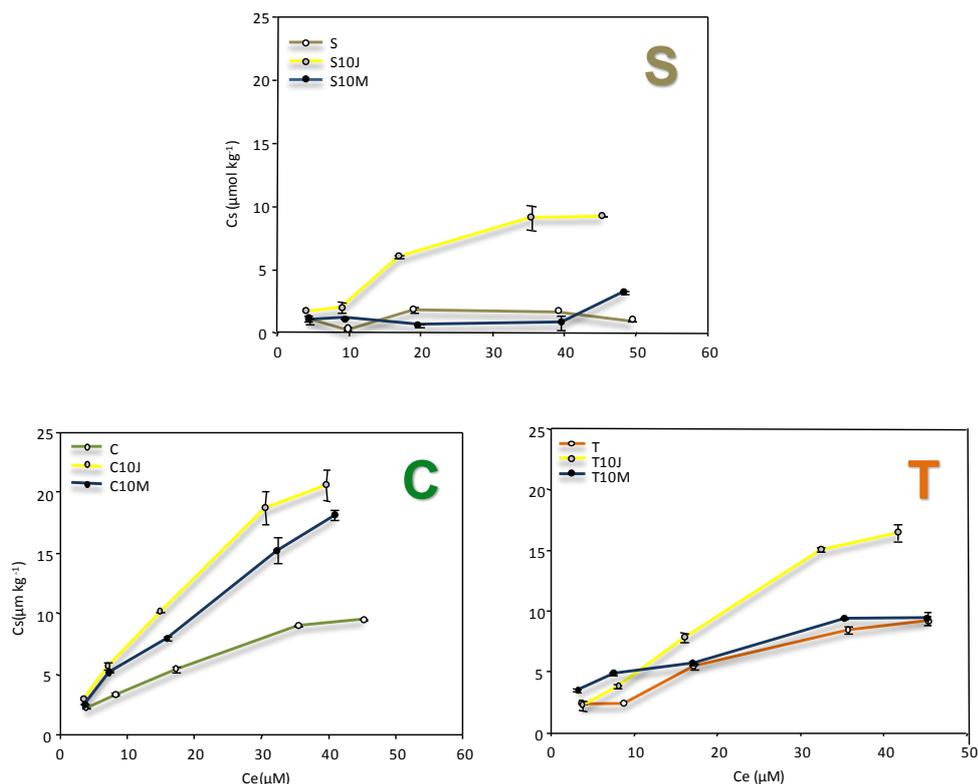


Figura II.16. Isotermas de adsorción de MCPA en los suelos S (arriba), C y T (abajo) sin enmendar y enmendados con AJ o AM al 10% (p/p) (S, S10J, S10M, C, C10J, C10M, T, T10J, T10M).

Los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados muestran baja adsorción de MCPA, presentando valores de $K_{f_{ads}}$ entre 0.440 y 1.12 (Tabla 11.7.). Esto coincide con los resultados obtenidos por Hiller et al. (2009) en un estudio de adsorción de este herbicida en suelos agrícolas sin enmendar y enmendados con cenizas de maíz. Los suelos sin enmendar C y T, de mayor contenido en CO y arcilla, mostraron coeficientes de adsorción ($K_{f_{ads}}$) dos veces mayores para MCPA respecto a S (Tabla II.7.). Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Kah y Brown. (2007), quienes encontraron baja adsorción en suelos de herbicidas de naturaleza ácida como es MCPA, la cual se veía incrementada en los casos de menores pH y elevado contenido en CO. Lo mismo demostraron Socías-Viciano et al. (1999) en un estudio comparativo con MCPA y atrazina en un suelo calcáreo del sureste de Andalucía enmendado con turba.

Tabla II.7. Coeficientes de adsorción de Freundlich para MCPA en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 10% (p/p) con AJ (S10J, C10J y T10J) y con AM (S10M, C10M y T10M).

| | R^2_{ads} | Kf_{ads} ($mg^{-1/nf} kg^{-1} ml^{-1/nf}$) | nf_{ads} | Kd_{25} |
|-------------|-------------|---|---------------|-----------|
| S | 0.097 | 0.440(0.118/1.69)* | 0.591±0.458** | 1.00 |
| S10J | 0.924 | 0.438(0.294/0.652) | 0.827±0.137 | 6.28 |
| S10M | 0.989 | 1.12(0.974/1.29) | 0.915±0.053 | 3.14 |
| T | 0.916 | 0.828(0.602/1.14) | 0.629±0.109 | 6.28 |
| T10J | 0.994 | 0.628(0.563/0.701) | 0.891±0.038 | 11.3 |
| T10M | 0.949 | 0.767(0.578/1.02) | 0.739±0.098 | 8.27 |
| C | 0.996 | 0.898(0.840/0.961) | 0.626±0.023 | 6.73 |
| C10J | 0.996 | 1.04(0.959/1.14) | 0.828±0.031 | 15.3 |
| C10M | 0.991 | 0.883(0.781/0.998) | 0.814±0.054 | 12.1 |

*Los números entre paréntesis son desviaciones estándar respecto a la media

**Los números son medidas de $nf \pm$ desviación estándar.

MCPA es un herbicida de carácter ácido, encontrándose en forma aniónica en la solución de los suelos a pH superiores a 3.73 (Hiller et al., 2009). La repulsión entre la carga negativa de las moléculas de este herbicida y las cargas negativas de los coloides del suelo explicaría su baja adsorción (Hamaker y Thompson, 1972; Hiller et al., 2009; Paszko, 2009). El comportamiento en suelos de los ácidos fenoxiacéticos, como MCPA, está gobernado por su estructura química. El grupo carboxilo (-COOH) es el principal responsable de su relativa actividad química y de las interacciones con las superficies minerales. A los pH habituales en los suelos agrícolas, éste grupo ácido ionizado podría generar una adsorción significativa en los óxidos de hierro, cargados positivamente, favoreciendo fuerzas de Van der Waals entre los anillos aromáticos de MCPA (Iglesias et al., 2009). Como se puede observar en la Tabla II.4., los valores de óxidos de hierro son similares entre sí y muy bajos en los tres suelos estudiados. Por otro lado, el hecho de que los suelos presentaran contenidos bajos en CO (Tabla II.4.), junto con el bajo coeficiente de reparto octanol-agua (Kow) que presenta MCPA (-0.81 a pH 7 y 20 °C), también contribuyen a su alta afinidad por la fase acuosa del suelo y su baja adsorción (Delgado Moreno et al., 2007).

Al enmendar los suelos con AJ y AM no se observaron aumentos importantes de su capacidad adsorción de MCPA, excepto para el suelo S enmendado con AJ, que mostró 2.5 veces más adsorción respecto al suelo sin enmendar (1.12 frente a 0.440). En el caso del suelo T, no se observan diferencias significativas en los suelos enmendados respecto al original (Tabla II.7.). Haberhauer et al. (2001) revelaron que un aumento en el contenido en CO del suelo no implicaba necesariamente un aumento en la adsorción del herbicida y que el número de sitios de adsorción para éste y el contenido en MO del suelo enmendado dependían de la naturaleza de la MO que aportaba la enmienda. Sin embargo, se ha encontrado que MCPA puede llegar a presentar valores de K_d de hasta 16.6 l kg^{-1} en suelos con 15% de MO (Tomlin, 2008), cuando en la mayoría de los suelos agrícolas mediterráneos, con valores de MO entre 1 y 5%, MCPA, los valores de K_d se encuentran entre 0.6 y 1 l g^{-1} , coincidiendo con nuestros resultados. La capacidad adsorbente del alperujo es función de su contenido en MO y de las características de la misma (composición, pH, grado de humificación, etc...) (Karickhoff et al., 1979; Wauchope et al., 2002; Johnston y Tombácz, 2002).

Debido a la variabilidad de los coeficientes n_f de las isothermas de adsorción y para poder comparar la adsorción entre los diferentes suelos, se ha calculado un coeficiente de distribución a la concentración de equilibrio igual a $25 \mu\text{M}$ ($K_{d_{25}}$) (Tabla II.7.), que se encuentra dentro del rango de concentraciones estudiadas para MCPA en las isothermas de adsorción (5, 10, 20, 40 y $50 \mu\text{M}$). A concentraciones altas de MCPA, se observan diferencias entre los tratamientos (Tabla II.7.).

Los valores de $K_{d_{25}}$ revelaron mayor adsorción de MCPA en los suelos sin enmendar C y T. Estos suelos presentaban mayor contenido en CO y arcilla, ambos componentes coloidales del suelo, con alta superficie específica, responsables en gran parte de la adsorción de plaguicidas. La mayor adsorción se dio en suelos enmendados con AJ (S10J, C10J y T10J). Las diferencias en la adsorción entre suelos enmendados con AJ y AM, se deben a diferencias en la calidad de la MO de estos residuos y no a su cantidad. Como se ha visto en el apartado II.4.1. de caracterización de la MOS de los alperujos, aunque el contenido en MO es menor en el caso de AJ (81%, respecto al 91% de AM), las diferencias en la adsorción pueden deberse a que la MO de AJ se encuentra más humificada, y por tanto posee mayor capacidad de adsorción que la de AM (Bolan et al, 2011) y al contrario de lo encontrado por Barriuso et al. (2011), que detectaron mayor

capacidad de adsorción de herbicidas en MOS extraída de residuos orgánicos que presentaban bajo grado de madurez.

II.4.3.2.-Estudios de desorción

En la Figura II.7. se representa las isotermas de adsorción-desorción de MCPA en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados al 10% (p/p) con los alperujos. Los parámetros de desorción se recogen en la Tabla II.8. En ella se ve que en general el ajuste de la ecuación de Freundlich no es bueno para los sistemas con baja capacidad de adsorción (S, S10M y C), que mostraron coeficientes de ajuste muy bajos. Esto es causa de la acumulación de errores debido a la baja adsorción detectada de MCPA (Green y Yamame, 1970).

Tabla II.8. Coeficientes de desorción de Freundlich, porcentaje de desorción (D) y coeficiente de histéresis (H) expresado en porcentaje para MCPA en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados 10% (p/p) con AJ (S10J, C10J y T10J) y con AM (S10M, C10M y T10M).

| | R^2_{des} | Kf_{des} ($mg^{-1/nf} kg^{-1} ml^{-1/nf}$) | nf_{des} | D (%) | H (%) |
|-------------|-------------|---|----------------|----------|----------|
| S | 0.092 | 1.61(1.27/2.03)* | -0.355±0.789** | 86 | 60 |
| S10J | 0.898 | 0.748(0.299/1.87) | 1.28±0.306 | 64 | 45 |
| S10M | 0.575 | 10.2(8.77/11.8) | 0.272±0.052 | 23 | 29 |
| T | 0.908 | 4.10(3.54/4.72) | 0.216±0.048 | 35 | 34 |
| T10J | 0.949 | 4.28(1.80/2.93) | 0.505±0.082 | 60 | 56 |
| T10M | 0.939 | 2.37(0.461/2.77) | 1.20±0.826 | 50 | 162 |
| C | 0.436 | 11.3(9.69/13.1) | -0.066±0.053 | 12 | 10 |
| C10J | 0.932 | 3.73(2.91/4.77) | 0.443±0.084 | 53 | 53 |
| C10M | 0.988 | 0.244(0.188/0.318) | 1.14±0.087 | 84 | 140 |

*Los números entre paréntesis son desviaciones estándar respecto a la media

** Los números son medidas de $nf \pm$ desviación estándar

Los valores calculados de nf_{des} fueron menores que los nf_{ads} para todos los suelos, excepto para S10J y C10M y T10M, lo que revela la presencia fenómenos de histéresis durante la adsorción-desorción. Esto mismo ha sido observado por Haberhauer et al. (2001) y por Jensen et al. (2004). Los valores menores se encontraron para los suelos S y C sin enmendar, pero considerando los coeficientes de ajuste tan bajos, no se puede

concluir que exista ninguna tendencia clara en relación al efecto que ejerce la enmienda sobre la desorción de MCPA. La adición de enmienda en los suelos se ha visto que aumenta la adsorción de MCPA a altas concentraciones en solución para los suelos C y T, y presenta coeficientes de histéresis mayores que los suelos originales, lo cual parece indicar que si bien la enmienda aumenta la adsorción de MCPA, ésta adsorción es más reversible respecto al suelo sin enmendar (Tabla II.8.). El aumento del COS en la solución tras la enmienda con alperujo podría ser la causa de este resultado, ya que ésta podría favorecer la desorción del herbicida retenido en la fase sólida hacia la solución. Flores-Céspedes. (2002) mostraron que la adsorción de imidacloprid en los suelos se veía negativamente afectada por la presencia de MOS en la solución, que favorecía su desorción desde las partículas del suelo, algo que también mostraron Celis et al. (1998) y Barriuso et al. (2011).

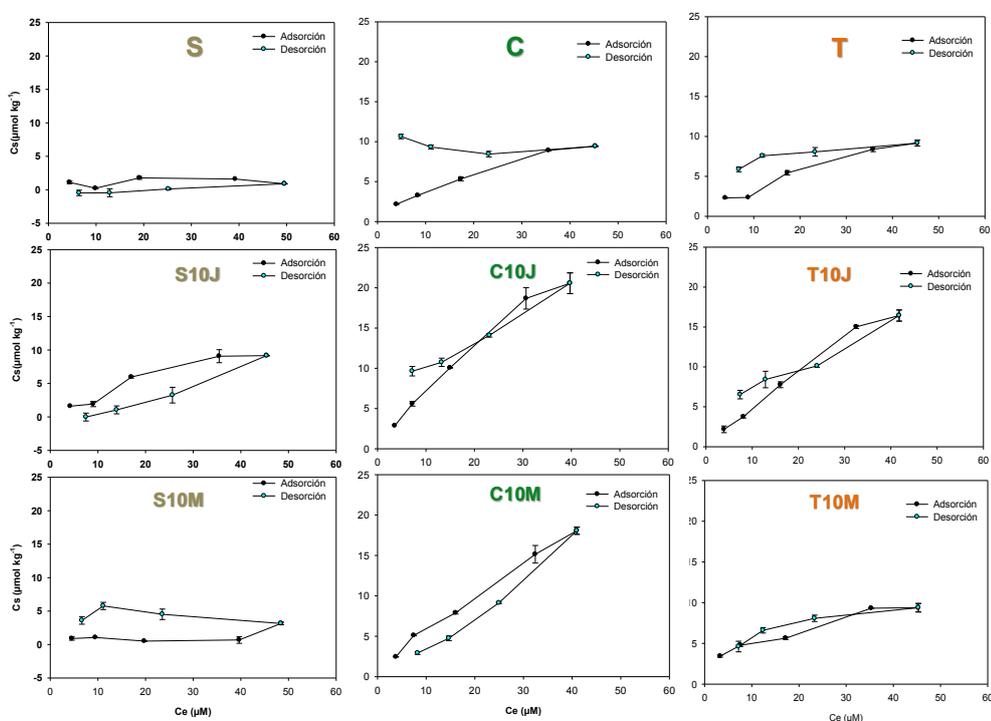


Figura II.17. Isotermas de adsorción-desorción (puntos negros y azules, respectivamente) de MCPA en los suelos S (columna de figuras a la izquierda), C (columna del centro) y T (columna de la derecha) sin enmendar y enmendados con AJ o AM al 10% (p/p) (S, S10J, S10M, C, C10J, C10M, T, T10J y T10M).

II.4.3.3.-Estudios de disipación

Según Crespín et al. (2001), los herbicidas del tipo de los fenoxiácidos como es MCPA, pueden sufrir degradación abiótica como hidrólisis de las sales o ésteres del herbicida, con la formación de los correspondientes aniones o fotodescomposición por absorción de luz ultravioleta, y/o degradación microbológica en la solución del suelo.

En la Figura II.18. se muestran las curvas de disipación de MCPA durante 118 días de incubación a 24 ± 1 °C y 40% de humedad en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados con AJ y AM. En la Tabla II.9. se muestran los valores de vida media en esos suelos tras el ajuste de las curvas de disipación a una cinética de primer orden con la ecuación II.5., según descrito en el apartado II.3.4.3.

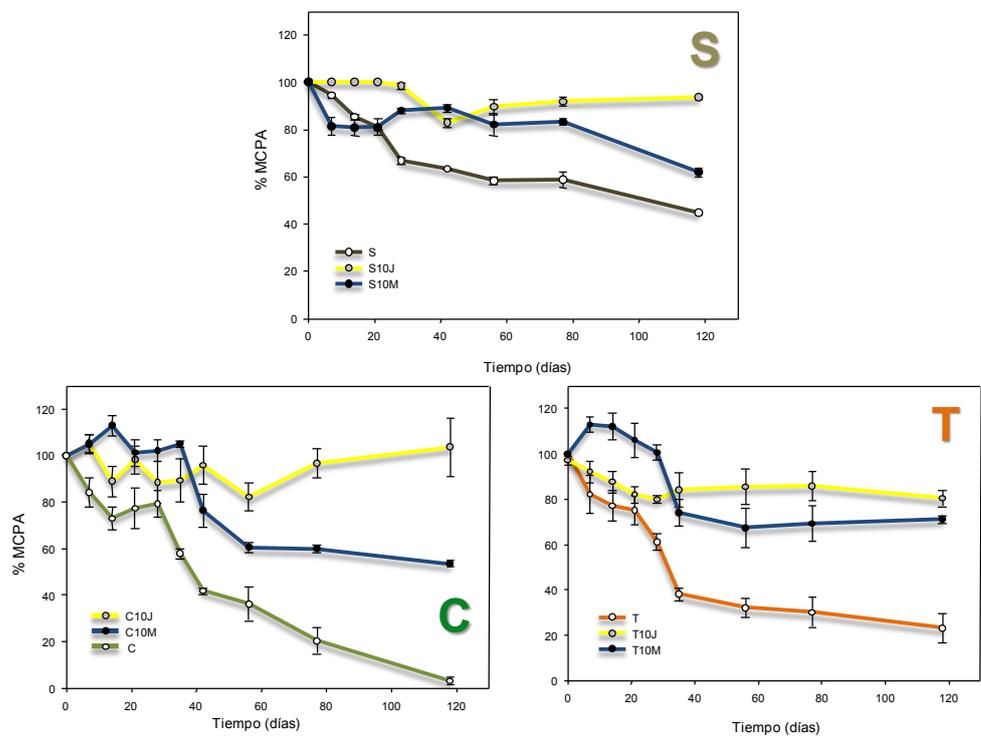


Figura II.18. Curvas de disipación de MCPA en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados con AJ y AM a la dosis del 10% (p/p) (S10J, C10J, T10J, S10M, C10M y T10M).

Cuando se comparan los tres suelos sin enmendar, las $T_{1/2}$ de los herbicidas fueron menores en los suelos de mayor contenido en CO (C y T) (Tabla II.7.), que se explica por una mayor actividad biológica en estos suelos consecuencia del mayor CO, que

favorece la degradación del herbicida mediante procesos bióticos (Figura II.18.). Esto se ha observado en numerosos estudios con diversos plaguicidas (Walker y Welch., 1989; Nair y Schnoor., 1994, Cox et al., 1999) y corrobora los resultados obtenidos por Juhler et al. (2008), los cuales indican que la degradación de MCPA, principalmente en los horizontes superficiales del suelo (Figura I.4.), está directamente relacionada con la microbiología y CO del mismo. Por ello, la forma que describe la curva de degradación del herbicida es sigmoideal, tipo de curva que se relaciona con compuestos que son utilizados como sustrato de crecimiento bacteriano (Kearney et al., 1997). Estas curvas se caracterizan por una primera región en la que la velocidad de degradación es lenta (coincide con la fase de latencia de los organismos del suelo al verse expuestos al factor estresante, que en este caso es el herbicida), seguido de una región de degradación más rápida (McDonald et al., 2006; Stintzing et al., 2006).

Tabla II.9. Coeficientes de ajuste a una cinética de primer orden y vidas medias ($T_{1/2}$) para MCPA en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 10% (p/p) con AJ (S10J, C10J y T10J) y con AM (S10M, C10M y T10M).

| Suelos | S | S10J | S10M |
|------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| R² | 0.901 | 0.249 | 0.564 |
| T_{1/2} | 105 (93.6/121)* | 790 (477/2293) | 274 (205/410) |
| Suelos | C | C10J | C10M |
| R² | 0.935 | 0.056 | 0.758 |
| T_{1/2} | 23.3 (20.6/29.6) | 140 (136/460) | 110 (85.8/153) |
| Suelos | T | T10J | T10M |
| R² | 0.788 | 0.326 | 0.631 |
| T_{1/2} | 31 (25/40) | 725 (489/1586) | 149 (116/209) |

*Los números entre paréntesis son desviaciones estándar respecto a la media

Por el contrario, la adición de los alperujos, a pesar de aumentar el CO de los suelos, aumentó la persistencia de MCPA en los suelos enmendados. Las curvas de

disipación no se ajustan en general, bien a la cinética de primer orden, como muestran los valores de R^2 en la Tabla II.9., especialmente en el caso de los suelos enmendados con AJ, que presentaron una mayor capacidad de adsorción de MCPA que los enmendados con AM, como se observó en los estudios de adsorción (Figura II.6.). Sin embargo, cuando añadimos una fuente exógena de carbono (alperujo) al enmendar, el herbicida se vuelve más persistente, coincidiendo con los resultados obtenidos por Hiller et al., (2009). Esto se puede atribuir, por un lado, al efecto protector que proporciona la mayor adsorción de MCPA en estos suelos enmendados (tal y como se puede ver en la Tabla II.7.), estando el herbicida menos disponible para sufrir procesos de degradación (Barriuso et al., 1997; Cox et al., 2000), pero también puede ser debido a que los microorganismos del suelo prefieran utilizar la MO que proporciona el alperujo, como fuente de carbono, en lugar de degradar el herbicida presente en la disolución del suelo, aumentando así su persistencia. La MOS del alperujo parece constituir una fuente de C más fácilmente accesible a los microorganismos del suelo (Qualls et al., 2005).

II.4.3.4.-Estudios de mineralización

Los resultados de mineralización del herbicida MCPA durante 42 días de incubación a 24 ± 1 °C y 40% de humedad en suelos sin enmendar y enmendados al 5% y 10% (p/p) se presentan en la Figura II.19.

La mayor tasa de mineralización se encontró para los suelos originales, que mostraron menores vidas medias (Tabla II.9.). La adición de alperujo redujo la mineralización del herbicida en todos los suelos estudiados (Figura II.8.), corroborando la alta persistencia de MCPA en los estudios de disipación. La reducción de la mineralización de MCPA pudo ser debida a, como se ha comentado anteriormente, el hecho de que la enmienda aporta CO que resulta más fácilmente accesible para los organismos del suelo que la fuente de carbono que constituye el propio herbicida (Qualls et al., 2005), lo que reduce la mineralización del mismo. Esto coincide con los resultados obtenidos por Albarrán et al. (2003) y Cabrera et al. (2008), en estudios de mineralización de herbicidas del grupo de las triazinas en suelos enmendados con alperujo.

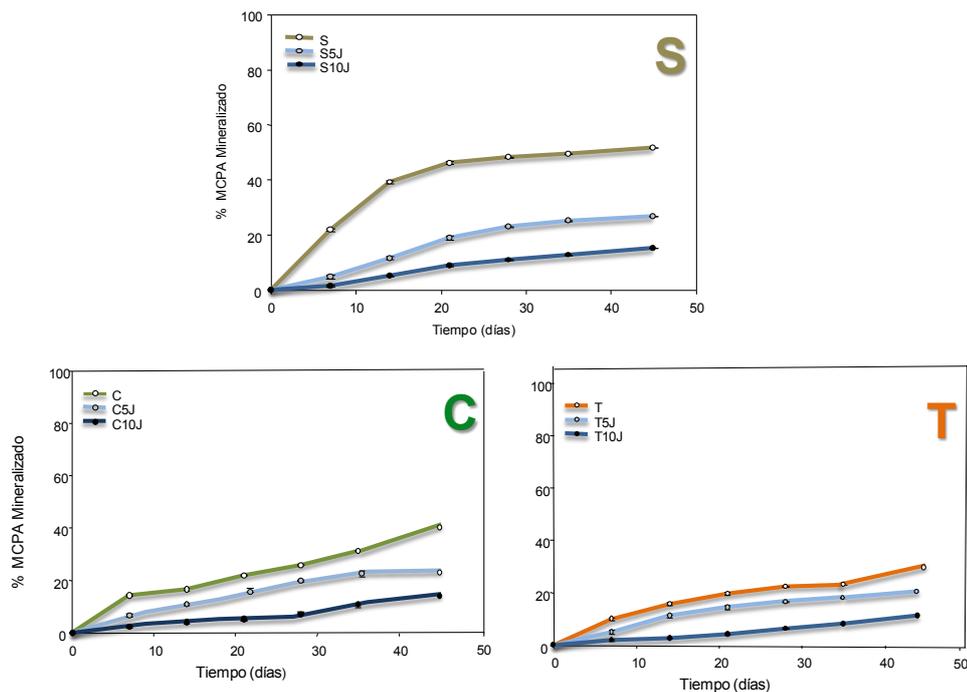


Figura II.19. Curvas de mineralización de MCPA en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados al 5% y 10% con AJ.

II.4.3.5.-Estudios de lixiviación

Las curvas de elución relativa y acumulada de MCPA en los suelos sin enmendar y enmendados al 10% (p/p) con AJ y AM y los porcentajes totales de herbicida se presentan en la Figura II.20.

La posición del máximo relativo de las curvas se encuentra cerca de la unidad de volumen de poro (Figura II.20.), lo que es característico de sistemas de baja adsorción y compuestos altamente móviles (Beck et al., 1993), mientras que los máximos relativos desplazados hacia la derecha de un volumen de poro, son típicos de sistemas de mayor capacidad de adsorción. Las curvas relativas de lixiviación muestran que, en los tres suelos utilizados, MCPA comienza a lixiviar antes en los suelos sin enmendar, alcanzando el máximo de la curva de elución a menor volumen de poro que en caso de los suelos enmendados (Figura II.20.), reflejando que la adición de AJ y AM retienen MCPA al aumentar adsorción (valores K_{d25} , Tabla II.7.) y retrasar con ello su pérdida por lixiviación en el sistema dinámico que constituye el perfil de la columna del suelo. Otros estudios han

revelado que la presencia de mayor MOS procedente de un residuo orgánico en los suelos aumenta la movilidad en la columna de suelo de los compuestos orgánicos (Flores-Céspedes et al., 2002).

La asimetría de las curvas de elución, especialmente en los suelos enmendados, se debe a que no se alcanza el equilibrio en la adsorción de los compuestos orgánicos en los sistemas de suelo-columnas (Beck et al., 1993) y a cambios en la porosidad del suelo tras la enmienda. Como hemos visto en el apartado II.4.2.1., la adición de alperujo a los suelos aumenta el volumen de poros de pequeño tamaño, favoreciendo la difusión del herbicida hacia éstos nuevos poros y retrasando el proceso de lixiviación como consecuencia (Tabla II.6.).

Las cantidades máximas lixiviadas tanto en los suelos sin enmendar como en los enmendados fueron más bajas en el suelo C, que mostró los mayores $K_{f_{ads}}$, a pesar de que su contenido en CO inicial era menor que el de T (Tabla II.5.). Este suelo tiene un alto contenido en arcillas (59 %), del que en torno al 27%, son montmorillonitas, a diferencia del otro suelo arcilloso (T), que también presentó un alto contenido en arcillas (48%), de las que fundamentalmente la mayoría (88%) eran Illita-mica (Tabla II.5.). Este alto contenido en montmorillonita, arcilla expansiva, puede dar lugar a un movimiento más lento del agua a través de la columna de suelo, favoreciendo los procesos de degradación, adsorción y entrapamiento físico al herbicida (Pignatello y Xing, 1996), explicando los menores porcentajes lixiviados totales encontrados para C (Figura II.20.).

Salvo en el caso del suelo T, los porcentajes de MCPA eluidos (totales acumulados, Figura II.20.) eran más bajos en los suelos sin enmendar, lo cual se puede atribuir a la mayor persistencia de MCPA en suelos enmendados, donde la MO protege de la degradación al herbicida, como han puesto de manifiesto los estudios de disipación (Apartado II.4.3.4.). Aunque MCPA empieza a lixiviar antes en el suelo sin enmendar T y el máximo de lixiviación tiene lugar a pequeño volumen de poro (Figura II.10.), las cantidades lixiviadas totales son similares en el caso del suelo enmendado con AM, y mucho menores en el suelo enmendado con AJ (85% y 69%, para T y T10M, respecto al 48% de T10J), a pesar de la mayor persistencia de MCPA en ambos suelos enmendados (Tabla II.9.). Por el contrario, estos valores están de acuerdo con la mayor adsorción de MCPA en suelos enmendados, especialmente en el suelo enmendado con AJ. Durante el transcurso de este estudio de lixiviación, prevalecen los procesos de adsorción frente a los

de degradación. En el suelo arcilloso C, debido a su alto contenido en montmorillonita, el tiempo de contacto entre el herbicida y las partículas de suelo es mayor que para S y T, de forma que tanto los procesos de adsorción como los de degradación se pueden ver favorecidos. Los resultados obtenidos con el suelo T están de acuerdo con los presentados por Cox et al. (1997) y Albarrán et al. (2004), los cuales encontraron también una reducción en la lixiviación al enmendar que atribuyeron al aumento en la adsorción y a una disminución de porosidad.

Una vez finalizado el experimento de lixiviación, se realizó la extracción del herbicida residual en el suelo de las columnas empaquetadas a mano según la metodología descrita en el apartado II.3.4.3. No se detectó MCPA en ninguno de los fragmentos de ningún suelo estudiado, por lo que podemos asumir que todo el herbicida que no es lixiviado o se ha degradado o está fuertemente retenido por el suelo. Esto segundo es poco probable, como se ha visto en los resultados de los experimentos de adsorción-desorción de MCPA, que revelaron la baja adsorción y alta reversibilidad de la misma para este herbicida. Como se ha discutido anteriormente, esta mayor reversibilidad de la adsorción puede deberse a una mayor afinidad del herbicida hacia la MOS presente en solución (Barriuso et al., 2011). Se sabe que la MOS constituye la fracción de carbono lábil, que actúa como sustrato fácil para los microorganismos, así como reservorio a corto plazo de nutrientes para plantas (Romero et al., 2005) y es indicativo de la actividad potencial de microorganismos en suelos naturales y de cultivos. Las moléculas de MCPA disueltas en esta fracción serían fácilmente degradadas por los microorganismos de la solución.

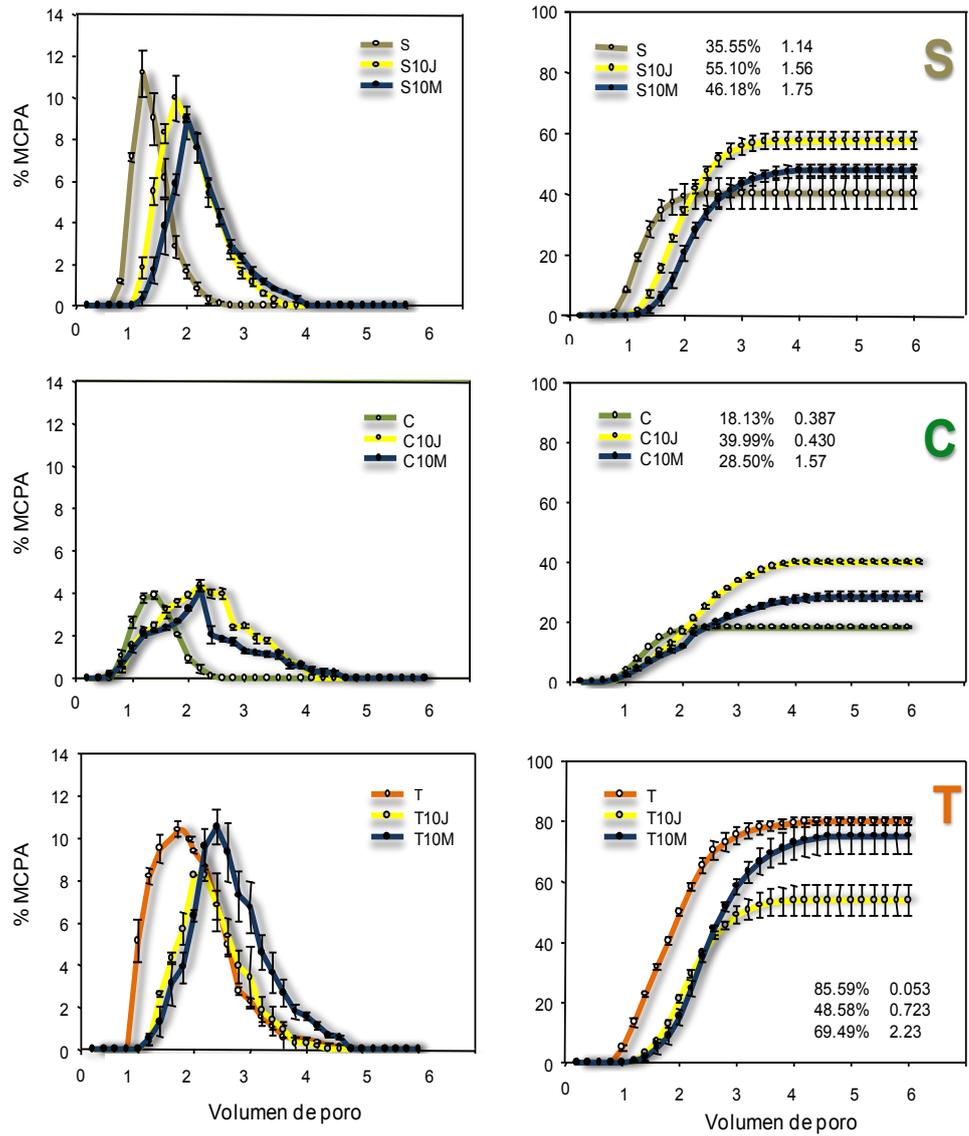


Figura II.20. Curvas de elución relativa (izquierda) y acumulada (derecha) de MCPA en los suelos sin enmendar y enmendados con AJ y AM al 10% (p/p). Los porcentajes totales eluidos y sus errores respecto a la media, se muestran junto a las curvas acumuladas.

II.4.3.6.-Bioensayo

Para comprobar que la eficiencia biológica del herbicida MCPA no se ve afectada por la adición de enmienda al suelo, se llevó a cabo un bioensayo con semillas de *Lepidium sativum* L., (berro) una planta sensible a la acción del herbicida.

La Figura II.21. muestra el estado de crecimiento de las plantas de berro en las macetas por triplicado con los distintos tratamientos: Control (sin herbicida y sin alperujo), MCPA (sólo herbicida), MCPA+AJ (suelo enmendado con MCPA+AJ) y AJ (suelo enmendado con AJ), 20 días tras la siembra y en la Figura II.22. se representa la biomasa recogida de la planta al finalizar el experimento. Puesto que el interés de este estudio es comprobar la eficacia del herbicida en presencia cuando es retenido por el suelo y está menos disponible en la solución del mismo. El suelo que se seleccionó para estos estudios fue el suelo C y el alperujo AJ, ya que en los estudios de adsorción mostraron los mayores coeficientes de adsorción (Tabla II.7.).



Figura II.21. Resultados del bioensayo con *Lepidium sativum* L. Efecto de la adición de alperujo sobre la fitotoxicidad de MCPA.

En las macetas con el herbicida MCPA, no germinaron las semillas tras 20 días de estudio (Figuras II.21. y II.22.). Aunque el herbicida MCPA se encuentra más retenido por las partículas del suelo enmendado con AJ, como se puede ver en la Figura II.16, ésta mayor adsorción no afecta a su capacidad de actuar sobre la germinación de *Lepidium sativum* L., cuyas semillas no germinan en las macetas que fueron tratadas MCPA y AJ (MCPA+AJ) (Figura II.22.). Esto es indicativo de que la adición de alperujo no reduce la efectividad del herbicida sobre la planta sensible, si bien, mejora las propiedades del suelo, como su estructura, contenido en CO y actividad microbiológica (Tabla II.4.).

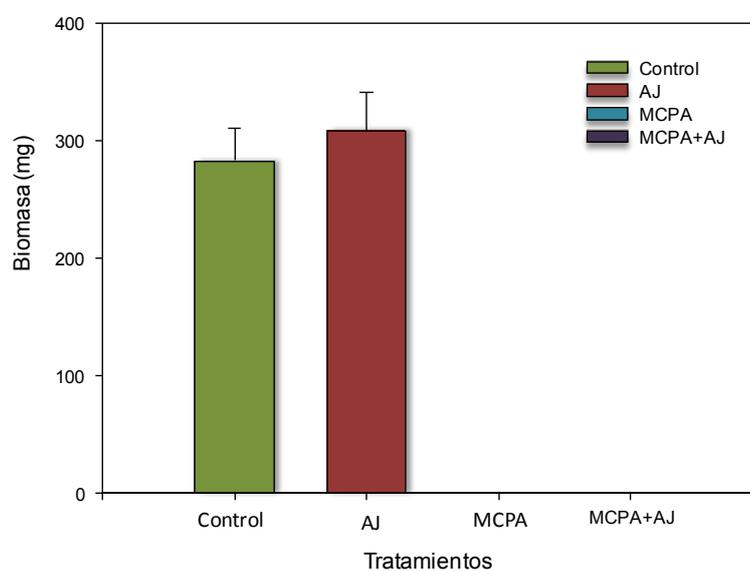


Figura II.22. Histograma de biomasa recolectada tras el estudio de bioensayo con las macetas de *Lepidium sativum* L. tratadas con alperujo, con MCPA, por separado y en combinación y en macetas sin tratar (control).

II.4.4.-Estudios con S-metolacloro

Los estudios de adsorción-desorción, lixiviación y disipación con S-metolacloro se realizaron, tal y como se detalla en el apartado II.3.4.1., con los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados tanto con AJ como con AM al 10% (p/p), al igual que en los estudios con MCPA, y además al 5% (p/p) de enmienda.

II.4.4.1.-Estudios de adsorción

Las isotermas de adsorción de S-metolacloro en los suelos estudiados se muestran en la Figura II.23., donde se representa gráficamente la cantidad de S-metolacloro adsorbida (C_s ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)) frente a las distintas concentraciones de equilibrio (C_e ($\mu\text{M l}^{-1}$)). Los correspondientes parámetros de adsorción se reflejan en la Tabla II.10., tras ajustar las isotermas a la ecuación de Freundlich (Ecuación II.3.). Debido a la variabilidad en los valores de n_f y con el objetivo de comparar la capacidad de adsorción de los distintos suelos, se calculó un coeficiente de distribución a la concentración de equilibrio igual a $10 \mu\text{M}$ (K_{d10}), que se encuentra dentro del rango de concentraciones estudiadas para S-metolacloro en las isotermas de adsorción (5, 10, 20, 40 y $50 \mu\text{M}$).

A diferencia de MCPA, que mostró isotermas tipo L, la mayoría de las isotermas de S-metolacloro son de reparto constante o C ($n_f \sim 1$) (Giles, 1960). Esto indica que, en el rango de concentraciones estudiadas, la adsorción no se ve afectada por la concentración del herbicida, es decir, ocurre un reparto constante entre la fase acuosa y orgánica del adsorbente. Los suelos sin enmendar mostraron menor capacidad de adsorción de S-metolacloro que los enmendados, aunque mayor que para el caso de MCPA (Tablas II.7. y II.10.). No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de adsorción de los suelos S y C, mientras que el suelo T mostró ligeramente una mayor capacidad adsorptiva. Los valores de K_{d10} para S-metolacloro en los suelos sin enmendar, no mostraron diferencias significativas entre ellos (Tabla II.10.).

Los suelos enmendados mostraron un aumento claro en la adsorción de S-metolacloro a diferencia de lo encontrado con MCPA. S-metolacloro es un herbicida cuya capacidad de adsorción a los suelos se afecta, en general, por la presencia de componentes coloidales del mismo, tanto inorgánicos (minerales de arcilla) como orgánicos (CO), tal y como se ha confirmado en estudios previos con el producto racémico

metolacloro y con S-metolacloro (Torrents y Jayasundera, 1997; Weber et al., 2003; Shaner et al., 2006).

Tabla II.10. Coeficientes de adsorción de Freundlich para S-metolacloro en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M).

| | R^2_{ads} | Kf_{ads} ($mg^{-1/nf} kg^{-1} ml^{-1/nf}$) | nf_{ads} | Kd_{10} |
|-------------|-------------|---|--------------|-----------|
| S | 0.993 | 1.00(0.871/1.14)* | 1.05±0.052** | 12.2±1.12 |
| S5J | 0.979 | 2.33(2.01/2.78) | 1.12±0.032 | 10.9±1.46 |
| S10J | 0.959 | 7.59(6.30/9.13) | 0.973±0.115 | 16.9±2.03 |
| S5M | 0.994 | 1.84(1.25/2.19) | 1.09±0.098 | 10.2±1.30 |
| S10M | 0.979 | 5.38(5.62/6.254) | 1.03±0.085 | 15.9±2.51 |
| C | 0.964 | 1.13(0.832/1.54) | 1.10±0.122 | 13.7±1.84 |
| C5J | 0.978 | 1.15(0.92/1.43) | 1.00±0.102 | 16.1±2.20 |
| C10J | 0.987 | 7.68(6.01/8.69) | 1.39±0.287 | 41.0±6.53 |
| C5M | 0.992 | 2.59(2.06/2.89) | 1.12±0.083 | 15.2±1.86 |
| C10M | 0.984 | 10.0(9.05/11.05) | 1.05±0.053 | 16.7±2.13 |
| T | 0.987 | 1.57(1.32/1.84) | 1.05±0.068 | 12.9±1.41 |
| T5J | 0.991 | 2.68(2.44/3.04) | 1.14±0.123 | 11.9±1.79 |
| T10J | 0.934 | 3.85(2.77/5.35) | 1.28±0.196 | 22.9±3.14 |
| T5M | 0.987 | 3.05(2.72/3.68) | 1.09±0.158 | 11.5±2.13 |
| T10M | 0.975 | 5.85(4.97/6.88) | 1.03±0.095 | 16.6±2.71 |

*Los números entre paréntesis son desviaciones estándar respecto a la media

** Los números son medidas de $nf \pm$ desviación estándar

El aumento en la adsorción es más intenso a dosis más altas de alperujo, revelando que en estos suelos, el efecto que produce sobre estos procesos el componente orgánico, es más importante que el componente inorgánico. El estudio de Weber et al. (2003), donde se compara la adsorción y movilidad del producto racémico metolacloro en cinco suelos procedentes del sur de Inglaterra, revela una mayor correlación de estos componentes orgánicos del suelo con la adsorción del herbicida metolacloro respecto a los componentes inorgánicos, lo que corrobora los resultados aquí presentados.

Los valores más altos de adsorción se dan al enmendar el suelo arenoso con AJ al 10%, alperujo de mayor HIX (9.5) y COS, mientras que fue la adición de AM la que más aumentó la adsorción en C y T (Tabla II.10.). A altas concentraciones del herbicida (K_{d10}), es AJ la enmienda que mayor adsorción produce en los tres suelos usados (Tabla II.10.) al igual que ocurre para MCPA (K_{d25} , Tabla II.7.). Esta diferente adsorción en suelos enmendados con alperujos de contenido en CO similar (81 y 91%) pone de manifiesto, al igual que en el caso de MCPA, la importancia de la naturaleza de la materia orgánica exógena (Cox et al., 1995, 2000). El distinto grado de asociación de la materia orgánica con los componentes coloidales del suelo, lo que depende de tanto las propiedades de las enmiendas como de la naturaleza coloidal del suelo (Celis et al., 1999; Cox et al., 2000), también puede influir en las diferencias en la adsorción.

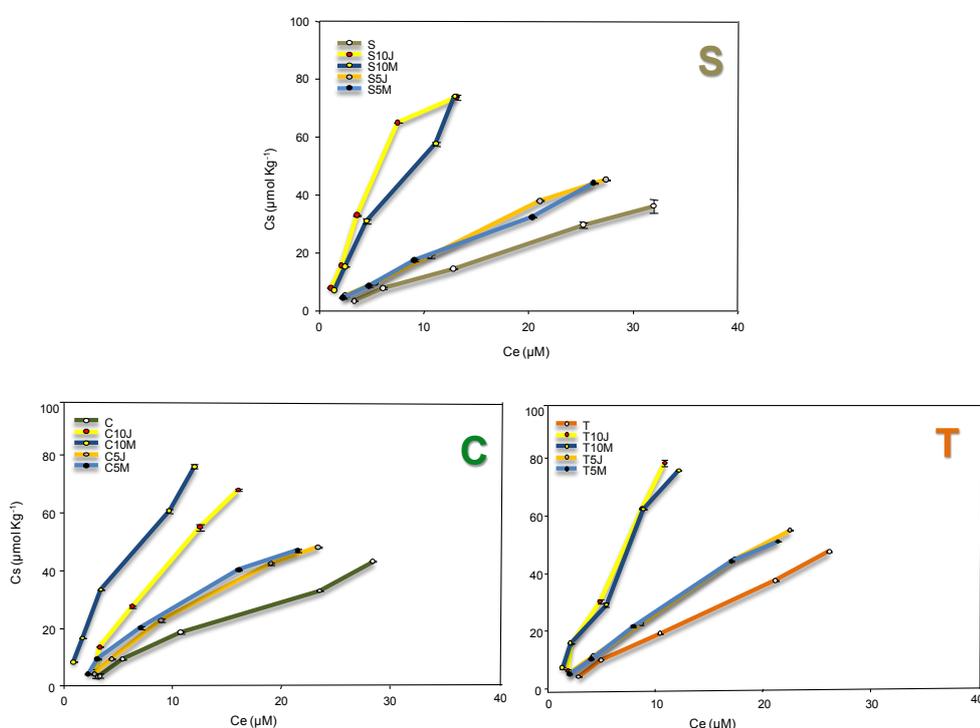


Figura II.23. Isothermas de adsorción de S-metolaclo-ro en los suelos S (arriba), C y T (abajo) sin enmendar y enmendados con AJ o AM al 5% y 10% (p/p) (S5J, S10J, S5M, S10M, C5J, C10J, C5M, C10M, T5J, T10J, T5M y T10M).

II.4.4.2.-Estudios de desorción

En la Figura II.24. se han representado las isothermas de adsorción-desorción de S-metolaclo en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados con AJ y AM al 5% y 10% (p/p). Los parámetros de desorción se recogen en la Tabla II.11.

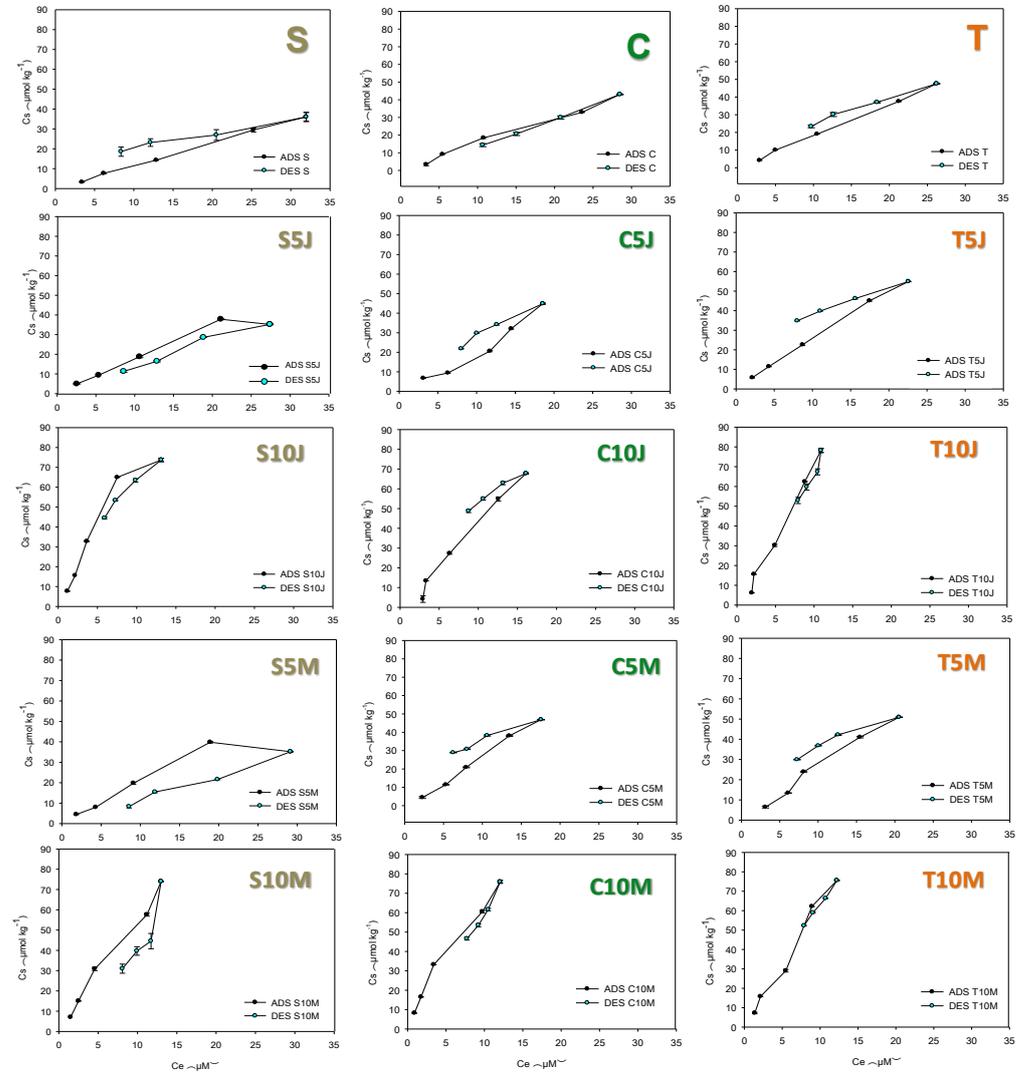


Figura II.24. Isothermas de adsorción y desorción de S-metolaclo en los suelos S (izquierda), C (centro) y T (derecha) sin enmendar y enmendados al 5% y 10% con AJ y AM.

El ajuste de la ecuación de Freundlich fue mucho mejor que el obtenido para el herbicida MCPA (Tabla II.6.), tal y como muestran los coeficientes de ajuste calculados. La desorción de S-metolacloro es irreversible en los suelos S y T, que mostraron coeficientes de adsorción n_{fads} mayores que los n_{fdes} (Tablas II.6. y II.11.) lo cual es indicativo de fenómenos de histéresis (Seybold y Merseil, 1996), mostrando coeficientes de histéresis mayores en los suelos enmendados respecto a los no enmendados. En el caso del suelo C ocurrió al contrario, encontrándose valores de n_{fdes} mayores que n_{fads} a excepción de C5J, C10J y C5M (Tabla II.11.). Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Cox et al. (1997) y Koskinen et al. (2006), que encontraron mayores H en sistemas altamente adsorbentes, y puede ser debido a la diferente capacidad adsorbente de la materia orgánica del suelo y a la materia orgánica exógena. A diferencia de MCPA, la adición de enmienda no favorece la desorción de S-metolacloro hacia la solución del suelo.

Tabla II.11. Coeficientes de desorción de Freundlich, porcentaje de desorción (D) y coeficiente de histéresis (H) para S-metolacloro en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M).

| | R^2_{des} | Kf_{des} ($mg^{-1/nf} kg^{-1} ml^{-1/nf}$) | nf_{des} | D (%) | H (%) |
|-------------|-------------|---|---------------|----------|----------|
| S | 0.976 | 6.98(6.05/8.05)* | 0.465±0.051** | 48.3 | 44.5 |
| S5J | 0.989 | 6.08(6.18/7.20) | 0.680±0.111 | 44.2 | 55.5 |
| S10J | 0.987 | 15.2(13.7/16.9) | 0.619±0.049 | 39.6 | 63.6 |
| S5M | 0.991 | 8.2(7.76/8.84) | 0.496±0.085 | 20.4 | 46.1 |
| S10M | 0.960 | 20.6(17.5/24.4) | 0.489±0.070 | 21.5 | 47.6 |
| C | 0.999 | 0.996(0.952/1.04) | 1.12±0.016 | 66.7 | 102 |
| C5J | 0.987 | 4.25(3.15/5.21) | 1.02±0.026 | 42.9 | 68.3 |
| C10J | 0.987 | 14.9(13.3/16.6) | 1.03±0.036 | 28.1 | 39.7 |
| C5M | 0.993 | 16.9(16.1/17.2) | 1.11±0.236 | 38.2 | 82.7 |
| C10M | 0.975 | 4.42(3.51/5.82) | 1.08±0.122 | 38.5 | 131 |
| T | 0.981 | 4.98(5.75/6.36) | 0.692±0.051 | 50.9 | 65.6 |
| T5J | 0.989 | 6.45(5.65/6.96) | 0.895±0.121 | 35.1 | 82.5 |
| T10J | 0.992 | 7.61(6.93/8.35) | 0.934±0.041 | 30.9 | 73.0 |
| T5M | 0.999 | 8.28(8.02/8.49) | 0.982±0.062 | 45.2 | 74.1 |
| T10M | 0.996 | 9.61(8.80/10.5) | 0.820±0.038 | 30.8 | 79.4 |

*Los números entre paréntesis son desviaciones estándar respecto a la media**Los números son medidas de $nf \pm$ desviación estándar.

II.4.4.3.-Estudios de disipación

En la Figura II.25. se muestran las curvas de disipación de S-metolaclopro tras 135 días de incubación a 24 ± 1 °C y 40% de la capacidad máxima de retención de agua en los suelos sin enmendar y enmendados. En la Tabla II.12. se muestran los valores de vida media ($T_{1/2}$) de S-metolaclopro en esos suelos tras el ajuste de las curvas de disipación a una cinética de primer orden (Ecuación II.5.).

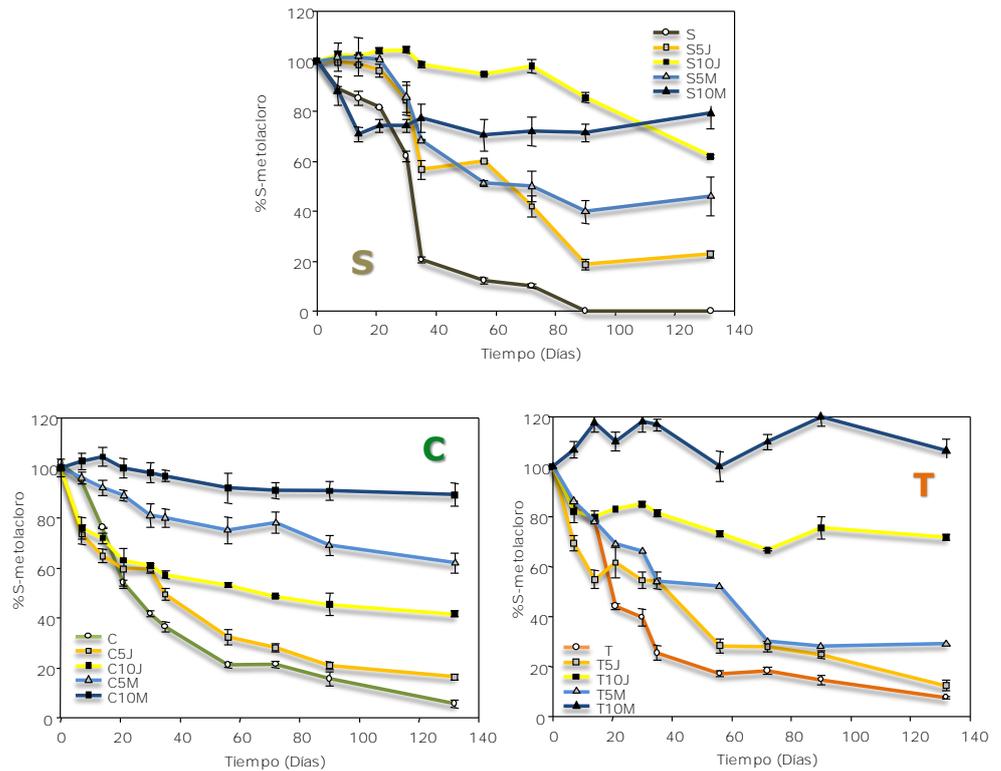


Figura II.25. Curvas de disipación de S-metolaclopro en los suelos S (arriba), C y T (abajo) sin enmendar y enmendados con AJ y AM a la dosis del 5% y 10% (p/p) AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M).

Tabla II.12. Coeficientes de ajuste a una cinética de primer orden y Vidas medias ($T_{1/2}$) para S-metolacloro en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, 10M, C5M, C10M y T5M y T10M).

| Suelos | S | S5J | S10J | S5M | S10M |
|------------------------|----------------|---------------|--------------------|------------------|--------------------|
| R² | 0.988 | 0.979 | 0.797 | 0.911 | 0.799 |
| T_{1/2} | 31 (24/39)* | 67 (59/76) | 149 (128/162) | 71 (62/89) | 178 (113/199) |
| Suelos | C | C5J | C10J | C5M | C10M |
| R² | 0.948 | 0.978 | 0.968 | 0.766 | 0.568 |
| T_{1/2} | 19 (11/29) | 39 (29/46) | 47 (38/59) | 158 (112/187) | 1752 (223/2639) |
| Suelos | T | T5J | T10J | T5M | T10M |
| R² | 0.986 | 0.991 | 0.679 | 0.989 | 0.599 |
| T_{1/2} | 21 (16/32) | 41 (36/48) | 1500 (345/2352) | 58 (42/71) | 121 (76/291) |

*Los números entre paréntesis son desviaciones estándar respecto a la media

La persistencia de S-metolacloro en los suelos se ve afectada por la actividad microbiana así como por la naturaleza e intensidad de las interacciones entre el herbicida y las partículas del suelo (Pignatello et al., 1991; Shaner et al., 2006). En este estudio, al igual que se ha encontrado para MCPA, S-metolacloro mostró menor persistencia en los tres suelos estudiados sin enmendar (Fig.II.15.), describiendo curvas de disipación de tipo sigmoidales, características de procesos de degradación de sustratos microbianos (Figura II.4.). La menor capacidad de adsorción de estos suelos sin enmendar favorece que el herbicida en solución se encuentre más disponible para los procesos de degradación. No se encontraron diferencias significativas en la vida media del herbicida entre los 3 suelos originales (Tabla II.12.), que fueron similares a las encontradas en los estudios de O'Connell et al. (1998) y también por Shaner et al. (2006).

La adición de enmienda produjo un aumento importante en la persistencia del herbicida en los tres suelos, siendo mayor a la dosis más alta de enmienda (10% (p/p)). La alta persistencia de los suelos S10M, C10J, C10M y T10M, hizo que sus curvas de disipación, no se ajustaran bien a una cinética de primer orden (Ecuación II.5.), de ahí la variabilidad tan alta en las vidas medias encontradas (Tabla II.12.). Al contrario que con

MCPA, no se observan diferencias significativas en la persistencia de S-metolacloro entre los dos tipos de residuos.

II.4.4.4.-Estudios de lixiviación

En la Figura II.26. se muestran las curvas de elución relativas y acumuladas de S-metolacloro en los suelos sin enmendar y enmendados con AJ y AM al 5% y 10% (p/p).

Los bajos máximos relativos alcanzados en las curvas de lixiviación relativas corroboran que la retención del herbicida es más intensa que la encontrada para el herbicida aniónico MCPA, tanto por los suelos sin enmendar, como en los enmendados (Figuras II.10. y II.26.). En el caso de los tres suelos sin enmendar, las diferencias en el potencial de lixiviación fueron mucho mayores que las encontradas para MCPA. Esto es debido a que C y T presentan mayor contenido en MO y arcilla, componentes determinantes en la adsorción de S-metolacloro (Shaner et al., 2006) y no para MCPA (Buss et al., 2006).

El comienzo de lixiviación de S-metolacloro se ve retrasado en los suelos C y T, si se compara con el suelo S, lo que se atribuye al mayor contenido CO y arcillas de los primeros, y por tanto, mayor capacidad de retención de los primeros. Sin embargo, los coeficientes de adsorción reflejaron sólo un pequeño incremento en C y un incremento algo mayor para T, respecto a S (Tabla II.10.). La curva de elución de S-metolacloro en el suelo arenoso presentó una forma más simétrica que la de los suelos C y T, mostrando además, un máximo relativo mucho mayor (5.5%, frente a 0.6% y 1.6%, respectivamente), (Figura II.26.). Esto se puede explicar por la menor capacidad de adsorción de S-metolacloro de este suelo de textura más gruesa menor CO, respecto a los otros dos suelos (Figura II.26.).

La adición de alperujo a todos los suelos retrasó la lixiviación de S-metolacloro respecto a los suelos originales, corroborando el aumento de la capacidad de adsorción de éstos al enmendar tanto a la dosis de 5% como al 10% (p/p) (Tabla II.10.). No se encontraron diferencias significativas únicamente en la adsorción de los suelos C y C5J, aunque éste último mostrara un retraso en la lixiviación (Figura II.26.). El retraso en la lixiviación al enmendar fue mucho más intenso para el suelo S, que mostró un máximo de elución 2.6 veces menor para los suelos enmendados al 5% y de hasta 18 veces menor para los enmendados al 10%. Los suelos C10M y T5M, T10M no lixiviaron herbicida, que se

explica por los altos K_{fads} encontrados para C10M y T10M (10 y 5.85, respectivamente), mientras que por el contrario, C5M y T5M no lixiviaron y mostraron K_{fads} mucho menores.

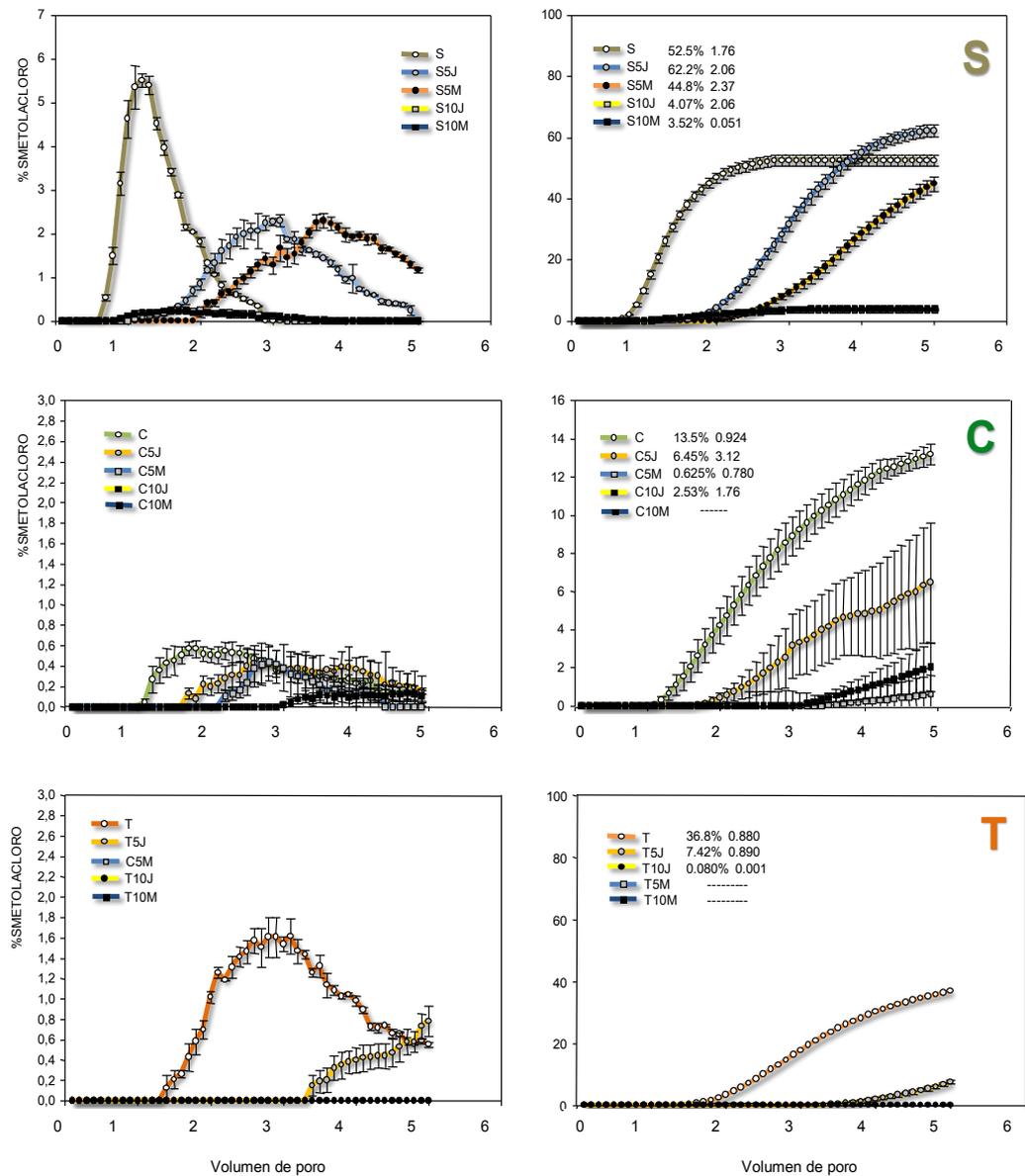


Figura II.26. Curvas relativas de lixiviación (izquierda) y acumuladas (derecha) para S-metolaclo-ro en los suelos sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S5J, S10J, C5J, C10J, T5J y T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M y T10M).

Al contrario de lo encontrado para MCPA, que mostró mayor porcentaje acumulado en los suelos en los suelos S y C sin enmendar, respecto a los enmendados, lo que se atribuyó a la menor retención del herbicida en estos sistemas y por ello, una mayor exposición a fenómenos de degradación (Figura II.20.), los porcentajes totales acumulados de S-metolaclo-ro en los suelos originales fueron más altos que los suelos enmendados, a excepción del suelo T.

Los procesos de lixiviación se pueden ver afectados por diversos factores, entre ellos la naturaleza del herbicida, la cantidad y calidad del CO o del COS y la porosidad del suelo, como factores más determinantes. Los resultados del estudio de lixiviación con S-metolaclo-ro revelan que el factor más determinante en la retención y el patrón de lixiviación de este herbicida es el contenido en CO, y no la porosidad del suelo, ya que el aumento de volumen de poro al enmendar los suelos (Tabla II.5. y Figura II.4.) no se tradujo en un aumento en la lixiviación, sino que al contrario, la lixiviación de S-metolaclo-ro se ve fuertemente reducida e incluso a veces, no ocurre lixiviación en las condiciones de este estudio, como se vio en los suelos C10M, T5M y T10M (Figura II.26.). El suelo S, de textura arenosa, lixivió el mayor porcentaje total de los tres suelos (52%, Tabla II.13.), frente al 13.5% y 36.8% de los suelos C y T. Las diferencias en la lixiviación total se atribuyen a la diferente textura de los suelos: la mayor cantidad de poro de gran tamaño en el suelo S, facilita la movilidad del herbicida por el perfil del suelo, reduciendo el tiempo de permanencia de éste en el suelo (tras 30 días de estudio, cesa la lixiviación del herbicida), y como consecuencia, minimizando los procesos de adsorción y degradación.

Tras 50 días de estudio de movilidad en columnas del herbicida, se extrajo el herbicida residual retenido en el suelo dividiéndose la columna en 4 fragmentos de profundidades: 0-5, 5-10, 10-15 y 15-20 cm. El porcentaje extraído de S-metolaclo-ro residual a distintas profundidades, se recoge en el gráfico que describe la Figura II.27.

Aunque los suelos originales S, C y T no mostraron diferencias significativas en la capacidad de adsorción del herbicida, y tampoco en su persistencia en el suelo (Tablas II.10. y II.12.), sí mostraron diferencias en el balance de masas calculado tras el estudio de lixiviación. La extracción del suelo S, no reveló cantidades cuantificables de S-metolaclo-ro residual a diferencia de C y T (Figura II.27). La Figura II.27. muestra en general, mayor porcentaje que recuperación de herbicida en los suelos S y T. La menor recuperación total

de S-metolacloro en C y T, respecto a S (24 y 46% respecto a 52%, Tabla II.13.), se debe a que el herbicida permanece más tiempo en la columna de suelo (50 d) y los procesos de degradación fueron mayores respecto al suelo arenoso. El suelo C, de mayor contenido de la arcilla expansiva montmorillonita, y volumen de poro menor de los tres suelos estudiados, presentó el menor porcentaje de recuperación (24%) (Tabla II.13. y Figura II.27.).

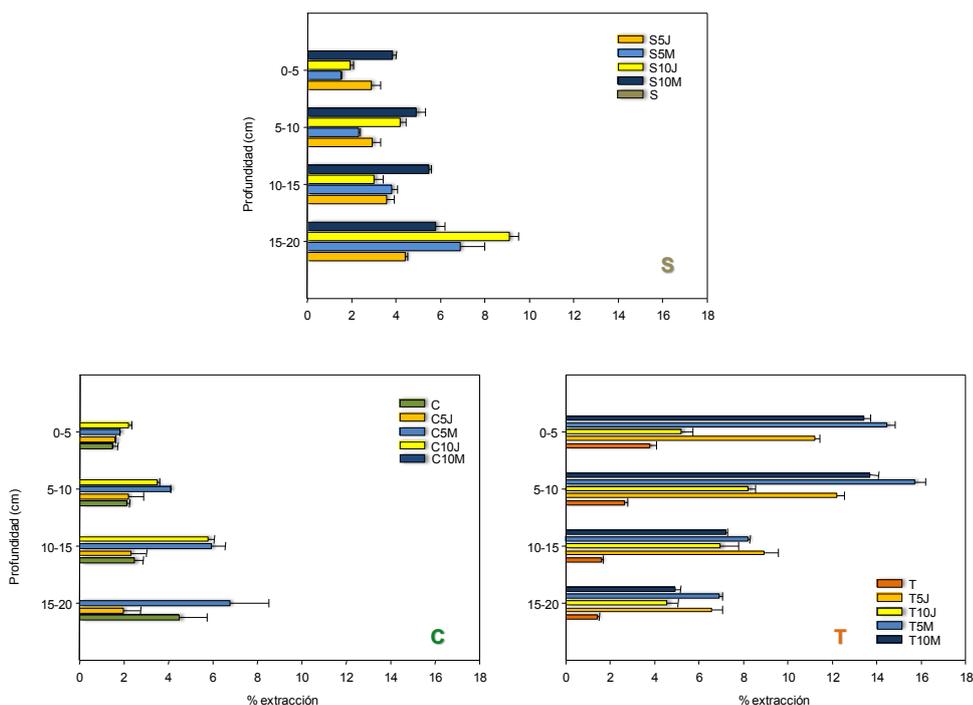


Figura II.27. Porcentajes de S-metolacloro extraído de las porciones de suelo a distintas profundidades de las columnas de suelo empaquetadas a mano.

Por otro lado, el suelo T enmendado con AM que no lixivió, mostró los porcentajes más altos de extracción en la columna de suelo (Figura II.27.), que además se detectaron mayoritariamente en los fragmentos más superficiales de la columna. Esto muestra que aunque los coeficientes de adsorción para T5M y T10M no fueron los más elevados (Tabla II.10.), el herbicida fue fuertemente retenido.

Tabla II. 13. Porcentajes totales lixiviados, residual en la columna empaquetada a mano y Total calculado, de S-metolacloro en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados al 5% y 10% (p/p).

| Suelos | Total lixiviado | Total extraído (%) | Total |
|-------------|--------------------|--------------------------|-------|
| S | 52.5±1.76* | - | 52.5 |
| S5J | 62.2±2.06 | 13.5±0.414 | 75.7 |
| S10J | 4.07±0.240 | 17.9±0.125 | 21.9 |
| S5M | 44.8±2.37 | 14.3±0.028 | 59.1 |
| S10M | 3.52±0.051 | 16.3±0.280 | 19.8 |
| C | 13.5±0.924 | 10.5±0.230 | 24.0 |
| C5J | 6.45±3.12 | 7.90±0.030 | 14.3 |
| C10J | 2.53±1.76 | 11.7±0.120 | 14.2 |
| C5M | 0.625±0.780 | 18.4±0.070 | 19.0 |
| C10M | - | - | - |
| T | 36.8±0.880 | 9.40±0.330 | 46.2 |
| T5J | 7.42±0.890 | 44.0±0.221 | 51.4 |
| T10J | 0.080±0.001 | 24.8±0.520 | 24.9 |
| T5M | - | 44.1±0.390 | 44.1 |
| T10M | - | 39.1±0.296 | 39.1 |

*Los números son medidas de $n_f \pm$ desviación estándar.

II.4.4.5.-Bioensayo

Se realizó un bioensayo para comprobar si la eficacia biológica del herbicida S-metolacloro sobre la mala hierba *Lepidium sativum* (raigrás inglés) se veía afectada por la adición de alperujo y del herbicida al suelo.

Al igual que ocurrió para MCPA, la eficacia de S-metolacloro frente a la hierba, no se redujo en el suelo enmendado C10J. Mientras que MCPA no mostró una alta adsorción al suelo, y por ello la posible reducción de su eficacia frente a la mala hierba no era esperable, S-metolacloro mostró una alta capacidad de ser retenido por el suelo enmendado ($Kd_{10} = 41$). No obstante, en el suelo C10J, a pesar de de la alta adsorción encontrada, no se encontró germinación de las semillas en las macetas, lo que indicó que

no existe un efecto inhibitorio sobre la actividad biológica del herbicida. Además, y al igual que ocurrió para MCPA, las macetas con suelo enmendado y sin herbicida, no mostraron efecto fitotóxico por la adición de alperujo (Figura II.18.), mostrando cantidades de biomasa aunque menores, visiblemente las plantas no se vieron afectadas con el tratamiento AJ (Figuras II.28. y II.19.).



Figura II.28. Estado de las macetas de raigrás inglés crecidas tras 20 días de ensayo en laboratorio para los tratamientos Control, alperujo, S-metolacloro+AJ y S-metolacloro.

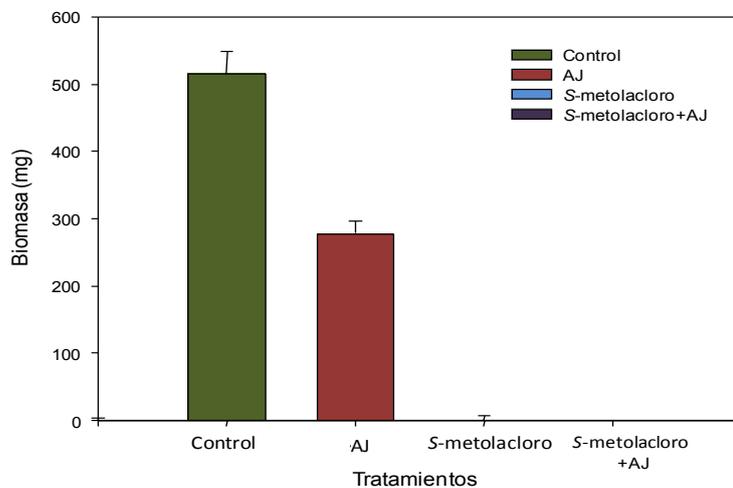


Figura II.29. Histograma para la biomasa de raigrass inglés crecida tras 20 días de ensayo en laboratorio para los tratamientos Control, alperujo, S-metolacloro+AJ y S-metolacloro

II.5.-Conclusiones

Aunque los residuos de almazara mostraron similares contenidos en carbono orgánico, los estudios de espectroscopia de fluorescencia y de infrarrojos revelaron diferencias en la fracción soluble del mismo, y distinto grado de humificación y compostaje. Los resultados revelan un diferente efecto de los alperujos sobre el comportamiento de MCPA y S-metolacloro. Mientras que en caso de éste último se redujo la lixiviación, disipación e incrementa la adsorción en los suelos, el alto potencial de lixiviación que presentó MCPA, no se vio reducido significativamente por la adición de los residuos usados.

II.6. Bibliografía

- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñero, A., Ortega-Calvo, J.J., Cornejo, J. Effects of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use Manage.* **2003**, 19, 150-156.
- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñero, A., Cornejo, J. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere.* **2004**, 54, 717-724.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Biores. Technol.* **2004**, 91, 195-200.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. Composting of a solid olive-mill by product ("alperujo") and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions. *Waste Manage.* **2006**, 26, 620-626.
- Albuquerque, J.A., González, J., Tortosa, G., Cegarra, J. Evaluation of "alperujo" composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation.* **2009**, 20, 257-270.
- Badalucco, L., Rao, M., Colombo, C., Palumbo, G., Laudicina, V.A., Gianfreda, L. Reversing agriculture from intensive to sustainable improves soil quality in a semiarid South Italian soil. *Biol. Fertil. Soils.* **2010**, 46, 481-489.
- Barriuso, E., Houot, S., Serra-Wittling, C. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pest. Sci.* **1997**, 49, 65-75.
- Barriuso, E., Andrades, M.S., Benoit, P., Houot, S. Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from composts: experimental data and modelling approach. *Biogeochemistry.* **2011**, 106, 117-133.
- Beck, A.J., Johnston, A. E. J., Jones, K. C. Movement of nonionic organic chemicals in agricultural soils. *Crit. Reviews in Environ Sci. and Techn.* **1993**, 23, 3, 219-248.
- Bellamy, L.J. **1975**. The infrared spectra of complex molecules (Vol. I). 3rd Edition Chapman y Hall, London y New York.
- Bolan, N.S., Adriano, D.C., Kunhikrishnan, A., James, R., McDowell, R., Senesi, N. **2011**. Dissolved Organic Matter: Biogeochemistry, Dynamics, and Environmental

- significance in soils. Capítulo I. En: *Advances in Agronomy*, vol 110. Primera edición. Elsevier, Printed in USA.
- Brown, G. **1961**. The X-Ray identification and crystal structures of clay minerals, (Eds. G. Brown) Mineralogical Society, London.
- Buss, S.R., Thrasher, T., Morgan, P., Smith, J.N.N. A review of mecoprop attenuation in the subsurface. *Q.J. Eng. Geol. Hydroge.* **2006**, 39, 283-292.
- Cabrera, A., Cox, L., Koskinen, W.C., Sadowsky, M.J. Availability of triazine herbicides in aged soils amended with olive oil mill waste. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**, 56, 4112-4119.
- Cabrera, A., Cox, L., Fernández-Hernández, A., García-Ortiz Civantos, C., Cornejo, J. Field appraisalment of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2009**, 132, 260-266.
- Camacho-Muñoz, D., Martín, J., Santos, J.L. Aparicio, I., Alonso, E. An affordable method for the simultaneous determination of the most studied pharmaceutical compounds as wastewater and surface water pollutants. *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 3064-3073.
- Cao, P., Wang, X., Liu, F., Zhao, E., Han, L. Dissipation and Residue of S-metolachlor in Maize and soil. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* **2008**, 80, 391-394.
- Celis, R., Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Retention of metatmitron by model and natural particulate matter, *J. Environ. Anal. Chem.* **1996**, 65, 245-260.
- Celis, R., Barriuso, E., Houot, S. Sorption and desorption of atrazina by sludge amended soil: dissolved organic matter effects. *J. Environ. Qual.* **1998**, 27, 1348-1356.
- Celis, R., Koskinen, W.C., Cecchi, A.M., Bresnahan, G.A., Carrizosa, M.J., Ulibarri, A., Pavlovic, I., Hermosín, M.C. Sorption of the ionizable pesticide imazamox by organo-clays and organohydrotalcites. *J. Environ. Sci. Health B*, **1999**, 34, 6, 929-941.
- Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Adsorption and desorption of the herbicide Thiazafuron as a function of soil properties. *Internat J. of Environ. Analy. Chem.* **1995**, 58, 305-314.
- Cox, L., Celis, R., Hermosín, M.C., Becker, A., Cornejo, J. Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agriculture, Ecosyst. Environ.* **1997**, 65, 151-161.

- Cox, L., Calderón, M. J., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Leaching of clopyralid and metamitron under conventional and reduced tillage systems. *J. Environ. Qual.* **1999**, 28, 605-610.
- Cox, L., Celis, R., Hermosín, M. C., Cornejo, J., Zsolnay, A., Zeller, K. Effect of organic amendments on herbicide sorption as related to the nature of dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 4600-4605.
- Cox, L., Cecchi, A., Celis, R., Hermosín, M.C., Koskinen, W.C., Cornejo, J. Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2001**, 65, 1688-1695.
- Cox, L., Fernandes, M.C., Zsolnay, A., Hermosín, M. C., Cornejo, J. Changes in dissolved organic carbon of soil amendment with aging: Effect on pesticide adsorption behavior. *J. Agric. Food, Chem.* **2004**, 52, 5635-5642.
- Crespín, M.A., Gallego, M., Valcárcel, M., González, J.L. Study of the degradation of the herbicides 2,4-D and MCPA at different depths in contaminated agricultural soil. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 4265-4270.
- Delgado-Moreno, L., Almendros, G., Peña, A. Raw or incubated olive-mill wastes and its biotransformed products as agricultural soil amendments - Effect on sorption-desorption of triazine herbicides. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 836-843.
- Di Bonito, M. Tesis Doctoral. **2005**. Trace elements in soil pore water: A comparison of sampling methods.
- Ewald, M., Berger, P., Visser, A. U-V Visible absorption and fluorescence properties of fulvic acids of microbial origin as functions of their molecular weight. *Geoderma.* **1988**, 43, 11-20.
- Fernandes, M.C., Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Organic amendments affecting sorption, leaching and dissipation of fungicides in soils. *Pest Manag. Sci.* **2006**, 62, 1207-1215.
- Flores-Céspedes, F., González-Pradas, M., Fernández-Pérez, M. Villafranca-Sánchez. Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. *J. Environ. Qual.* **2002**, 31, 880-888.

- Gee, G. y Bauder, J.W. **1982**. Particle-size analysis. En: *Methods of soil analysis: Part 1, Physical and mineralogical methods*, 2ª edn (edn A. Klute), pp. 383-441. Agronomy monograph nº 9, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Giles, C.H., McEwan, S.N., Nakhwa, S.N. Smith, D. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherm, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface area in solids. *J. Chem. Soc.* **1960**, 3973-3993.
- Goering, H. K. y P.J. Van Soest. **1970**. Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). USDA. Agricultural Handbook No. 379.
- Gregg, S. J. y Sing, K.S.W. Adsorption, surface area and porosity. London, Academic Press. **1982**.
- Green, R.E. y, Yamame, W.K. Precision in pesticide adsorption measurements. *Soil Sci. Am.Proc.* **1970**. 34, 3535-355.
- Haberhauer, G., Pfeiffer, L., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H., Aquino, A.J.A., Tunega, D., Lischka, H. Response of sorption processes of MCPA to the amount and origin of organic matter in a long-term field experiment. *Eur. J. Soil Sci.* **2001**, 52, 279-286.
- Hamaker, J.W. y Thompson, J.M. **1972**. Adsorption. En: *Organic Chemicals in the Soil Environment* (eds. C.A.I. Goring y J.W. Hamaker). Vol. I, Marcel Dekker, New York, pp. 49-143.
- Hiller, E., Bartal, M., Milicka, J., Cernansky, S. Environmental fate of the herbicide MCPA in two soils as affected by the presence of wheat ash. *Water Air soil Pollut.* **2009**, 197, 395-402.
- Iglesias, A., López, R., Gondar, D., Antelo, J., Fiol, S., Arce, F. Effect of pH and ionic strength on the binding of paraquat and MCPA by soil fulvic and humic acids. *Chemosphere.* **2009**, 76, 107-113.
- Jackson K.L. Soil Chemical Analysis Advanced Course (ed. Jackson, M.L.) 2nd edn, Wiley-Interscience, Madison, **1975**.
- Jensen, P.H., Hansen, H.C.B., Rasmussen, J., Jacobsen, O.S. Sorption-controlled degradation kinetics of MCPA in soil. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 6662-6668.

- Johnston, C.T. y Tombácz, E. **2002**. Surface chemistry of soil minerals. En *Soil mineralogy with environmental applications*. Eds. J.B. Dixon, Schulze, D.G. SSSA. Madison, Wisconsin, 37-67.
- Juhler, R.K., Henriksen, T.H., Ernstsén, V., Vinther, F.P., Rosenberg, P. Impact of basic soil parameters on pesticide disappearance investigated by multivariate partial least square regression and statistics. *J. Environ. Qual.* **2008**, 37, 1719-1732.
- Kah, M. y Brown, D. Adsorption of ionisable pesticides in soils. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2007**, 188, 149-217.
- Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Resource. Res.* **1979**, 13, 241-248.
- Kavdir, Y. y Killi, D. Influence of olive oil solid waste applications on soil pH, electrical conductivity, soil nitrogen transformations, carbon content and aggregate stability. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, 2326-2332.
- Kearney, P.C., Shelton, D.R., Koskinen, W.C. **1997**. Soil chemistry of pesticides. En: *Encyclopaedia of chemical technology*, 4ª Edición, Vol, 22, (M. Howe-Grant Ed.), New York. John Wiley & Sons. Pp 419-451.
- Komilis, D.P. y Ham, R.K. The effect of lignin and sugars to the aerobic decomposition of solid wastes. *Waste Manage.* **2003**, 23, 419-423.
- Koskinen, W.C., Calderón, M.J., Rice, P.J., Cornejo, J. Sorption-desorption of flucarbazone and propoxycarbazone and their benzenesulfonamide and triazolinone metabolites in two soils. *Pest Manag. Sci.* **2006**, 62, 598-602.
- Kumke, M.U., Löhmansroben, H. G., Roch, T. H. Fluorescence spectroscopy of polyaromatic compounds in environmental monitoring. *J. Fluor.* **1995**, 5, 139-153.
- Liñán, C. *Vademecum de productos fitosanitarios.* **2006**.
- Madejón, E., Galli, E., Tomati, U. Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica.* **1998**, 42, 135-146.
- McDonald, J.A., Tesis Doctoral. **2006**. Aerobic degradation assessment for the fungicide bas 505 using batch and intact soil core methodologies. Department of Agronomy&-Environmental Management. Louisiana State University.
- Morillo, J. A., Antizar-Ladislao, B., Moteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A., Russell, N.J. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2009**, 82, 25-39.

- Moser, H., Rihs, G., Stauter, H.P. Bohner, N. **1982**. Atropisomerism, chiral center and activity of metolachlor, En: *Pesticide chemistry: Human Welfare and the Environment*, Vol.1, ed. Miyamoto, J. y Kearney, P.C. Pergamon, New York, pp. 315-620.
- Murphy, E.M., Zachara, J.M., Smith, S.C., Phillips, J.L., Wietsma, T.W. Interaction of hydrophobic organic compounds with mineral-bound humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 7, 1291-1299.
- Nair, D.R y Schnoor, J.L. Effect of soil conditions on model parameters and atrazine mineralization rates. *Water Res.* **1994**, 28, 1199-1205.
- Nelson, D.V. y Sommers, L.E. **1982**. Total carbon, organic carbon, and organic matter. En: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Biological Methods*, American Society of Agronomy and Soil Science of America, Madison, WI. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (eds.). pp. 539–579.
- Ohno, T., J. Chorover, A., Omoike, J., Hunt. Molecular weight and humification index as predictors of adsorption for plant- and manure-derived dissolved organic matter to goethite. *Eur. J. Soil. Sci.* **2007**, 58, 125- 132.
- O'Connell, P.J. Harms, C.T. Allen, J.R.F. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Protection.* **1998**, 17,3, 207-2012.
- Paszko, T. Degradation of MCPA in soil horizons of Polish agricultural soils. *Polish J. of environ. Stud.* **2009**, 18, 6, 1083-1091.
- Pignatello, J.J. y Huang, L.Q. Sorptive reversibility of atrazine and metolachlor residues in field soil samples. *J. Environ. Qual.* **1991**, 20, 1, 222-228.
- Pignatello, J.J. y Xing, B. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, 30, 1–11.
- Qualls, R.G. Biodegradability of fractions of dissolved organic carbon leached from decomposing leaf litter. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 1616-1622.
- Rodríguez-Lucena, P., Hernández, D., Hernández-Apaolaza, L., Lucena, J.J. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 1085-1092
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manag.* **2006**, 26, 960-969.

- Romero, E., Benitez, E., Nogales, R. Suitability of wastes from olive-oil industry for initial reclamation of a Pb/Zn mine tailing. *Water Air Soil Pollut.* **2005**, 165, 153-165.
- Schnitzer, M.I., Monreal, C.M. **2011**. Quo vadis Soil Organic Matter Research? A Biological Link to the Chemistry of Humification, en *Advances in Agronomy*, 113, 139-213.
- Senesi, N., Miano, T. M., Provenzano, M.R., Brunetti, G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* **1991**, 152, 4, 259-271.
- Senesi, N., Plaza, C., Brunetti, Gennaro, Polo, A. A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances. *Soil Biol. Biochem.* **2007**, 39, 6, 1244-1262.
- Serramiá, N., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A. Soil mineralization of two phase olive mill wastes: effect of the lignocellulosic composition on soil C dynamics. *J. Environ. Monit.* **2012**, 14, 2, 499-509.
- Seybold, C.A. y Mersie, W. Adsorption and desorption of atrazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine, hydroxyatrazine, and metolachlor in two soils from Virginia. *J. Environ. Qual.* **1996**, 25, 1179-1185.
- Shaner, D. L., Brunk, G., Belles, D., Westra, P., Niessen, S. Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest. Manage. Sci.* **2006**, 62, 617-623.
- Socias-Viciano, M.M., Fernández-Pérez, M., Villafranca-Sánchez, E., González-Pradas, E., Flores-Céspedes, F. Sorption and leaching of Atrazine and MCPA in natural and peat-amended calcareous soil from Spain. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1236-1241.
- Spark, K.M., y Swith, R. S. **1994**. Investigation of some of the parameters affecting the fluorescence spectra of humic substances. En *Humic substances in the global environment and implication on human health*. (eds. Senetis and T. m. Miano) Elsevier, Amsterdam.153-160.
- Stintzing, F. C., Hoffmann, M., Carle, R. Thermal degradation kinetics of isoflavone aglycones from soy and red clover. *Clays Clay Miner.* **1995**. 43, 255-256.
- Tisdall, J.M. y Oades, J.M. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.* **1982**, 33, 141-163.

- Tomlin, C. D. The e-Pesticide Manual. A World Compendium, version 4.1. BCPC, Farham U.K. (2008)
- Torrents, A., S. Jayasundera, W.J. Schmidt. Influence of the polarity of organic matter on the sorption of acetamide pesticides. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3320–3325.
- Walker, A. y Welch, S.J. The relative movement and persistence in soil of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl and triasulfuron. *Weed Res.* **1989**, 29, 375-383.
- Washburn, E.W. The dynamics of capillary flow. *Physical Review*, **1921**, 17, 273-283.
- Wauchope, R.D., Yeh, S., Linders, J.B.H.J., Kloskowski, R., Tanaka, K., Rubin, B., Katayama, A., Kördel, W., Gerstl, Z., Lane, M., Unsworth, J.B. Review: Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest. Manag. Sci.* **2002**, 58, 419-445.
- Weber, J., McKinnon, E.J., Swain, L.R. Sorption and mobility of ¹⁴C labelled imazaquin and metolachlor in four soils as influenced by soil properties. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 19, 5752-5759.
- Wit, J.C.M., Riemsdijk, W.H., Koopal, L.K. Proton. binding to humic substances. Electrostatic effects. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, 27, 10, 2005-2014.
- Worrall, F., Parker, A., Rae, J.E., Johnson, A.C. A study of suspended and colloidal matter in the leachate from lysimeters and its role in pesticide transport. *J. Environ. Qual.* **1999**, 28, 595-604.
- Worrall, F., Fernández-Pérez, M., Johnson, A.C., Flores-Céspedes, F., González-Pradas, E. Limitation of the role of incorporated organic matter in reducing pesticide leaching. *J. Contam. Hydrol.* **2001**, 49, 241-262.
- Zsolnay, A. y Görlitz, H. Water extractable organic matter in arable soils: effects of drought and long-term fertilization. *Soil, Biol. Biochem.* **1994**, 16, 9, 1257-1261.
- Zsolnay, A. y Picolo, A. Dissolved humus in soil waters. **1996**. Humic substances in terrestrial ecosystems. (ed) Elsevier, New York.
- Zsolnay, A, Baigar, E., Jiménez, M., Steinweg, B, Saccomandi, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere.* **1999**, 38, 1, 45-50.

Capítulo III

Efecto de residuos orgánicos transformados y no transformados en suelo sobre el comportamiento de bentazona y S-metolacoloro. Estudios de adsorción-desorción, disipación, mineralización, lixiviación, actividad deshidrogenasa

III.1.-Introducción

La materia orgánica del suelo (MO) constituye un complejo y dinámico sistema sometido constantemente a cambios temporales y espaciales, que se ve afectado por factores bióticos y abióticos. La naturaleza física y química de la MO es resultado de la acción conjunta de factores como la entrada de biomasa al sistema, de la historia agrícola del suelo (Alleto et al., 2010; Schnitzner y Monreal., 2011; Pignatello et al., 2012), de la composición de la matriz mineral del mismo, la climatología, la abundancia de agua, la profundidad del perfil del suelo, la microflora, microfauna y de la mesofauna que lo habitan (Pignatello, 2012).

Ya en el Capítulo I se menciona la fracción orgánica de los suelos como componente determinante en los procesos de adsorción-desorción de algunos plaguicidas. Existen estudios que ponen de manifiesto que la composición coloidal del suelo condiciona fuertemente el grado de adsorción de la MOS exógena que aporta los residuos, así como las interacciones que se darán entre los plaguicidas y las partículas del suelo. Las interacciones entre la MO del mismo y la procedente de los residuos va a depender de su estructura química y por tanto del origen de la misma (Schnitzner y Monreal., 2011).

La evolución y transformación de la MO en los suelos enmendados, debido fundamentalmente a las condiciones climáticas, juega un papel relevante en la determinación de su capacidad de interactuar con compuestos orgánicos en el suelo (Cox et al., 2004; Barriuso et al., 2011). Algunos autores han investigado sobre el comportamiento de plaguicidas en suelos enmendados con alperujo y/o orujo (López-Piñeiro et al., 2006, 2008a, b; Albarrán et al., 2004; Cabrera et al., 2008, 2010), pero existen pocos trabajos desarrollados bajo condiciones de campo y que evalúen el efecto de la transformación de la MO del suelo en el comportamiento de plaguicidas (Cabrera et al., 2009; Cañero et al., 2012).

Bentazona (2, 2-dióxido de 3-isopropil-(1*H*)-2, 1, 3-benzotiazidin-4(3*H*)-ona) es uno de los herbicidas más ampliamente usados en agricultura para el control de malas hierbas en cultivos de maíz, arroz y otros cultivos intensivos (Li et al., 2003; Liu et al., 2011). Debido a su baja capacidad de adsorción en suelos y, por tanto, a su alta movilidad, presenta alto riesgo de lixiviación hacia aguas subterráneas (Lagana et al., 2002; Dousset et al., 2004) y es frecuentemente detectado en aguas superficiales y subterráneas a

concentraciones superiores a las establecidas por la UE. Loos et al. (2010) encontraron que la bentazona constituía un serio problema de contaminación en términos de frecuencia de detección y concentraciones máximas en aguas subterráneas en 23 países europeos bajo estudio. En Alemania en particular, bentazona es uno de los plaguicidas que más problemas causa en la gestión de aguas potables. En España, Kuster et al. (2008) demostraron que bentazona era uno de los contaminantes más destacados en muchas regiones de España sometidas a prácticas intensivas de manejo agrícola.

III.2.-Objetivos

El objetivo general de este estudio ha sido por un lado, evaluar el impacto que tienen aplicaciones sucesivas a un suelo agrícola durante 9 años de dos residuos de almazara (un alperujo y un orujo), y por otro lado, la aplicación de estos mismos residuos frescos bajo condiciones de laboratorio, sobre las propiedades físicas y químicas de un suelo de olivar, así como sobre los procesos que regulan el comportamiento de los herbicidas bentazona y S-metolacoloro.

III.3.-Materiales y métodos

III.3.1.-Herbicidas

III.3.1.1.-Bentazona

Bentazona es un herbicida que pertenece a la familia de las benzotiadiazinonas. Presenta un peso molecular de 240.3 g mol^{-1} y su solubilidad en agua es de 0.570 g l^{-1} a pH 7 y a $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Es un ácido débil con $\text{pKa} = 3.2$ (Boivin et al., 2005) que se encuentra en la solución del suelo fundamentalmente en forma aniónica. El producto técnico (pureza del 98%) usado para los estudios de adsorción-desorción, disipación, mineralización y lixiviación fue proporcionado por BASF (Limburgerhof, Alemania). Los estudios de mineralización se realizaron usando C^{14} -bentazona marcada en el carbono del grupo carbonilo, con actividad específica de 6.8 MBq mg^{-1} y proporcionado por IZOTOP (Budapest, Hungría).

Bentazona es un herbicida selectivo de contacto, de absorción por las hojas. Actúa en postemergencia sobre monocotiledóneas no gramíneas y dicotiledóneas inhibiendo la actividad fotosintética en el fotosistema II (PSII). Se degrada principalmente

por hidroxilación en suelo y en plantas se metaboliza rápidamente hacia moléculas derivadas del ácido antranílico (Li et al., 2003; Liu et al., 2011).

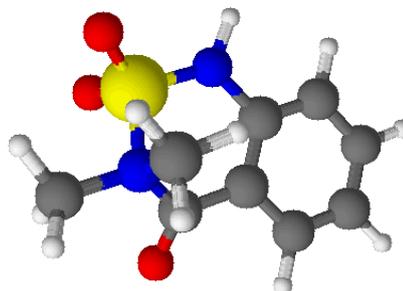


Figura III.1. Estructura química tridimensional de la molécula de bentazona. gris: átomos de carbono; azul marino: nitrógenos; blanco: hidrógenos; amarillo: azufre; rojo: oxígenos.

III.3.1.2.-S-metolacloro

Las propiedades físicas y químicas de S-metolacloro ya han sido descritas en el apartado II.3.1.2 del Capítulo II.

III.3.1.3.-Método de análisis de herbicidas

Las muestras de bentazona y S-metolacloro se analizaron usando HPLC en las mismas condiciones descritas en el apartado II.3.1.3. del Capítulo II. El sistema de elución fue una mezcla 40:60 (v/v) acetonitrilo/H₃PO₄ al 0.25% (pH= 2.8) y mezcla de acetonitrilo y agua ultrapura Mili-Q en una proporción 55:45 (v/v), respectivamente. Las muestras de bentazona C¹⁴ se analizaron por LSC, bajo las condiciones descritas en el apartado II.3.1.3.

III.3.2.-Residuos orgánicos y suelo

Se usaron dos residuos orgánicos subproductos del proceso de centrifugación en dos fases para la obtención de aceite de oliva: un alperujo (OW) resultado de la extracción en dos fases con agua y proporcionado por la empresa Olidal en Portalegre (Portugal), y un orujo (DW) resultado del tratamiento del aceite de oliva producido en la centrifugación en dos fases con hexano, seguido de una posterior destilación para obtener un aceite de oliva de segunda extracción. Este orujo fue suministrado por UCASUL, empresa localizada en Beja, Portugal.

Se seleccionó un suelo procedente de una granja experimental perteneciente al Instituto Nacional de Investigación Agraria y Pesquera (INIAP) en Elvas, Portugal (38°53' N; 7°9'W; 290 msnm). Para este estudio se seleccionaron 15 parcelas de un olivar de dimensiones 14x15 m, distribuidas al azar, que habían sido tratadas durante 9 años de la siguiente manera: tres de ellas con alperujo a la dosis de 30 Mg ha⁻¹ y año, otras tres parcelas con 60 Mg ha⁻¹ (OW30 y OW60) (equivalentes a 0.62 y 1.24% (p/p), respectivamente), e igualmente otras seis parcelas con orujo a las dosis de 27 y 54 Mg ha⁻¹ y año (DW27 y DW54) (equivalentes a 0.56 y 1.12% (p/p), respectivamente). Tres parcelas permanecieron sin enmendar y constituyeron las parcelas control a lo largo del estudio (S). La distribución de las parcelas se muestra en la Figura III.2. En la parte inferior izquierda de esta figura se muestra una parcela experimental individual, que se encuentra dividida en diferentes subparcelas de 3 x 4 olivos, de entre los cuales se seleccionan como puntos de muestreo los dos árboles que quedan en el centro de la misma (en rojo, Figura III.2.), previniendo de este modo el posible efecto borde o deriva que pudiera ocasionarse en el muestreo. Los residuos fueron aplicados manualmente cada mes de febrero a lo largo de un periodo de 9 años, distribuyéndose por la superficie del suelo, tras lo que se realizó un arado con el fin de homogeneizar la superficie del suelo enmendada. Tras 20 meses desde el último tratamiento, se recogieron muestras de suelo de los primeros 25 cm de profundidad en cada parcela.

Con el objeto de comparar el comportamiento de los herbicidas bentazona y S-metolaclo en estos suelos bajo el efecto de residuos orgánicos transformados (suelos enmendados en condiciones de campo durante 9 años) y con residuos orgánicos frescos en laboratorio, se recolectaron muestras de suelo sin enmendar (S) que se secaron a temperatura ambiente, cuya fracción menor de 2 mm fue enmendada bajo condiciones de laboratorio con los mismos residuos, OW y DW a las dosis de 5 y 10 % (p/p) (OW5, OW10, DW5 y DW10) y almacenada a 4°C hasta su posterior uso. La cantidad total de residuo añadida al campo tras los 9 años de tratamiento fue similar a aquella recibida por los suelos enmendados en laboratorio.

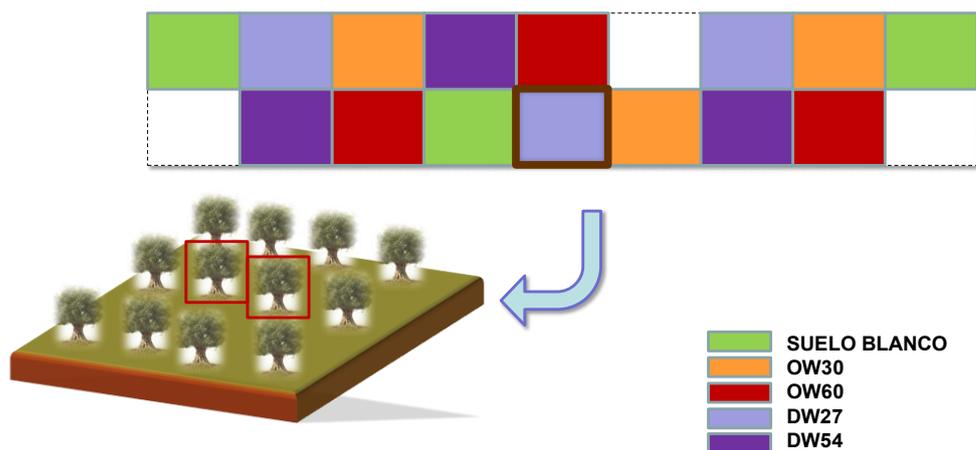


Figura III.2. Distribución al azar de las parcelas experimentales de la granja de INIAP.

III.3.3.-Análisis de residuos orgánicos y de suelo

La textura del suelo (20% arcilla, 20% limo y 60% arena) fue determinada por sedimentación usando el método de la pipeta (Gee y Bauder, 1982). El suelo es un Luvisol Cutánico (ISSS-ISRIC. FAO, 1994), ampliamente distribuido en el área mediterránea. El contenido en COT de los suelos y los residuos fue determinado por oxidación con dicromato según Nelson y Sommers. (1982) y el pH fue medido en una relación 1:1 (p/v) suelo/agua y 1:5 (p/v) residuo/agua, usando un electrodo combinado. La conductividad eléctrica (CE) fue medida en un extracto saturado para el suelo (US Salinity Laboratory Staff, 1954) y en una relación 1:10 (p/v) de una mezcla DW/OW y agua. El COS de los suelos y los residuos fue determinado en una solución con agua destilada a la relación 3:1 (agua/suelo) (v/p) y 100:1 (agua/OW y agua/DW) y los extractos fueron medidos con un espectrofotómetro de absorbancia Shimadzu TOC-V sch. Los ácidos húmicos y fúlvicos (AH y AF, respectivamente) fueron extraídos de los suelos y residuos con una solución 0.1 M de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{NaOH}$ usando una relación 10:1 (extractante/muestra suelo o residuo). Para precipitar los ácidos húmicos el sobrenadante se acidificó hasta alcanzar pH 2 con H_2SO_4 (1 M). El COS y el COT asociados con cada fracción de AH y AF (CAH y CAF, respectivamente) fueron determinados por oxidación dicromática y medida su absorbancia a 590 nm (Sims y Haby, 1971). El grado de polimerización (GP) de la materia orgánica del suelo fue calculado como la relación entre CAH/CAF. La lignina fue determinada usando el método descrito por Goering y Van Shoest, (1970). Asimismo, se realizó un estudio sobre las

propiedades superficiales (Washburn, 1921) de los suelos siguiendo la metodología descrita en el apartado II.3.3.2.

Se separó la fracción arcilla del suelo (fracción de tamaño de partícula inferior a 2 μm) por sedimentación, tras una eliminación previa de carbonatos con acetato/acético (pH 5) (Jackson, 1975). La mineralogía de la fracción arcilla se determinó por difracción de Rayos X sobre agregados orientados saturados en Mg^{2+} tratados con etilenglicol y K^+ calcinadas a 500°C (Brown, 1961).

Se monitorizó la respiración basal (la producción de CO_2 por parte de organismos vivos del suelo) durante 42 días en los suelos frescos sin enmendar y enmendados con OW y DW en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10). La metodología se recoge en el apartado II.3.3.5. del Capítulo II.

III.3.4.-Estudios de laboratorio

III.3.4.1.-Estudios de adsorción-desorción

Duplicados de 5 g de suelo sin enmendar y enmendados con OW y DW (OW30, OW60, DW27, DW54, OW5, OW10, DW5 y DW10) fueron tratados con 10 ml de soluciones iniciales conocidas (C_i) de bentazona (0.05, 0.1, 0.5, 1, y 1.5 mM) y S-metolacloro (5, 10, 20, 40, 50 μM). Las muestras se trataron y se analizaron siguiendo las metodologías descritas en los apartados II.3.1.2. y II.3.4.1. del Capítulo II.

III.3.4.2.-Estudios de disipación-mineralización-actividad deshidrogenasa

Los estudios de disipación se realizaron para ambos herbicidas, pero la mineralización sólo se determinó para bentazona, ya que no se disponía de producto marcado S-metolacloro. Para los estudios de disipación-mineralización de bentazona se usaron matraces biométricos que contenían 25 g de suelo sin enmendar (S), los suelos enmendados con OW y DW en el campo durante 9 años (OW30, OW60, DW27 y DW54) y de los suelos enmendados en el laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10). El suelo fue incubado durante 42 días a 24 ± 1 °C y al 40 % de capacidad máxima de retención de agua del suelo. El peso de los matraces con el suelo se controlaba semanalmente y en caso de pérdida, se ajustaba al peso inicial con agua destilada, con el fin de mantener constante la humedad durante todo el experimento.

Los suelos que iban a ser extraídos en los tiempos de muestreo 0, 4 y 42 días fueron tratados con una disolución de C¹²-bentazona hasta alcanzar una concentración equivalente 2.2 kg ha⁻¹, mientras que los suelos a extraer en los tiempos de muestreo 7, 14 y 28 días, fueron tratados además, con C¹⁴-bentazona hasta alcanzar una concentración final de 92.5 Bq g⁻¹. En todos los tiempos de muestreo se extraía la bentazona contenida en los 25 g de suelo con 50 ml de una disolución mezcla (40:60) (v/v) de acetonitrilo y H₃PO₄ al 0.25% (pH 2.8), agitando mecánicamente a 20±2°C durante 24h. Las suspensiones se trataron y se analizaron como en los apartados II.3.1.2. y II.3.4.1. del Capítulo II.

Para monitorizar la mineralización de bentazona, se depositó 1 ml de NaOH (1 N) en el brazo del matraz biométrico, que actuaría como trampa de CO₂ producido durante el proceso de mineralización del herbicida. Al igual que se detalla en el apartado II.3.4.4, el mililitro de NaOH se recogía y reemplazaba semanalmente por una nueva disolución y se analizaba por LSC.

Tras la extracción de bentazona de los suelos contenidos en los matraces con C¹⁴-bentazona, éste se dejó secar y molió, en un mortero de Ágata. Se cuantificó el contenido de residuos no extraíbles de S-metolacloro. Un gramo de este suelo se sometió a combustión a 900°C usando un oxidizador Harvey OX-500. El C¹⁴ liberado tras la combustión fue atrapado por un líquido diseñado para tal fin (Harvey's C¹⁴ cocktail), que actuó como trampa de carbono y fue analizado por LSC.

En el caso de S-metolacloro se realizó un estudio de disipación del mismo modo que para MCPA en el Capítulo II y se monitorizó la actividad deshidrogenasa (ADH) en los suelos sin enmendar y enmendados en presencia de S-metolacloro. Se determinó usando el método de Trevors (1984) modificado por García et al. (1993). Para ello se incubó un gramo de suelo (por triplicado) durante 20 h en oscuridad en presencia de 0.2 ml del sustrato 2-*p*-iodofenil-3-*p*-nitrofenil-5 cloruro de tetrazolio (INT) (0.4%). El producto formado: formazán idonitrotetazolio (IF) se extrajo con 10 ml de metanol y se midió la absorbancia a 490 nm.

III.3.4.3.-Estudios de lixiviación

Los estudios de lixiviación para bentazona y S-metolacloro fueron llevados a cabo por duplicado en columnas empaquetadas a mano con suelo alterado, sin enmendar y enmendado tanto en el campo como en el laboratorio (S, OW30, OW60, DW27, DW54, OW5, OW10, DW5 y DW10). Con el fin de minimizar pérdidas de suelo durante el experimento de lixiviación, la parte inferior de las columnas se rellenó con 20 g de arena de mar y lana de vidrio. En la parte superior de la columna de suelo, una vez empaquetada con los suelos, se colocaron de nuevo 5 cm de arena de mar. Las columnas de suelo fueron saturadas con agua permitiendo el drenaje total durante 24 horas y entonces se procedió a añadir un volumen de solución en etanol equivalente a las concentraciones de bentazona y S-metolacloro a la dosis de 1 y 2.2 kg ha⁻¹ respectivamente, en la parte superior de la columna. Cada día las columnas fueron regadas con 50 ml de agua destilada y los lixiviados fueron recolectados, filtrados y analizados por HPLC.

Al final del experimento se extrajo el suelo contenido en las columnas, siguiendo la misma metodología que el apartado II.3.4.3. Se extrajeron los herbicidas usando una solución 40:60 (v/v) acetonitrilo y H₃PO₄ al 0.25% (pH 2.8) para bentazona y una solución únicamente de metanol para S-metolacloro.

III.3.4.4.-Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico usando el programa de estadística SPSS (v.11.5) para Windows. Los datos presentados se trataron con una ANOVA de una variable. Igualmente se realizaron comparaciones usando el Test de Duncan. Las diferencias se consideraron significativas a una p<0.05.

III.4.-Resultados y Discusión

III.4.1.-Propiedades físico-químicas y superficiales de los suelos sin enmendar y enmendados y propiedades físico-químicas de los residuos

Las propiedades físicas y químicas estudiadas para el suelo procedente de la granja experimental INIAP sin enmendar, y de los suelos enmendados durante un periodo de 9 años con alperujo y orujo por separado en campo y los suelos enmendados en condiciones de laboratorio con los mismos residuos, se resumen en la Tabla III.1. En la misma se muestran las propiedades físico-químicas de los dos residuos utilizados, OW y DW.

La adición tanto de alperujo (OW) como de orujo (DW) modificó las propiedades originales del suelo tal y como se puede ver en la Tabla III.1. El contenido en COT aumentó en los suelos enmendados con OW y con DW. Aunque éste era similar en los dos residuos (535 g kg^{-1} para el OW y 516 g kg^{-1} para el DW), se encontraron mayores COT en los suelos enmendados en el campo con DW que con OW, lo que se puede atribuir a una mayor estabilidad de la materia orgánica del primero a lo largo de los 9 años de tratamiento, ya que presentó mayor contenido en lignina que OW (Tabla III.1), polímero que se conoce limita los procesos de degradación (Komilis y Ham, 2003; Albuquerque et al., 2009). Además, la adición de OW y DW al suelo aumentó también el contenido en COS y este incremento fue más significativo en el caso de los suelos enmendados en laboratorio. El menor contenido en COS de los suelos enmendados en el campo se puede atribuir a pérdidas por procesos de lixiviación y escorrentía y a procesos de biodegradación por parte de los microorganismos presentes en el suelo, ya que el COS constituye una fuente de carbono fácilmente accesible para ellos (Romero et al., 2005; Schnitzner y Monreal, 2011).

CAPÍTULO III. Efecto de residuos orgánicos transformados y no transformados en suelo sobre el comportamiento de los herbicidas bentazona y S-metolaclo. Estudios de adsorción, disipación, mineralización y actividad deshidrogenasa

Tabla III.1. Propiedades fisicoquímicas de los residuos orgánicos (OW y DW) y del suelo sin enmendar y enmendados en campo con OW a la dosis de 30 y 60 Mg ha⁻¹ (OW30 y OW60), y con DW 27 y 54 Mg ha⁻¹ (DW27 y DW54), y suelos enmendados en laboratorio con OW y DW a la dosis de 5% y 10% (w/w) (OW5, OW10, DW5 y DW10).

| | OW | DW | S | OW30 | OW60 | DW27 | DW54 | OW5 | OW10 | DW5 | DW10 |
|---|-------|------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|
| COT (g kg ⁻¹) | 535 | 516 | 14.6a | 30.7b | 37.6c | 46.1d | 63.5f | 37.8c | 54.8e | 34.2bc | 54.6e |
| COS (g kg ⁻¹) | 43 | 74 | 0.127a | 0.542b | 0.712c | 0.760c | 1.51d | 3.29e | 5.25f | 5.54f | 8.42g |
| CAH (g kg ⁻¹) | 52 | 31 | 0.965a | 2.07b | 2.78c | 2.94c | 4.14d | 3.28c | 5.16e | 1.84b | 3.20c |
| CAF (g kg ⁻¹) | 35 | 62 | 1.14a | 1.94b | 2.00b | 1.77b | 2.29c | 2.59c | 4.40e | 3.68d | 8.42f |
| pH (H ₂ O) | 5.70 | 5.3 | 7.95d | 7.83d | 7.74cd | 7.81d | 7.59c | 6.81b | 6.45b | 6.56b | 6.07a |
| CE (dS m ⁻¹) | 0.704 | 1.21 | 0.704a | 1.21b | 1.58c | 1.11ab | 1.87c | 3.10d | 4.94e | 7.08f | 12.39g |
| GP | - | - | 0.849b | 1.07c | 1.39c | 1.66cd | 1.81d | 1.26c | 1.17c | 0.501a | 0.38a |
| total N (g kg ⁻¹) | 16 | 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lignina (g kg ⁻¹) | 19 | 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

COT: Carbono orgánico total; COS: Carbono orgánico soluble; CAH: Ácidos húmicos; CAF: Ácidos fúlvicos; GP: grado de polimerización; CE: conductividad eléctrica. Los datos de la misma fila seguidos por la misma letra en el superíndice no son significativamente diferentes con $p < 0.05$

El contenido en CAH (fracción de carbono de los Ácidos Húmicos) y CAF (fracción de carbono de los Ácidos Fúlvicos) aumentó con la enmienda tal y como muestra la Tabla III.1., sin embargo se encontró que la cantidad de CAH era igual o mayor que la de CAF en todos los suelos enmendados excepto en los de laboratorio enmendados con orujo (DW5 y DW10), que también presentaron además un mayor contenido en COS. Al contrario, esto no se observó en los suelos enmendados en campo (DW27 y DW54) lo que puede ser atribuido a una mayor degradabilidad de los AF respecto de los AH (Qualls, 2005). Como consecuencia, el GP, (calculado como la relación: CHA/CFA) aumenta con la enmienda en todos los suelos a excepción de DW5 y DW10. El hecho de que ésta relación aumente, indica humificación de la materia orgánica hacia la formación de moléculas más condensadas y complejas como AH y que a su vez presentan mayor GP.

El pH y la CE de los suelos se ven afectados también por la adición de los residuos, coincidiendo con otros autores (Albuquerque et al., 2004; Roig et al., 2006). Los suelos enmendados en campo presentaron valores de pH similares al suelo sin enmendar, mientras que los extractos de los suelos enmendados en laboratorio fueron más ácidos (Tabla III.1). Igualmente, la CE de los suelos enmendados es mayor que la encontrada en el suelo sin enmendar, siendo este aumento muy alto en el caso de los suelos enmendados en laboratorio (Tabla III.1.). Las diferencias encontradas entre los suelos enmendados en campo y los suelos en laboratorio con OW y DW, éstos últimos de mayores pH y CE, pueden ser también atribuidas a pérdidas de los compuestos solubles y sales a través de los procesos de transporte y degradación durante los 9 años de enmienda en los suelos de campo, lo que no ocurre en los suelos enmendados en laboratorio con los residuos frescos.

El estudio del sistema de poros de los suelos explica en gran medida los procesos de adsorción, desorción, lixiviación e incluso de degradación que ocurren en el suelo, por lo que su determinación constituye una herramienta básica para el conocimiento del comportamiento de los plaguicidas en este sistema.

La Figura II.3. muestra los volúmenes de poro relativos y acumulados totales (VT) para el suelo sin enmendar y los suelos enmendados con los dos residuos. El VT (Figura III.3.) se vio incrementado con la adición de residuos en los suelos enmendados en el campo, siendo este aumento más importante en el caso de DW. Esto fue causa de un

aumento de poros en el rango de mayor tamaño estudiado (10-1000 μm), coincidiendo con los resultados presentados por Fernandes et al. (2006) y en menor medida también a un pequeño aumento en el volumen de los poros de tamaño menor a 1 μm , para estos suelos, excepto para DW54, que mostró un incremento mayor. Kavdir y Killi. (2008) encontraron al igual que en nuestro estudio, que la aplicación de un residuo resultado de la producción de aceite de oliva a la dosis del 8% (p/p) también afectaba a las propiedades físicas del suelo como la estabilidad de los agregados, que pueden verse incrementado tras un periodo de dos meses de incubación. Por el contrario, los suelos enmendados en laboratorio tanto con OW como con DW mostraron una pequeña reducción en VTP. Esta reducción ocurre en el rango mayor de tamaño de poro estudiado (10-100 μm). El mayor contenido en COS y la alta CE de los suelos enmendados en laboratorio podrían contribuir a esto, ya que el COS y las sales son compuestos agregantes que pueden bloquear poros de gran tamaño (Tisdall y Oades, 1982). Esto ha sido observado con anterioridad en un estudio de campo en el que el suelo fue tratado durante 3 años consecutivos con alpechín, un residuo de la extracción de aceite de oliva en tres fases (Cox et al., 1997).

CAPÍTULO III. Efecto de residuos orgánicos transformados y no transformados en suelo sobre el comportamiento de los herbicidas bentazona y S-metolaclo. Estudios de adsorción, disipación, mineralización y actividad deshidrogenasa

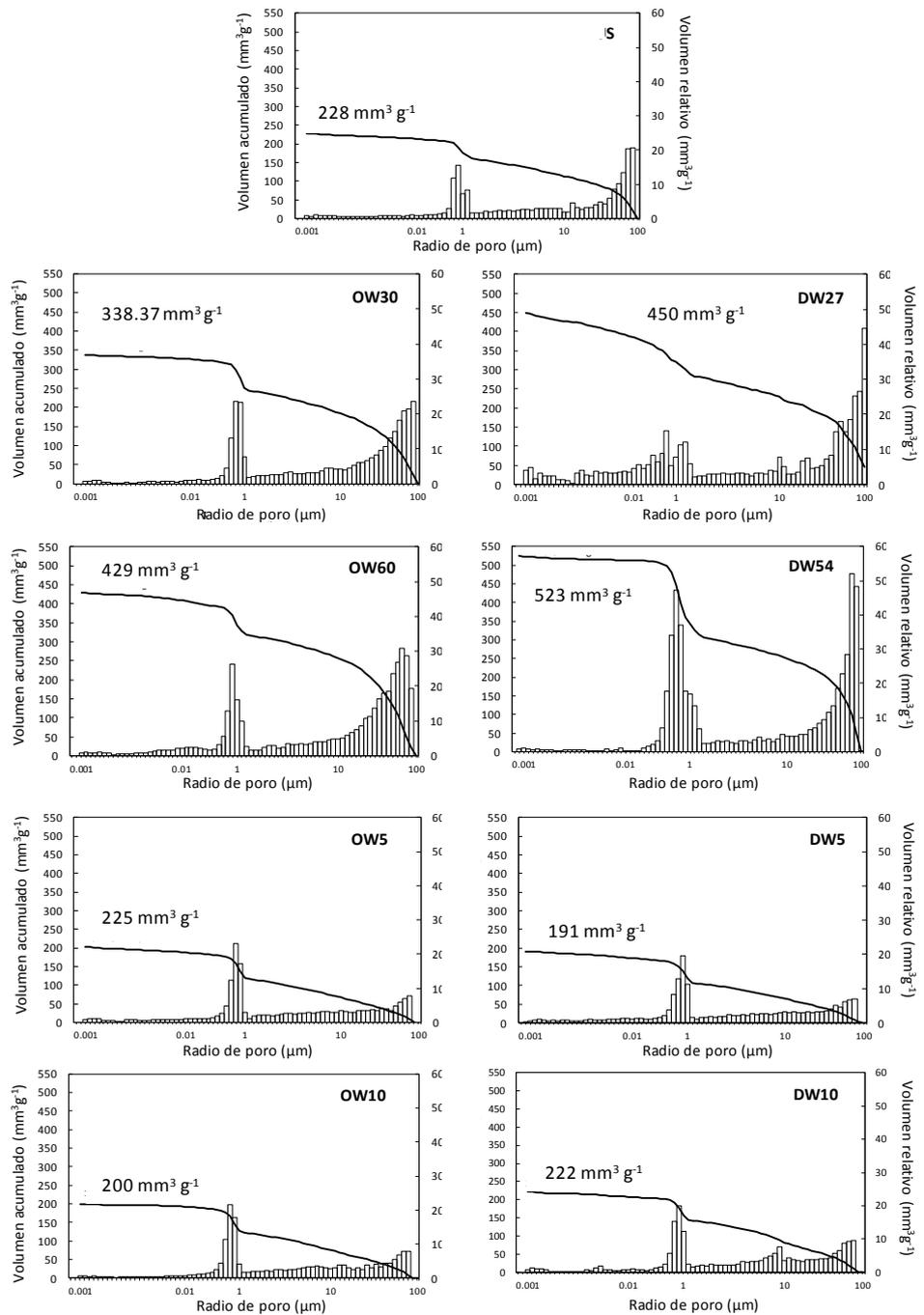


Figura III.3. Valores relativos (diagrama barras) y acumulados (curva) para los volúmenes de mercurio para los suelos sin enmendar y enmendados en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).

III.4.2.-Respiración basal

La Figura III.4. muestra la cantidad de CO₂ producido (mg C_i Kg⁻¹) por las poblaciones microbianas presentes en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y laboratorio durante 42 días de incubación a 24±1 °C y 40% de humedad del suelo.

Tal y como se ha dicho en el apartado III.4.2.1. la producción de CO₂ está directamente relacionada con la fracción viva y activa de los suelos (Badalucco et al., 2010) y es el componente orgánico soluble de los suelos el más fácilmente disponible para los microorganismos (Qualls et al., 2005; Schnitzner y Monreal, 2011), el que parece jugar un papel determinante en los procesos de respiración, encontrándose una correlación positiva entre el contenido de COS y la producción de CO₂.

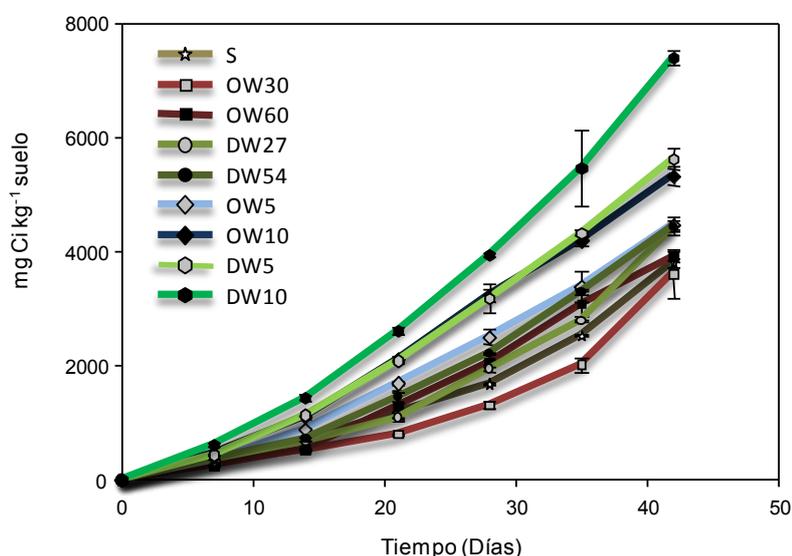


Figura III.4. Respiración basal del suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y laboratorio con OW y DW.

Nuestros resultados revelan que la adición de OW y DW al suelo incrementa la respiración del mismo, lo que se puede atribuir al aumento del COS al enmendar (Tabla III.1.), a excepción del suelo OW30, que mostró mayor contenido en COS que el suelo original sin enmendar, y sin embargo, mostró similar tasa de respiración que S (Figura III.4.). La mayor tasa de respiración se encontró para los suelos enmendados con DW en

laboratorio, siendo la más alta para DW10, de mayor COS (Tabla III.1.), seguido de los DW5 y OW10 enmendados en laboratorio (Figura III.4.).

III.4.3.-Estudios en laboratorio

III.4.3.1.-Estudios de adsorción

Las isothermas de adsorción para bentazona y S-metolacoloro en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y en laboratorio se muestran en la Figura III.5., y los coeficientes de adsorción tras ajustar los valores a la ecuación de Freundlich, en la Tabla III.2.

Bentazona es un herbicida ionizable. Su adsorción a las partículas del suelo se ve afectada por las variaciones de pH de la solución del suelo, ya que modifica el estado de ionización de la molécula. El estado de ionización de una molécula es crucial para evaluar los mecanismos de adsorción en el suelo (Calvet, 1989). Es un ácido débil ($pK_a = 3.2$) por lo que la adsorción en suelos es baja en general. En este estudio observamos valores para los coeficientes de Freundlich que se encuentran entre 0.032 y 1.70 (Tabla III.2.), confirmándolo. Por el contrario, S-metolacoloro mostró alta adsorción por los suelos presentando coeficientes de Freundlich entre 2.79 y 12.2 (Tabla III.2.). Tal y como se ha visto en el Capítulo II, este herbicida muestra una alta adsorción en general, tanto a partículas inorgánicas como orgánicas en los suelos (Shaner et al., 2006; O'Connell et al., 1998).

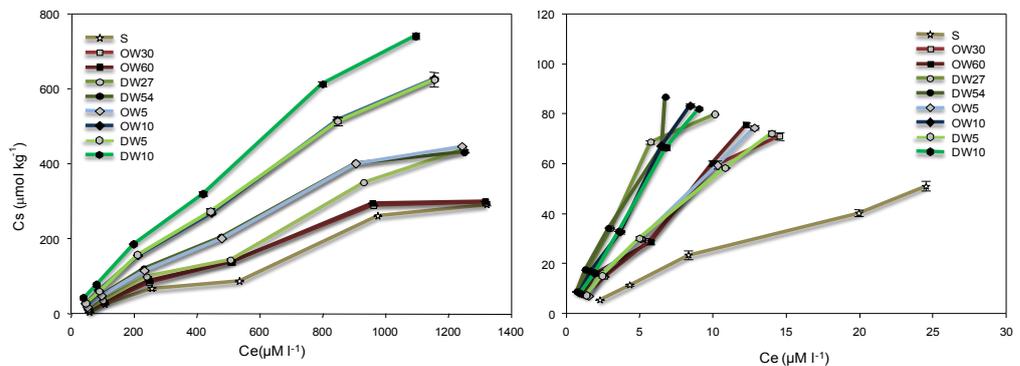


Figura III.5. Isothermas de adsorción para bentazona (izquierda) y S-metolacoloro (derecha) en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo con alperujo y orujo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).

La adición de OW y de DW a los suelos aumentó la capacidad de adsorción tanto de bentazona como de S-metolacloro si se compara con el suelo sin enmendar. Aunque los valores más altos se encontraron para el segundo, el incremento de adsorción para bentazona fue más intenso, mostrando hasta 50 veces más adsorción al enmendar con DW10, respecto al suelo original (Tabla III.2.).

El aumento en la adsorción de bentazona fue mayor para los suelos enmendados en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10), lo que puede ser atribuido al mayor contenido en componentes alifáticos en la MOS presente de los residuos poco transformados, respecto a los residuos madurados en campo tras 9 años de tratamiento (Chefetz y Xing, 2009). Barriuso et al. (2011) encontraron mayor capacidad de adsorción de MOS extraída de compost inmaduro, frente a otro de mayor grado de maduración. Sin embargo, en el caso de S-metolacloro no se observó una tendencia clara: el aumento en la adsorción fue mayor para los suelos enmendados en campo y con DW (DW30 y DW60) y para OW, el suelo enmendado en laboratorio, OW10 (Tabla III.2.).

No se ha encontrado correlación significativa entre los valores de Kf_{ads} y de COT ($r^2 = 0.38$) para bentazona, lo que está de acuerdo con los resultados presentados por Boivin et al. (2005), en un estudio que incluía 13 suelos agrícolas, y con los resultados de Romero et al. (1996). Por el contrario, Li et al. (2003) observaron que los coeficientes de distribución para bentazona en cinco suelos aumentaban con el contenido en materia orgánica del mismo, y por otro lado, Carrizosa et al. (2000) mostró un gran incremento en la adsorción de bentazona en esmectitas modificadas con cationes orgánicos (organoarcillas). Nuestros resultados mostraron una correlación positiva y significativa entre los valores de Kf_{ads} y el componente soluble de la materia orgánica (COS) ($r^2 = 0.96$) y una correlación fuertemente negativa entre Kf_{ads} y pH ($r^2 = 0.89$), ambos inversamente relacionados entre sí ($r^2 = 0.96$). Esto último estaría de acuerdo con estudios de adsorción de bentazona en suelos (Li et al., 2003; Boivin et al., 2005), e indican que la adsorción tiene lugar por medio de interacciones no específicas hidrofóbicas entre la forma molecular de bentazona y los sitios de adsorción.

S-metolacloro se adsorbe más a los suelos enmendados con DW en campo, y en los enmendados en laboratorio al 10% (p/p) (DW30, DW60 y DW10), de mayor contenido en COT, mostrando al contrario que para bentazona, correlación positiva entre los valores

de $K_{f ads}$ y de COT ($r^2=0.857$). Sin embargo, no se observó correlación con el contenido en COS ($r^2=0.0008$).

Tabla III.2. Coeficientes de adsorción para bentazona y S-metolacloro $K_{f ads}$, $n_{f ads}$, en el suelo sin enmendar y enmendado en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).

| Suelos | Bentazona | | | | S-metolacloro | |
|-------------|-----------|-------------------------|--------------|-------|---------------------|-------------|
| | R^2 | $K_{f ads}$ | $n_{f ads}$ | R^2 | $K_{f ads}$ | $n_{f ads}$ |
| S | 0.922 | 0.032 (0.011/0.097)* | 1.29±0.187** | 0.985 | 2.79 (1.63/3.95) | 1.06±0.078 |
| OW30 | 0.979 | 0.201 (0.128/0.314) | 1.05±0.076 | 0.994 | 5.27 (4.18/6.35) | 0.999±0.044 |
| OW60 | 0.977 | 0.265 (0.169/0.413) | 1.10±0.076 | 0.974 | 6.69 (5.52/7.86) | 0.939±0.088 |
| DW27 | 0.981 | 0.198 (0.128/0.315) | 1.09±0.075 | 0.959 | 10.4 (9.22/11.6) | 0.970±0.116 |
| DW54 | 0.984 | 0.509 (0.359/0.722) | 0.969±0.060 | 0.990 | 12.2 (11.1/13.3) | 0.968±0.055 |
| OW5 | 0.983 | 0.416 (0.287/0.603) | 1.00±0.064 | 0.984 | 5.06 (3.91/6.03) | 1.06±0.078 |
| OW10 | 0.993 | 0.782 (0.980/1.59) | 0.960±0.039 | 0.996 | 10.4 (8.37/11.4) | 1.03±0.039 |
| DW5 | 0.993 | 1.36 (0.588/0.925) | 0.964±0.039 | 0.994 | 5.81 (4.73/6.89) | 0.971±0.043 |
| DW10 | 0.998 | 1.70 (1.54/1.88) | 0.873±0.017 | 0.998 | 8.37 (7.37/9.41) | 1.05±0.025 |

*los números en paréntesis son las desviaciones estándar respecto a la media

**errores estándar respecto a la media

El efecto de la MOS sobre la adsorción de los plaguicidas en el suelo depende de la naturaleza de la misma, de la naturaleza del compuesto químico y de las propiedades físicas químicas del suelo (Cox et al., 2001, 2007). Mientras que en algunos casos las reacciones de adsorción de la MOS en las superficie del suelo aumentan la capacidad del suelo de adsorber moléculas de plaguicidas (Said-Pullicino et al., 2004), en otros casos la capacidad de adsorción de éstos se ve reducida debido a la competencia entre la MOS y las moléculas del herbicida por los sitios de adsorción en el suelo (Nelson et al., 1998; Celis et al., 1998; Cox et al., 2001, 2007), esto en parte podría explicar lo que ocurre con S-metolacloro en este estudio.

III.4.3.2.-Estudios de desorción

Las isotermas de adsorción-desorción se muestran en las Figuras III.6. y III.7. para bentazona y S-metolacloro, respectivamente. Los parámetros de desorción se muestran en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Coeficientes de desorción para bentazona y S-metolacloro K_{fdes} y n_{fdes} en el suelo sin enmendar y en los suelos enmendados en campo con alperujo y orujo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).

| Suelos | Bentazona | | | S-metolacloro | | |
|-------------|----------------|----------------------|--------------------|----------------|---------------------|--------------------|
| | R ² | K _{f des} | n _{f des} | R ² | K _{f des} | n _{f des} |
| S | 0.639 | 24.0* (7.60-76.0) | 0.345±0.183** | 0.986 | 3.09 (1.82-4.36) | 1.19±0.098 |
| OW30 | 0.651 | 19.5 (5.77-66.4) | 0.374±0.194 | 0.976 | 25.1 (24.1/26.2) | 0.389±0.043 |
| OW60 | 0.679 | 17.4 (5.23-57.9) | 0.397±0.190 | 0.966 | 40.7 (39.7/41.7) | 0.344±0.011 |
| DW27 | 0.644 | 10.3 (1.93-54.3) | 0.503±0.264 | 0.956 | 39.3 (38.2/40.5) | 0.295±0.044 |
| DW54 | 0.588 | 15.8 (3.03-82.2) | 0.443±0.262 | 0.937 | 69.5 (68.5/70.5) | 0.113±0.021 |
| OW5 | 0.649 | 17.2 (4.09-72.4) | 0.439±0.228 | 0.983 | 8.96 (7.77/10.1) | 0.819±0.075 |
| OW10 | 0.616 | 38.9 (3.69-143) | 0.374±0.208 | 0.961 | 26.0 (24.8/27.2) | 0.339±0.076 |
| DW5 | 0.640 | 22.7 (5.15-100) | 0.446±0.234 | 0.925 | 8.49 (7.15/9.83) | 0.537±0.108 |
| DW10 | 0.659 | 34.1 (2.12-53.9) | 0.418±0.213 | 0.194 | 68.4 (67.2/69.6) | 0.059±0.086 |

*los números en paréntesis son las desviaciones estándar respecto a la media

**errores estándar respecto a la media

Las isotermas de desorción para bentazona no se ajustaron bien a la ecuación de Freundlich ($R^2= 0.59-0.68$), pero en todos los casos (a excepción del suelo S para S-metolacloro) la pendiente de las isotermas de desorción fueron menores que las de adsorción ($n_{fdes} < n_{fads}$), lo que indica que la adsorción no es reversible para los herbicidas en estos suelos, al igual que lo encontrado en los estudios con S-metolacloro del Capítulo II de esta Memoria.

Nuestros resultados para bentazona no coinciden con los proporcionados por Boivin et al. (2004), quienes encontraron una muy alta reversibilidad en la adsorción de este herbicida. En su estudio, se usó bentazona marcada radiactivamente, por lo que atribuimos nuestros resultados a artefactos debido a las bajas concentraciones de bentazona adsorbidas (Tabla III.2.) (Koskinen y Cheng, 1983).

S-metolacloro se adsorbe más intensamente a los suelos enmendados con DW en campo, y en laboratorio al 10% (DW30, DW60 y DW10), de más altos contenidos de COT, al contrario que para bentazona una correlación positiva entre los valores de K_{fads} y de COT ($r^2= 0.857$). Sin embargo, no se observó correlación con el contenido en COS ($r^2=0.0008$).

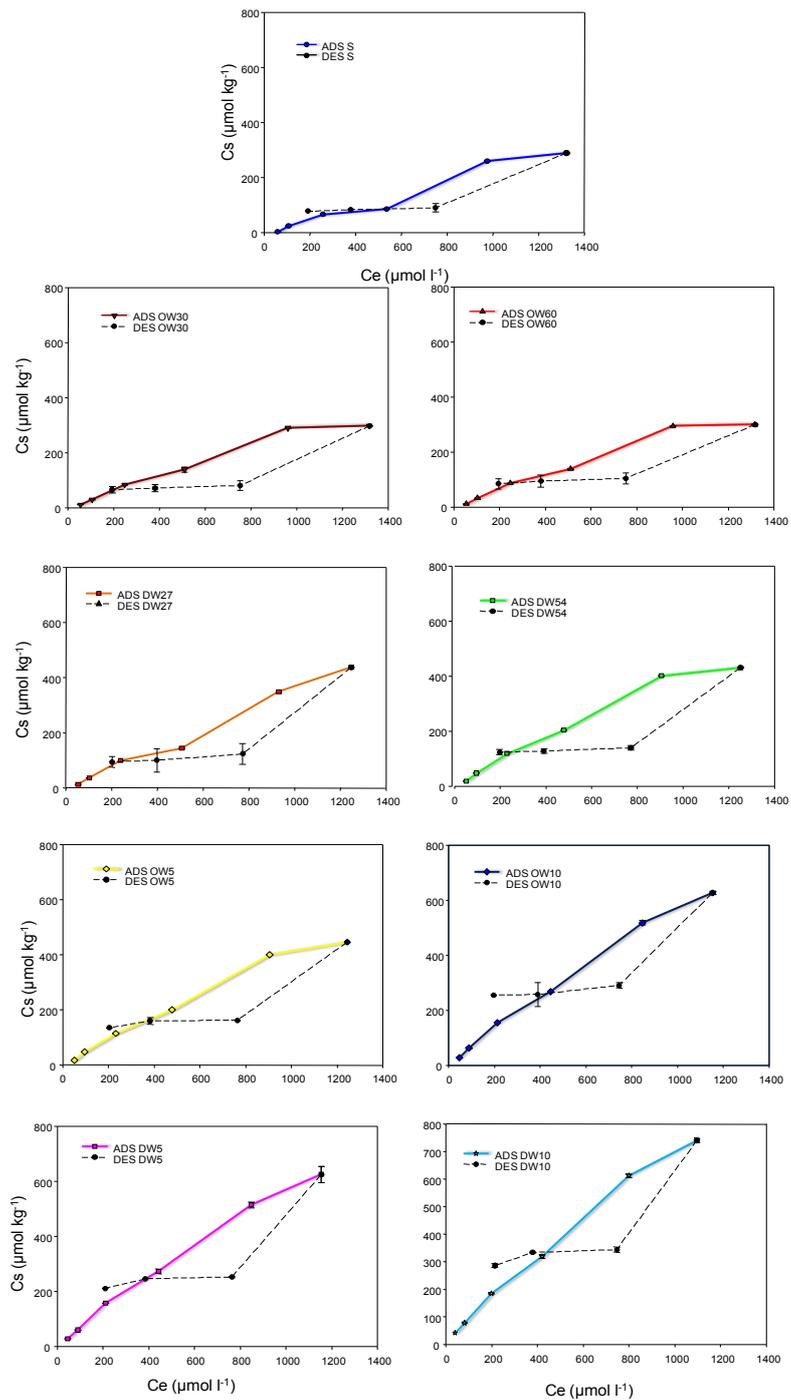


Figura III.6. Isotermas de adsorción-desorción para bentazona en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo con alperujo y orujo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).

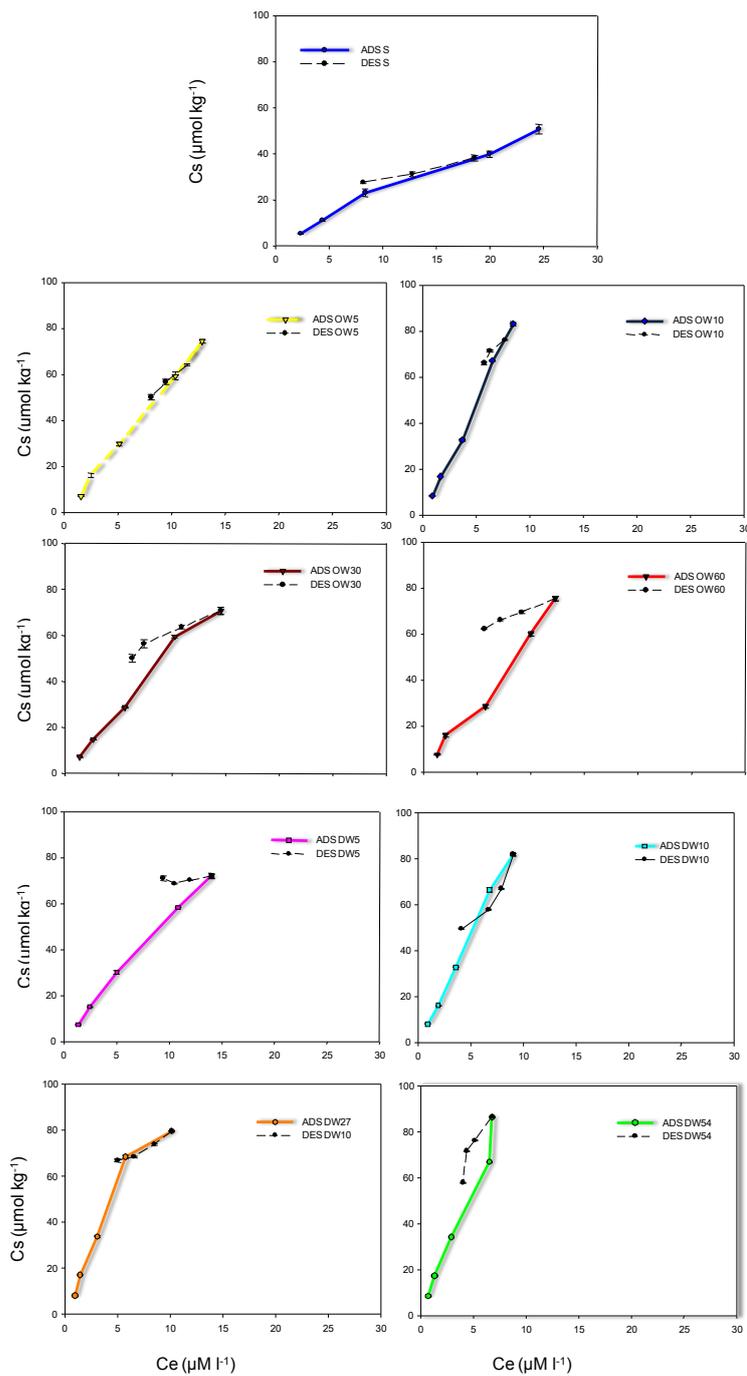


Figura III.7. Isothermas de adsorción-desorción para S-metolaclo en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo con alperujo y orujo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).

III.4.3.3.-Estudios de disipación-mineralización

Se monitorizó la disipación de bentazona y S-metolacoloro en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados con OW y DW en campo y en laboratorio. Las curvas de disipación se muestran en la Figura III.8. y las vidas medias ($T_{1/2}$) tras ajustar estas curvas a la cinética de primer orden se muestran en la Tabla III.4.

En el caso de los suelos enmendados en laboratorio con DW, no fue posible calcular las vidas medias para bentazona porque no se ajustaron a la cinética de primer orden debido a la ausencia de disipación durante los 42 días de incubación (Figura III.8.).

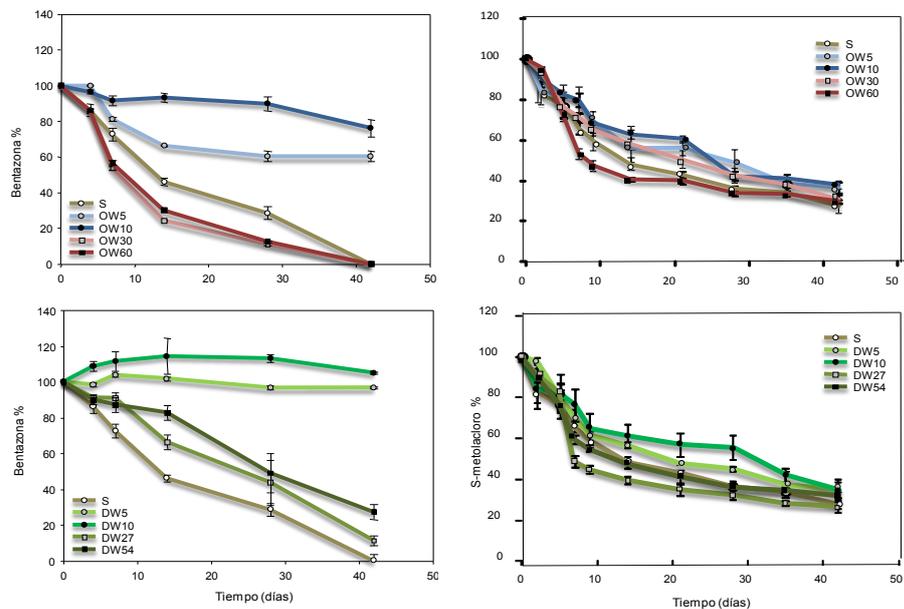


Figura III.8. Curvas de disipación para bentazona (izquierda) y S-metolacoloro (derecha) en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y laboratorio con OW (arriba) y DW (abajo).

En los suelos enmendados en el campo con OW, la vida media de bentazona fue similar a la del suelo sin enmendar. Por el contrario, las vidas medias de bentazona para los suelos enmendados con DW, se incrementaron por los factores de 2 y 3 para DW27 y DW54, respectivamente. Estos resultados indicaron una clara correlación entre la adsorción y la disipación en los suelos enmendados en campo, consecuencia de la limitada biodisponibilidad de la molécula de herbicida al aumentar la adsorción (Piutti et al., 2002).

Las vidas medias aumentaron hasta 18 veces en los suelos enmendados en el laboratorio, especialmente en el caso de OW10 (Tabla III.4.), aunque este gran aumento no puede explicarse tan sólo por un incremento de la adsorción. El alto contenido en COS puede ser responsable de esta menor disipación debido a que esta fracción de carbono constituye, como se ha mencionado antes, fuente de carbono lábil para los microorganismos del suelo, que prefieren usar esta fuente de carbono en lugar del herbicida.

S-metolacloro, el ajuste a una cinética de primer orden fue mejor que para bentazona ($R^2= 0.819-0.958$). No se encontraron en este caso diferencias importantes en su persistencia en los suelos enmendados respecto al suelo original (Tabla III.4.).

El estudio de mineralización sólo se realizó con bentazona y las curvas de mineralización en los suelos estudiados se muestran en la Figura III.9., y el porcentaje total mineralizado después de 28 días de incubación en la Tabla III.4.

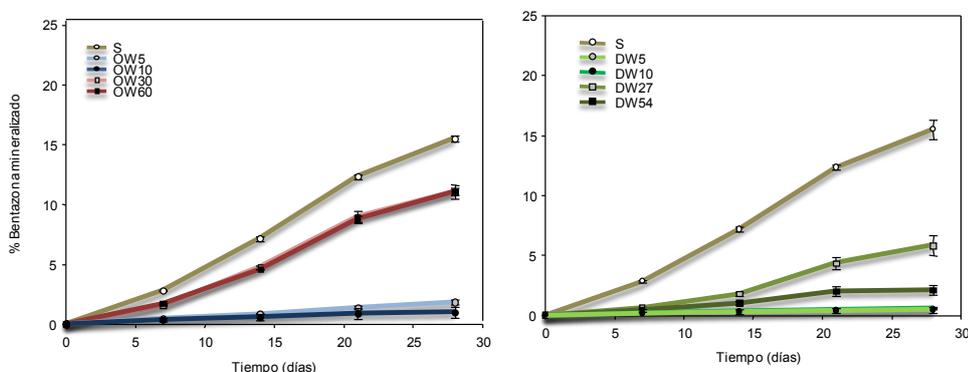


Figura III.9. Curvas de mineralización de bentazona en el suelo sin enmendar y enmendados con OW (izquierda) y DW (derecha).

La cantidad de bentazona mineralizada en el suelo sin enmendar fue similar a la registrada por Piuti et al. (2002) y ligeramente menor en los suelos enmendados en campo con OW. Los resultados obtenidos en los ensayos de mineralización están de acuerdo con los estudios de disipación, ya que se observa una menor mineralización en los suelos enmendados, especialmente en los enmendados en el laboratorio (Figura III.9.). Los microorganismos del suelo prefieren usar el COS de los residuos OW y DW, que la fuente de carbono que les proporciona el propio herbicida. Esto se ha demostrado previamente en trabajos con bacterias degradadoras de triazinas en suelos enmendados con alperujo (Albarrán et al., 2003; Cabrera et al., 2008). Por otro lado, el alto contenido en MOS de los

suelos enmendados en laboratorio (Tabla II.1) también es responsable del bajo pH de estos suelos, lo que se ha visto también que afecta negativamente a la degradación de bentazona (Rodríguez-Cruz et al., 2008).

Al finalizar el estudio de disipación-mineralización para bentazona, se procedió a la combustión de las muestras de suelo con el objeto de determinar la cantidad de residuos no extraíbles de bentazona. Los datos se recogen en la Tabla III.4.

Tabla III.4. Coeficientes de ajuste a una cinética de primer orden y vidas medias ($T_{1/2}$) para bentazona y S-metolacloro en el suelo sin enmendar y enmendados en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10). Porcentajes mineralizado de bentazona y de los residuos no extraíbles de la misma determinados por combustión durante el estudio de disipación.

| Suelos | Bentazona | | | | S-metolacloro | |
|-------------|----------------|----------------------------|---------------------|-------------------|----------------|----------------------------|
| | R ² | T _{1/2} (días) | Mineralizado (%) | Combustión (%) | R ² | T _{1/2} (días) |
| S | 0.854 | 6.97±1.19 | 15.5±0.221** | 80.8±0.308 | 0.937 | 24.5±1.40* |
| OW30 | 0.965 | 6.58±0.60 | 11.0±0.608 | 92.7±0.801 | 0.958 | 27.1±2.26 |
| OW60 | 0.956 | 6.61±1.12 | 11.1±0.287 | 99.9±1.02 | 0.819 | 26.4±0.460 |
| DW27 | 0.919 | 13.9±1.70 | 5.79±0.824 | 90.5±1.63 | 0.918 | 23.1±0.720 |
| DW54 | 0.961 | 22.7±2.10 | 2.09±0.417 | 105±0.461 | 0.896 | 26.6±2.09 |
| OW5 | 0.769 | 54.1±12.3 | 1.82±0.228 | 66.4±1.13 | 0.929 | 30.4±2.64 |
| OW10 | 0.864 | 127± 18.3 | 0.985±0.469 | 54.8±2.94 | 0.953 | 30.1±1.96 |
| DW5 | 0.386 | - | 0.513±0.055 | 67.0±0.950 | 0.932 | 28.2±2.12 |
| DW10 | 0.021 | - | 0.413±0.235 | 80.2±2.20 | 0.940 | 33.8±1.90 |

*los números en paréntesis son las desviaciones estándar respecto a la media

**errores estándar respecto a la media

II.4.3.4.-Monitorización de la actividad deshidrogenasa

La cuantificación de la biomasa microbiana y las actividades enzimáticas más típicas en el suelo, como la ureasa, la deshidrogenasa (ADH) y la catalasa entre otras, revelan información crucial de la bioactividad de suelos agrícolas frente a distintos manejos del suelo (Skujins et al., 1967; García et al., 1997). La actividades enzimáticas y la biomasa microbiana constituyen biomarcadores muy sensibles que rigen la funcionalidad de los suelos cuando se evalúa el impacto de distintas prácticas agrícolas (García-Orenes et al., 2010; Laudicina et al., 2011). Esto es posible ya que las enzimas presentes en los

suelos reaccionan frente a cambios en las condiciones del suelo más rápidamente que otras variables, siendo unos biomarcadores muy eficientes (Tejada et al., 2006).

En este estudio, la determinación de la ADH se llevó a cabo en los suelos sin enmendar y enmendados y en presencia de S-metolacoloro. Los datos se muestran en la Figura III.10., junto con las curvas de disipación.

Tras 42 días de estudio, la ADH mostró que la adición de enmienda no afecta negativamente a las poblaciones microbianas de los suelos, lo que corrobora los resultados de los estudios de respiración de los suelos (Figura III.4.). Se observa un aumento de ADH en torno a los 10 días de estudio para S enmendado en campo, tanto con OW como con DW, y en laboratorio sólo con el primero. Mientras que para los suelos enmendados con orujo (DW5 y DW10) se retrasa hasta los 20 días aproximadamente (Figura III.10.). Laudicina et al. (2011) y Tejada et al. (2006) también encontraron un aumento en ADH (Skujins et al., 1967; García et al., 1997) cuando se añade enmienda orgánica al suelo.

CAPÍTULO III. Efecto de residuos orgánicos transformados y no transformados en suelo sobre el comportamiento de los herbicidas bentazona y S-metolacolor. Estudios de adsorción, disipación, mineralización y actividad deshidrogenasa

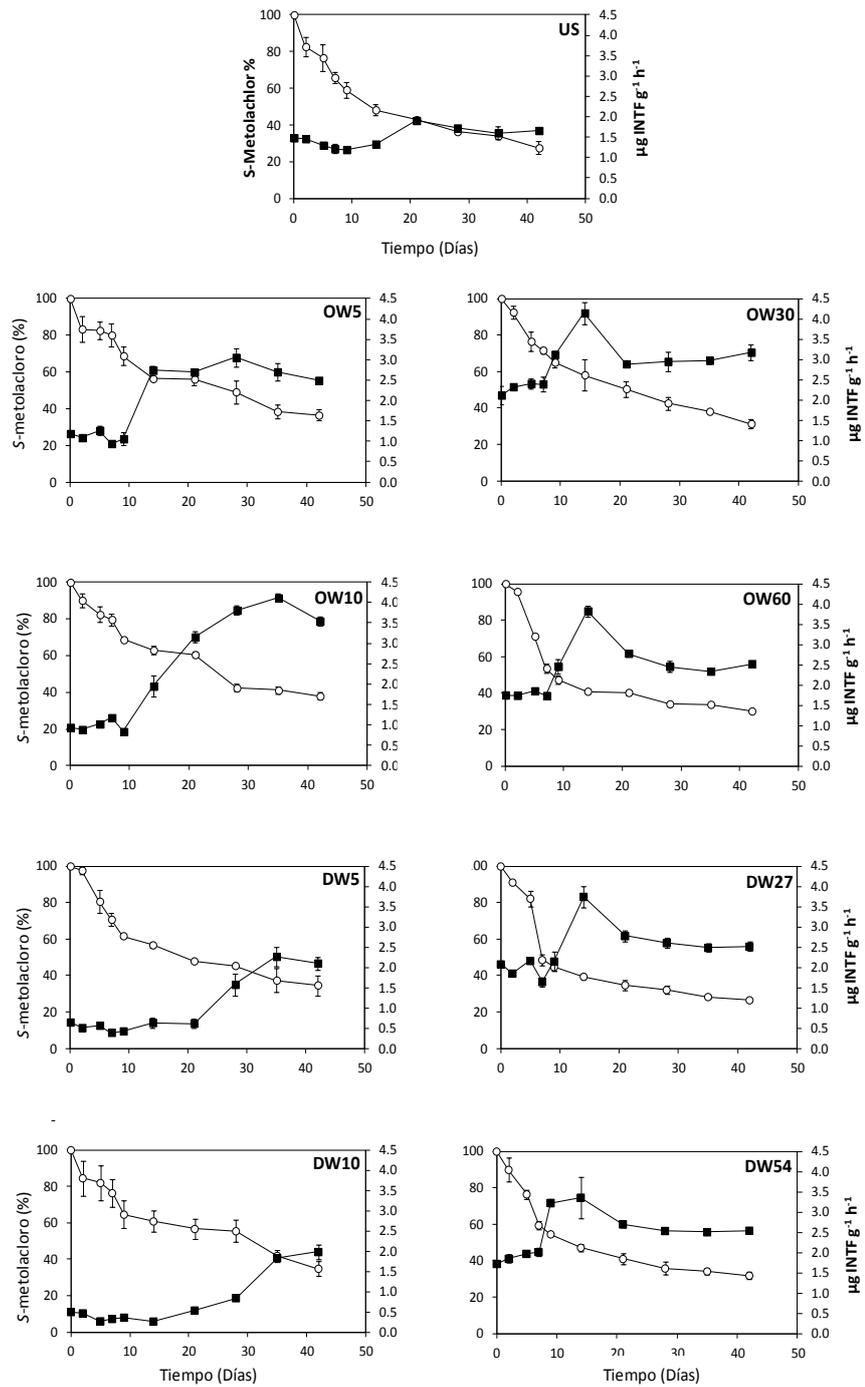


Figura III.10. Curvas de disipación de S-metolacolor (círculos blancos) junto con la monitorización de la actividad deshidrogenasa de los suelos usados (cuadrados negros).

II.4.3.5.-Estudios de lixiviación

La Figura III.11. muestra las curvas relativas y acumuladas de lixiviación de bentazona en los suelos sin enmendar y enmendados en el campo y en laboratorio con OW y DW). El total del herbicida lixiviado, el porcentaje extraído de las columnas empaquetadas a mano, y el total recuperado (lixiviado y extraído) se presentan en la Tabla III.5. Las Figuras III.12. y III.13. muestran el porcentaje de los herbicidas extraídos de las distintas columnas de suelo al finalizar el estudio de lixiviación.

Mientras que bentazona lixivió en todos los suelos estudiados, retrasando su inicio en los suelos enmendados, sólo se detectó S-metolacloro en los lixiviados del suelo S, sin enmendar, de menor capacidad de adsorción para este herbicida que los enmendados (Figura III.11.E.). Aunque el incremento en la adsorción no fue tan significativo para S-metolacloro como para bentazona, las interacciones entre las moléculas de herbicida y las partículas de suelo fueron más intensas, impidiendo su lixiviación en los suelos enmendados (Tabla III.2.).

La posición del máximo de lixiviación para bentazona en todas las curvas se encuentra cercano al valor de un volumen de poro (Figura III.11.), lo que es característico de sistemas de baja capacidad de adsorción y compuestos altamente móviles (Beck et al., 1993). En los sistemas más adsorbentes (OW10, DW5 y DW10) (Tabla III.6.) se observan desplazamientos de los máximos de lixiviación hacia la derecha de un volumen de poro (Figura III.11.). Además se observa un achatamiento de las curvas de elución en algunos suelos enmendados, que puede ser debido a que no se haya alcanzado un completo equilibrio durante el proceso de adsorción, lo que estaría de acuerdo con los resultados encontrados por Boivin et al. (2004) en un estudio sobre el efecto en el tiempo de residencia en suelo del herbicida en la adsorción de bentazona.

CAPÍTULO III. Efecto de residuos orgánicos transformados y no transformados en suelo sobre el comportamiento de los herbicidas bentazona y S-metolaclo. Estudios de adsorción, disipación, mineralización y actividad deshidrogenasa

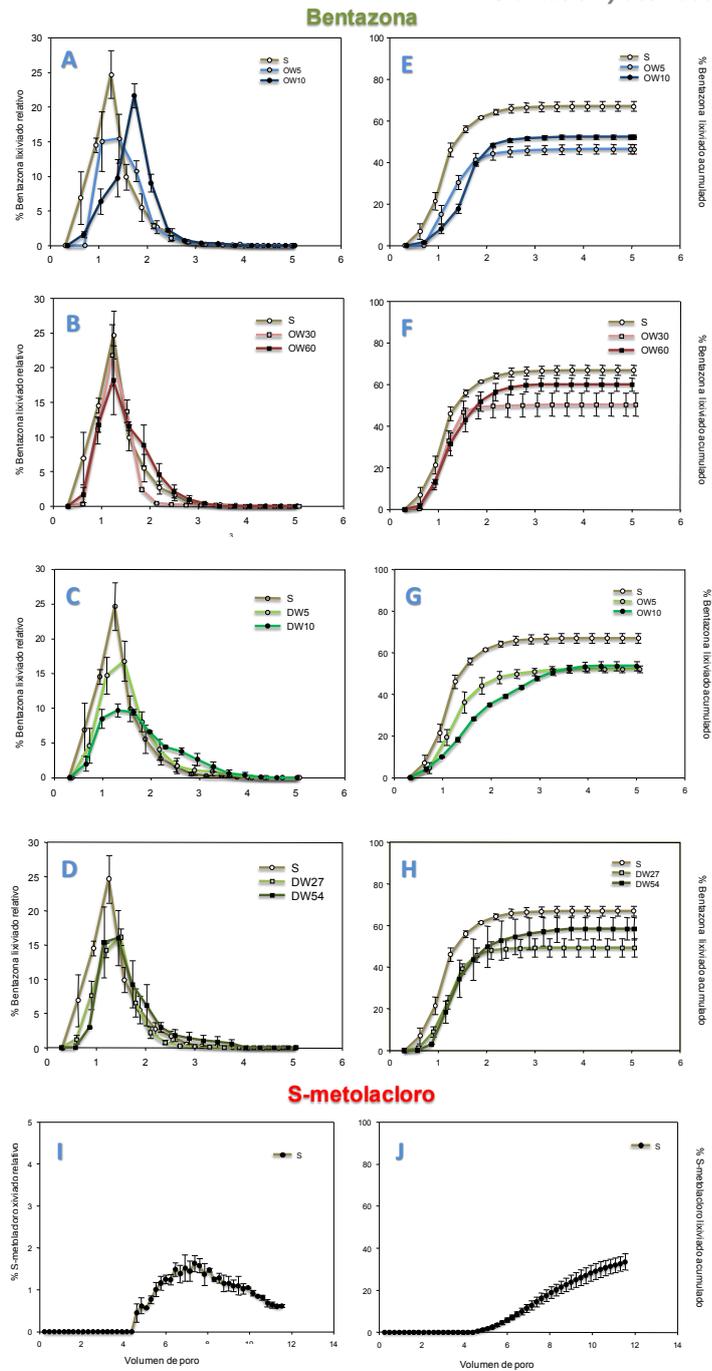


Figura III.11. Curvas relativas (A, B, C y D) y acumuladas (E, F, G y H) de lixiviación para bentazona en el suelo sin enmendar y enmendado en laboratorio y campo y curva relativa (I) y acumulada (J) en el suelo S para S-metolaclo.

Tabla III.5. Porcentaje de bentazona lixiviado, extraído, residual en las columnas de vidrio, de bentazona y S-metolacloro en los suelos estudiados.

| Suelos | Bentazona | | | S-metolacloro | | |
|-------------|---------------|--------------|-----------|---------------|--------------|-----------|
| | Lixiviado (%) | Extraído (%) | Total (%) | Lixiviado (%) | Extraído (%) | Total (%) |
| S | 66.9±2.39* | 15.3±1.89 | 82.2 | 37.8±4.2 | 15±1.02 | 52 |
| OW30 | 50.5±5.56 | 6.25±1.29 | 56.7 | - | 47±4.08 | 18 |
| OW60 | 60.1±3.11 | 3.37±0.070 | 63.5 | - | 52±1.58 | 52 |
| DW27 | 49.3±4.45 | 4.04±0.226 | 53.3 | - | 52±3.25 | 52 |
| DW54 | 58.4±5.37 | 3.82±1.21 | 62.2 | - | 58±4.09 | 58 |
| OW5 | 46.4±2.28 | 14.2±1.75 | 61.3 | - | 64±4.01 | 64 |
| OW10 | 52.2±0.980 | 11.8±1.57 | 64.0 | - | 86±6.57 | 86 |
| DW5 | 52.1±1.67 | 6.28±1.86 | 58.4 | - | 41±5.24 | 41 |
| DW10 | 53.6±2.62 | 2.94±0.494 | 56.5 | - | 55±3.65 | 55 |

*errores estándar respecto a la media

Tanto el sistema de poros que compone un suelo como los procesos de adsorción que en él se desarrollan, son responsables del tiempo de residencia de un herbicida en los suelos, lo que junto con los procesos de degradación determinará el total de herbicida lixiviado. En este estudio se encontró una reducción en la cantidad total de bentazona recuperada en todos los suelos enmendados, tanto el laboratorio como en campo (Tabla III.5). Si no se considera el incremento de la persistencia del herbicida en caso de los suelos enmendados en laboratorio con OW y DW, el aumento en la adsorción de bentazona y la disminución en el volumen de poro de gran tamaño, explicarían la menor lixiviación del herbicida en estos suelos. Por el contrario, en los suelos enmendados en campo, se encontró un aumento en la porosidad de los suelos, tanto en el rango de poro mayor estudiado, y como se muestra en esta Figura III.3. el volumen de poro en el menor rango estudiado (<1µm), lo que no explicaría una menor lixiviación del herbicida. Se sabe que estos poros corresponden con microporos y poros no conductores, donde los procesos que predominan son los de difusión (Pignatello y Xing., 1996). Los procesos de difusión en los poros tan pequeños, favorecen la adsorción, el entrapamiento físico y también la degradación, debido a que estos poros son fácilmente accesibles a las bacterias

(Pignatello y Xing., 1996) y constituye un motivo para esta baja recuperación del total de bentazona (Tabla III.5).

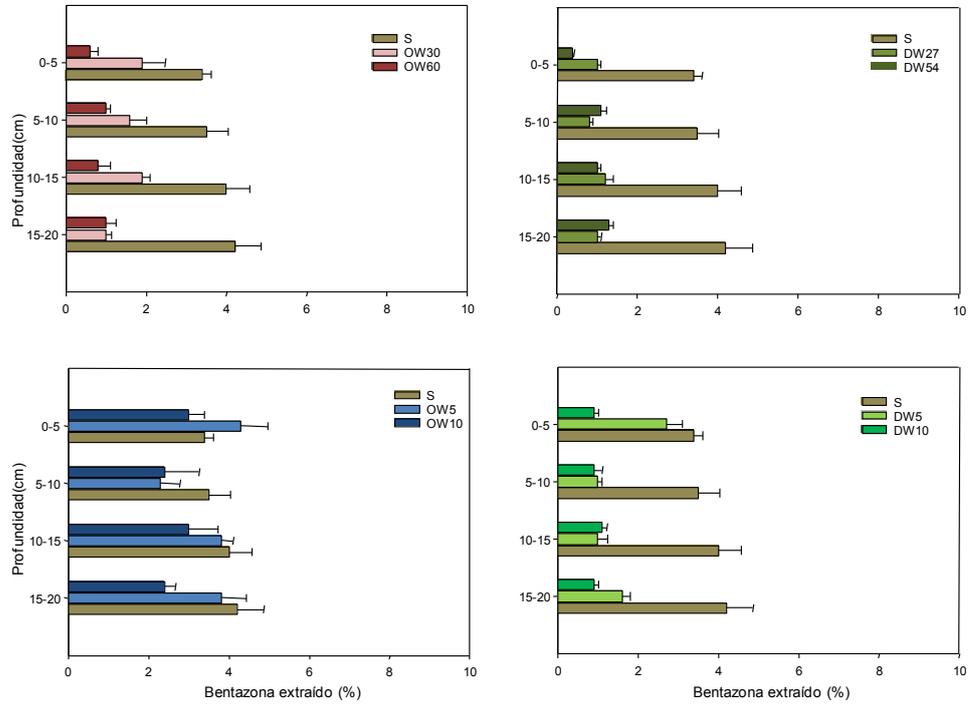


Figura III.12. Porcentaje de bentazona extraído de las columnas alteradas de suelo a distinta profundidades.

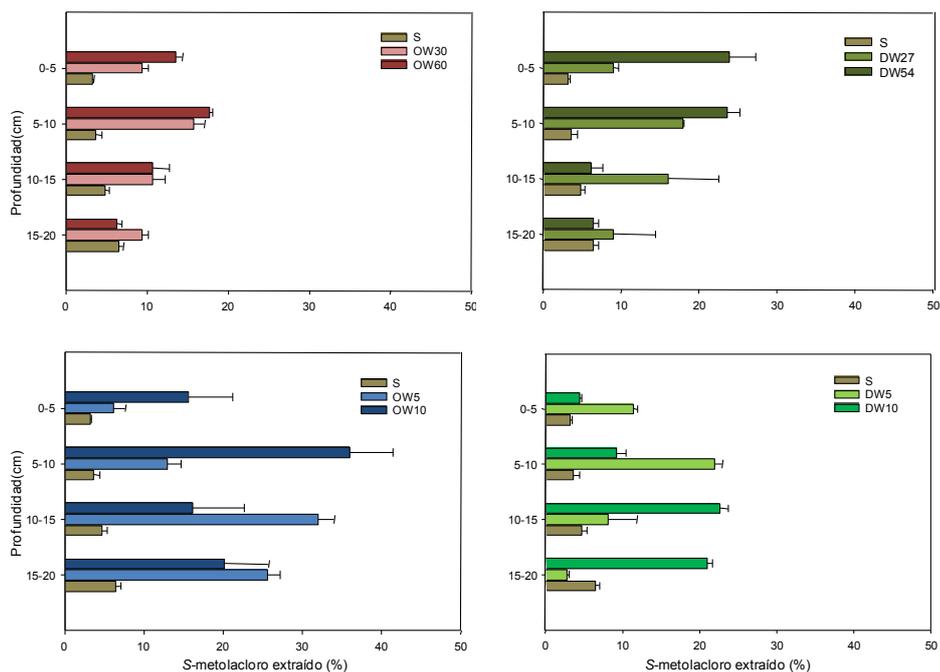


Figura III.13. Porcentaje de S-metolacloro extraído de las columnas de suelo a distinta profundidades.

III.4.5. Conclusiones

Todos los resultados obtenidos en el estudio con suelos enmendados en campo y laboratorio mostraron el distinto comportamiento de los plaguicidas en el suelo en estudios estáticos en laboratorio (batch y experimentos de disipación) y estudios dinámicos como son las columnas de suelo y debería ser considerado al extrapolar los resultados desde laboratorio hacia campo. El envejecimiento de la materia orgánica exógena añadida al suelo con las enmiendas, reveló diferencias, principalmente debido al contenido en MOS y la diferente porosidad de los sistemas.

III.5.-Bibliografía

- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñeiro, A., Ortega-Calvo, J.J., Cornejo, J. Effects of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use Manage.* **2003**, 19, 150-156.
- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñeiro, A., Cornejo, J. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere.* **2004**, 54, 717-724.
- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñeiro, A., Cornejo, J. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere.* **2004**, 54, 717-724.
- Albuquerque, J.A., González, J, Tortosa, G., Cegarra, J. Evaluation of “alperujo” composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation.* **2009**, 20, 257-270.
- Alleto, L., Coquet, Y., Benoit P., Heddadj, D., Barriuso, E. Tillage management effects on pesticide fate in soils. A review. *Agron. Sustan. Dev.* **2010**, 30, 367-400.
- Badaluco, L., Rao, M., Colombo, C., Palumbo, G., Laudicina, V.A., Gianfreda, L. Reversing agriculture from intensive to sustainable improves soil quality in a semiarid South Italian soil. *Biol. Fertil. Soils.* **2010**, 46, 481-489.
- Barriuso, E., Andrades, M.S., Benoit, P., Houot, S. Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from composts: experimental data and modelling approach. *Biogeochemistry.* **2011**, 106, 117-133.
- Beck, A.J., Johnston, A.E., Jones, K. C. Movement of nonionic organic chemical in agricultural soils. *Critical Reviews. Environ. Sci. Technol.* **1993**, 23, 3, 219-248.
- Boivin, A., Cherrier, R., Perrin-Ganier, C., Schiavon, M. Time effect on bentazone sorption and degradation in soil. *Pest. Manag Sci.* **2004**, 60, 809-814.
- Boivin, A., Cherrier, R., Schiavon, M. Bentazone adsorption and desorption on agricultural soils. *Agron. Sustan. Dev.* **2005**, 25, 309-315.
- Brown G. *The X-Ray Identification and Crystal Structures of clay Minerals*, (Ed. G. Brown). **1961**, Mineralogical Society, London.
- Cabrera, A., Cox, L., Koskinen, W.C., Sadowsky, M.J. Availability of triazine herbicides in

- aged soils amended with olive oil mill waste. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**, 56, 4112-4119.
- Cabrera, A., Cox, L., Fernández-Hernández, A., García-Ortiz Civantos, C., Cornejo, J. Field appraisalment of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2009**, 132, 260-266.
- Cabrera D., López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Peña, D. Direct and residual effects on diuron behaviour and persistent following two-phase olive mill waste addition to soil: field and laboratory experiments. *Geoderma.* **2010**, 157, 133-141.
- Calvet. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Perspec.* **1989**, 83, 145-177.
- Cañero, A.I., Becerra, D., Cornejo, J., Hermosín, M.C. Albarrán, A., López-Piñeiro, Cox, L. Transformation of organic wastes in soil: Effect on bentazone behaviour. *Sci. Total. Environ.* **2012**, 433, 198-205.
- Carrizosa, M.J., Calderón, M.J., Hermosín, M.C., Cornejo. Organosmectites as sorbent and carrier for the herbicide bentazone. *Sci. Total Environ.* **2000**, 247, 285-293.
- Celis, R., Barriuso, E., Houot, S. Sorption and desorption of atrazine by sludge amended soils: Dissolved organic matter effects. *J. Environ. Qual.* **1998**, 27, 1348-1356.
- Chefetz, B. y Xing, B. Relative role of aliphatic and aromatic moieties as sorption domains for organic compounds: A review. *Environ. Sci. Technol.* **2009**. 43, 1680-
- Cox, L., Celis, R., Hermosín, M.C., Becker, A., Cornejo, J. Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1997**, 65, 151-161.
- Cox, L., Cecchi, A., Celis, R., Hermosín, M.C., Koskinen, W.C., Cornejo, J. Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils: dissolved organic matter effect. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 65, 1688-1695.
- Cox, L., Fernandes, M.C, Zsolnay, A., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Changes in dissolved organic carbon of soil amendments with aging: effect on pesticide adsorption behavior. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 18, 5635-5642.
- Cox, L., Velarde, P., Cabrera, A., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Dissolved organic carbon interactions with sorption and leaching of diuron in organic-amended soils. *Eur. J. Soil Sci.* **2007**, 58, 714-721.

- Dousset, S., Babut, M., Andreux, D., Schiavon, M. Alachlor and bentazone losses from subsurface drainage of two soils. *J. Environ. Qual.* **2004**, 33, 294-301.
- Fernandes, M.C., Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Organic amendments affecting sorption, leaching and dissipation of fungicides in soils. *Pest Manag. Sci.* **2006**, 62, 1207-1215.
- García, C., Hernandez, T., Costa, C., Ceccanti, B., Masciandaro, G., Ciardi, C. A study of biochemical parameters of composted and fresh municipal wastes. *Bioresour. Technol.* **1993**, 44, 17-23.
- García, C. Hernandez, T., Costa C. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial, activity in degraded soils. *Sci. and Plant Anal.* **1997**, 28, 1-2, 123-134.
- García-Orenes, F., Guerrero, C., Roldán, A., Mataix-Solera, J., Cerdá, A., Campoy, M., Zornoza, R., Bárcenas, G., Caravaca, F., Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. **2010**, 109, 110-15.
- Gee, G.W. y Bauder, J.W. **1982**. Particle size analysis. In: Klute, A. (ed). *Methods of soil analysis, Part 1*, 2nd Ed. American Society of Agronomy. Madison, WI. Pp: 383-412.
- Goering, H.K. y Van Soest, P.J. **1970**. Forage fiber analysis: Apparatus, reagents, procedures, and some applications, *Agric. Handbook 379*. USDA-ARS, Washington, DC.
- SSS-ISRIC-FAO. **1994**. World reference base for soil resources, Draft Wageningen, Rome.
- Jackson K.L. *Soil Chemical Analysis Advanced Course* (ed. Jackson, M.L.) 2^a edn, Wiley-Interscience, Madison, **1975**.
- Kavdir, Y. y Killi, D. Influence of olive oil solid waste applications on soil pH, electrical conductivity, soil nitrogen transformations, carbon content and aggregate stability. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, 2326-2332.
- Komilis, D.P. y Ham, R.K. The effect of lignin and sugars to the aerobic decomposition of solid wastes. *Waste Manag.* **2003**, 23, 419-423.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Barata, C., Raldúa, D., Barceló, D. Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta.* **2008**, 15, 75, 2, 390-401.

- Lagana, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G., Marino, A. Occurrence and determination of herbicides and their major transformation products in environmental waters. *Ana. Chim.* **2002**, Acta 462,187-198.
- Laudicina, V.A.; Badalucco, L.; Palozzolo, E. Effects of compost input and tillage intensity on soil microbial biomass and activity under Mediterranean conditions. *Biol. Fertil. Soils.* **2011**, 47, 63-70.
- Li, K.B., Liu, W.P., Xu, D.M., Lee, S. Influence of organic matter and pH on bentazone sorption in soils. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 5362-5366.
- Liu, Z., Yan, X., Drikas, M., Zhou, D., Wang, D., Yang, M., Qu, J. Removal of bentazone from micro-polluted water using MIEX resin: kinetics, equilibrium, and mechanism. *J. Environ. Sci.* **2011**, 23, 3, 381-7.
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werrers, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., Gawlik, B.M. Pan-European Survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in groundwater. *Wat. Res.* **2010**, 44, 4115-4126.
- López-Piñero, A., Fernández, J., Rato Nunes, J.M., García, A. Response of soil and wheat crop to the application of two-phase olive mill waste to Mediterranean agricultural soils. *Soil Sci.* **2006**, 171, 728-736.
- López-Piñero, A., Albarrán, A., Nunes, J.M.R., Barreto, C. Short and medium-term effects of two-phase olive mill waste application on olive grove production and soil properties under semiarid Mediterranean conditions. *Bioresour. Technol.* **2008a**, 99, 7982-7987.
- López-Piñero, A., Fernández, J., Albarrán, A., Rato Nunes, J.M., Barreto, C. Effects of de-oiled two-phase olive mill waste on Mediterranean soils and the wheat crop. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2008b**, 72, 424-430.
- Nelson, D.V. y Sommers, L.E. **1982**. Total carbon, organic carbon, and organic matter. En: *Methods of Soil Analysis, Parte 2. Chemical and Biological Methods*, American Society of Agronomy and Soil Science of America, Madison, WI. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (eds.). pp. 539-579.
- Nelson, S.D., Letey, J., Farmer, W.J., Williams, C.F., Ben-Hur, M. Facilitated transport of napropamide by dissolved organic matter in sewage sludge-amended soil. *J.*

- Environ. Qual. **1998**, 27:1194-1200.
- O'Connell, P.J. Harms, C.T. Allen, J.R.F. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Protection*. **1998**, 17, 3, 207-2012.
- Pignatello, J.J. y Xing, B. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, 30, 1–11.
- Pignatello, J.J. Dynamic interactions of natural organic matter and organic compounds. *J. Soils Sediments*. Published online. **2012**.
- Piutti, S., Marchand, A.L., Lagacherie, B. Martin-Laurent, F.; Soulas, G. Effect of cropping cycles and repeated herbicide applications on the degradation of diclofopmethly, bentazone, diuron, isoproturon and pendimethalin in soil. *Pest. Manag. Sci.* **2002**, 58, 303-312.
- Qualls, R.G. Biodegradability of fractions of dissolved organic carbon leached from decomposing leaf litter. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 1616-1622.
- Rodríguez-Cruz. M.S., Jones J.E., Bending, G.D. Study of the spatial variation of the biodegradation rate of the herbicide bentazone with soil depth using contrasting incubation methods. *Chemosphere*. **2008**, 73, 1211-1215.
- Rodríguez-Lucena, P., Hernández, D., Hernández-Apaolaza, L., Lucena, J.J. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 1085–1092.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manag.* **2006**, 26, 960–969.
- Romero, E., Sánchez-Rasero, F., Peña, A., de la Colina, C., Dios, G. Bentazone leaching in Spanish soils. *Pest. Sci.* **1996**, 47, 7-15.
- Said-Pullicino, D., Gigliotti, G., Vella, A.J. Environmental fate of triasulfuron in soils amended with municipal waste compost. *J. Environ. Qual.* **2004**, 33, 1743-1751.
- Schnitzer, M.I. y Monreal, C.M. **2011**. Quo vadis Soil Organic Matter Research? A Biological Link to the Chemistry of Humification. En: *Advances in Agronomy* (Serie de libros) 113, 139-213.
- Shaner, D. L., Brunk, G., Belles, D., Westra, P., Niessen, S. Soil dissipation and biological activity of metolachlor and S-metolachlor in five soils. *Pest. Manage. Sci.* **2006**, 62, 617-623.

- Sims, J.R. y Haby, V.A. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil. Sci.* **1971**, 112, 137-141.
- Singh, P. y Ghoshal, N., Variation in total biological productivity and soil microbial biomass in rainfed agroecosystems: impact of application of herbicide and soil amendments. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2010**, 137, 241-250.
- Skujins, J. Extracellular enzymes in soil. *Critical Rev. Microbiol.* **1976**, 4, 383-421.
- Tejada, M., Hernández, M. T., García, C. Application of two organic amendments on soil Restoration: effects on the soil biological properties. *J. Environ. Qual.* **2006**, 35, 1010-1017.
- Tisdall, J.M. y Oades, J.M. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.* **1982**, 33, 141-163.
- Trevors, J.T. Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol. Biochem.* **1984**, 16, 673-674.
- United State Salinity Laboratory Staff, **1954**, Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils, US Department of Agriculture, Handbook n°60, Washington DC.
- Washburn, E.W. The dynamics of capillary flow. *Phys. Rev.* **1921**, 17, 273-283.

Capítulo IV

Efecto de la adición de alperujo y de los herbicidas terbutilazina y glifosato sobre la eficiencia fotosintética en plantas jóvenes de *Olea europaea* bajo condiciones de invernadero. Estudios de fluorescencia de la clorofila *a* e intercambio gaseoso

IV.1.-Introducción

El uso de herbicidas como terbutilazina o glifosato como productos fitosanitarios se encuentra recogido en la normativa por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MAGRAMA, 2012). Su uso en el olivar está autorizado por la Orden del 16 de febrero de 2012, por la que se modifica el Reglamento Específico de Producción Integrada de Olivar, aprobado por la Orden de 15 de abril de 2008.

Terbutilazina se usa como herbicida para el control de gran parte de las malas hierbas anuales, en sustitución de otro herbicida de la misma familia, la atrazina, cuyo uso fue prohibido por la CE en marzo de 2004 (2002/248/CE) debido a contaminación de aguas superficiales y subterráneas derivada de su uso. Su comportamiento en suelos se ve influenciado por la presencia de materia orgánica (Dolaptsoglou et al., 2008; Singh et al., 2001, 2002) endógena del mismo o la que aportan algunos residuos como pueden ser los residuos orgánicos de almazara usados para enmendar los suelos (Delgado-Moreno et al., 2007).

Glifosato es el herbicida más usado a nivel mundial desde 1974. Una vez en el suelo, es rápidamente degradado y así inactivado por parte de los microorganismos dando lugar a su metabolito AMPA (ácido aminometilfosfónico), el cual es más persistente y más fuertemente retenido que el compuesto del que proviene (Borggaard y Gimsing, 2008). Las moléculas de glifosato se adsorben fuertemente al suelo, principalmente a los coloides inorgánicos (Veiga et al., 2001; Borggaard y Gimsing, 2008) y se degrada rápidamente, por lo que el riesgo potencial de contaminación, debería ser bajo (Mamy y Barriuso, 2005; Laitinen et al., 2006). Sin embargo, varios estudios han revelado cantidades de glifosato y sus residuos por encima a las máximas permitidas en aguas superficiales y subterráneas (Carabías-Martínez, et al., 2003; IFEN, 2006; Arias-Estévez, et al., 2008; Hildebrandt, et al.2008).

El funcionamiento del aparato fotosintético en los organismos vegetales está determinado por factores como la presencia de agua, la temperatura, intensidad lumínica del medioambiente, así como por la propia predisposición genética de cada especie. Dentro de un rango óptimo de valores de temperatura o humedad en el

medio, el funcionamiento del aparato fotosintético de las plantas ocurre eficazmente, mientras que cuando se presentan temperaturas extremas, sequía e inundación, escasez de nutrientes, contaminación por metales pesados (Mateos-Naranjo et al., 2007) o contaminación por plaguicidas o residuos orgánicos (Catriona et al., 2003), pasan a constituir generadores de estrés para las plantas. En especial, el uso de plaguicidas puede llegar a reducir la capacidad de adquirir recursos en un cultivo y, por tanto, mermar su productividad (Saladín y Clement, 2005; Galmés et al., 2010).

La absorción de la energía lumínica por las moléculas de clorofila en los tejidos verdes de las plantas puede tomar 3 vías diferentes: puede ser utilizada para realizar la fotosíntesis (energía fotoquímica), puede ser disipada en forma de calor, o puede ser re-emitida como fluorescencia, evitando así daños estructurales permanentes en los sistemas fotosintéticos causados por el exceso de energía recibida. Si se producen modificaciones en la función fotosintética como respuesta a cambios ambientales, se ocasionarán variaciones detectables en la emisión de ésta última, de manera que una planta expuesta a altos niveles de estrés, que afecten directa o indirectamente a la funcionalidad de su aparato fotosintético, emitirá más fluorescencia que otra no expuesta a factores estresantes. Los parámetros de fluorescencia se pueden utilizar en la detección y cuantificación de daño en el aparato fotosintético así como en estudios de recuperación de los niveles de estrés cuando el agente de estrés ambiental desaparece. Es por ello que los cambios en la fotoquímica de un organismo vegetal como consecuencia de la exposición a un factor estresante, se pueden cuantificar a través de la **Fluorescencia del Fotosistema II (PSII)**, lo que se puede detectar in situ por sí sola o conjuntamente con la medida de intercambio gaseoso incluso antes de que se manifiesten cambios fisiológicos externos en la planta, siendo por tanto marcadores no destructivos de estrés en plantas (Haynes et al., 2000; Redondo-Gómez et al., 2007a, b).

Como se ha dicho anteriormente, a pesar de la alta eficiencia en los organismos diana, los herbicidas pueden ocasionar fitotoxicidad no específica (Dalton y Boutin, 2010; Galmés et al., 2010). En estudios anteriores se ha observado una la reducción en la eficiencia fotosintética de las plantas de los cultivos como consecuencia de factores estresantes medioambientales. El análisis de la **Fluorescencia de la clorofila a**

constituye una herramienta valiosa que permite explicar los niveles de estrés fisiológico de la vegetación antes de que aparezcan síntomas internos irreparables (Figueroa et al., 1997; Castillo et al., 2000; Sayed, 2003). Su cuantificación es una medida precisa y fiable de la temprana detección de estrés.

IV.2.-Objetivo

El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto que producen los herbicidas terbutilazina y glifosato sobre la eficiencia fotosintética de olivos de 3 años de edad bajo condiciones de invernadero. Y paralelamente se ha estudiado el efecto de la adición al suelo de un residuo procedente de almazara sobre la adsorción de estos herbicidas, y sobre la eficiencia fotosintética de los olivos.

IV.3.-Materiales y métodos

IV.3.1.-Herbicidas

IV.3.1.1.-Terbutilazina

La terbutilazina (N^2 -tert-butil-6-cloro- N^4 -etil-1, 3, 5-triazina-2, 4-diamina) (Figura IV.1) es un herbicida que pertenece a la familia de las s-triazinas. Es un polvo incoloro con peso molecular 229.7 g mol^{-1} , punto de fusión entre 177 y 179 °C, presión de vapor 0.15 mPa a 25 °C, coeficiente de partición octanol agua Kow log P = 3.21 (no ionizado) a 20 °C. Su solubilidad en agua es 8.5 mg l^{-1} (pH 7 y 20 °C). Terbutilazina es una base débil con $\text{pKa} = 2.0$, siendo estable en medio neutro e hidrolizándose en medio ácido o básico.

Se trata de un herbicida de amplio espectro, que se absorbe principalmente por la raíz aunque también débilmente a través de las hojas (Liñán, 2009), por lo que se usa tanto en pre- como en post-emergencia temprana, traslocándose a través del xilema hacia sus puntos de acción, para el control de malas hierbas en cultivos de maíz, sorgo, vides, árboles frutales, cítricos, olivos, patatas, caña de azúcar, entre otros cultivos. Actúa de forma sistémica en la reacción clorofílica, inhibiendo el transporte de electrones fotosintéticos en el receptor Fotosistema II (PSII) en plantas y por tanto de la absorción de CO_2 .

Persiste en la parte superior del suelo entre 30 y 90 días, según las propiedades físico-químicas del mismo (Worthing y Hance, 1991), controlando una amplia variedad de malas hierbas a dosis comprendidas entre 0.6 y 3 kg de sustancia activa por ha. Su uso en Europa se encuentra limitado a 1.5 kg ha⁻¹, siendo aplicado generalmente en combinación con otros herbicidas (Tomlin, 2006). En olivos no se puede aplicar más de 1 kg de i.a.ha y año. El producto comercial usado en este ensayo ha sido CUÑA (terbutilazina 500 g l⁻¹ en forma de suspensión concentrada suministrado por Sipcam Inagra S.A.).

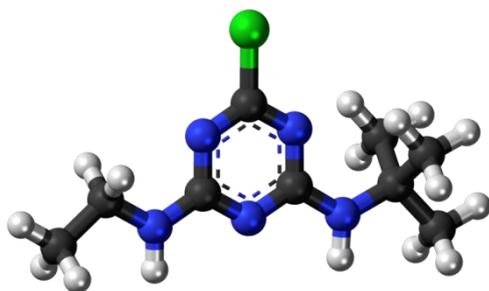


Figura IV.1. Estructura química de la molécula de terbutilazina. Círculos grises: átomos de carbono; azules: nitrógeno y verde: cloro.

IV.3.1.2.-Glifosato

Glifosato (*N*-(fosfonometil) glicina) (Figura IV.2.) es un herbicida sistémico perteneciente a la familia de las glicinas. Aparece en forma de cristales incoloros, con peso molecular de 169.1 g mol⁻¹ y presenta una solubilidad en agua 10.5 g l⁻¹ (pH 1.9 y 20 °C), y muy baja solubilidad en disolventes orgánicos.

El glifosato es un herbicida no selectivo de absorción fundamentalmente foliar que se trasloca fácilmente por el floema hacia los órganos subterráneos por medio de difusión pasiva (Liñán, 2009). Sin embargo, también se ha detectado absorción a través de las raíces (Coupland y Lutman., 1982; Rodrigues et al., 1982). Es especialmente efectivo contra malas hierbas perennes al acumularse en el tejido meristemático de los tallos, raíces y órganos de almacenamiento. Actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa, que controla la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales como triptófano, fenilalanina y tirosina, junto a otros importantes productos químicos endógenos como lignina, fenoles, y ácido

indolacético. Es el único herbicida de entre los que actualmente se comercializan, que afecta a la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Además se sabe que inhibe la síntesis del ácido δ -aminolevulínico, bloqueando la síntesis de clorofila y otras porfirinas (Li et al., 2005).

Para realizar estudios de adsorción bajo condiciones de laboratorio se usó glifosato marcado radiactivamente (P-Metileno- C^{14}) con una actividad específica de 11.4 Bq mg^{-1} suministrado por IZOTOP (Budapest, Hungría). La formulación comercial del herbicida para los estudios con los olivos, bajo condiciones de invernadero fue GLIALKA (36 g de componente activo por litro) y fue suministrado por Presmar S.L. España.

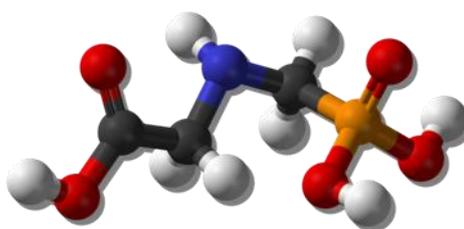


Figura IV.2. Estructura química tridimensional de la molécula de glifosato. Amarillo: átomo de fósforo; rojo para los oxígenos, azul: nitrógeno y gris para los átomos de carbonos.

IV.3.2.-Tratamiento de las plantas

Se seleccionaron plantas de *Olea europaea* L. de tres años de edad en macetas de plástico de 26 cm de profundidad y 15 cm de diámetro que se rellenaron con suelo arenoso (H). Las macetas se emplazaron en un invernadero perteneciente a la Universidad de Sevilla, bajo unas temperaturas mínima de 21 y máxima de 25 °C, iluminación diaria natural con flujo de luz entre 200 y 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una humedad relativa de entre 40 y 60% (Figura IV.3.).

Se realizaron cinco tratamientos distintos por triplicado: macetas tratadas con terbutilazina a la dosis de 3 kg ha^{-1} (T), macetas tratadas con glifosato a la misma dosis (G), macetas a las que se le añadió alperujo (AJ) al suelo a la dosis de 10 Mg ha^{-1} , macetas con terbutilazina y AJ (TJ) y macetas con glifosato y AJ (GJ). Además se usaron tres macetas sin herbicida ni residuo orgánico como controles (C) a lo largo del ensayo.

Para los tratamientos AJ, TJ y GJ se extrajo suelo de aproximadamente los primeros 5 cm del contenido en las macetas que se mezcló con la cantidad de AJ necesaria para aplicar la dosis de 10 Mg ha^{-1} (18 g) a cada olivo. Esta mezcla se homogeneizó y aplicó en la superficie de las macetas. Los herbicidas se aplicaron en la superficie de las macetas 24 h después de la aplicación del residuo. Con objeto de obtener triplicados con biomasa similar para cada uno de los cinco tratamientos, la longitud de cuatro ramas por maceta y de dos hojas por cada una de estas ramas fueron medidas y analizadas estadísticamente.



Figura IV.3. Olivos para el ensayo en el interior del invernadero.

IV.3.3.-Suelo y residuo orgánico

El contenido de CO, pH y textura de suelo de las macetas fueron determinadas siguiendo la metodología descrita en el apartado II.3.3.1. y se recogen en la Tabla IV.2. El residuo orgánico usado fue el alperujo Jaén (AJ), con un contenido en MO del 81% y pH 6.7, subproducto de la extracción de aceite de oliva a través del proceso de centrifugación en dos fases, usado anteriormente para los estudios desarrollados en el Capítulo II.

IV.3.4.-Estudios de adsorción y análisis de los herbicidas

Duplicados de 5 g de suelo sin enmendar y enmendados con AJ al 5% y 10% (p/p) fueron tratados de forma separada con 10 ml de terbutilazina y de glifosato a las C_i de 1, 5, 10 y 20 μM en ClCa_2 (0.01 M). Las suspensiones se trataron y se analizaron siguiendo las metodologías descritas en los apartados II.3.4.1. y II.3.1.3. del Capítulo II. La fase móvil para el análisis de terbutilazina fue una mezcla de acetonitrilo/agua ultrapura Mili-Q (50:50) y el compuesto se detectó a la longitud de onda de 222 nm en el HPLC. En el caso de glifosato, el análisis se realizó por LSC.

IV.3.5.-Medida de fluorescencia de la clorofila a

La fluorescencia de la clorofila a se midió en un total de 9 hojas por olivo (tres por cada rama) usando un fluorímetro modulado portátil (FMS-2, Hansatech Instrument Ltd., Inglaterra) (Figura IV.4.) tras 24 horas, 15 y 60 días desde el tratamiento, con el objeto de conocer la respuesta fisiológica de los olivos en un periodo corto y medio de tiempo de exposición al mismo. Se determinaron los parámetros de fluorescencia a la luz (cinética lenta de la fluorescencia de la clorofila) y tras un periodo de adaptación a la oscuridad (cinética rápida de la fluorescencia de la clorofila), tanto al amanecer (entre 1 y 7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) como al mediodía (1700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con el fin de determinar si el herbicida, el residuo orgánico o la combinación de los dos afectaba a la sensibilidad de las plantas frente la fotoinhibición. Para ello los olivos fueron adaptados a la oscuridad durante 30 minutos usando unas pinzas diseñadas para este propósito. El primer parámetro que se registra en la curva de emisión de la cinética rápida de la fluorescencia es la fluorescencia basal (F_0).

Además en este estudio se determinaron la fotoinhibición crónica (PI_{chr}) y la fotoinhibición dinámica (PI_{din}) (Werner et al., 2002), calculadas como:

$$\Phi_{\text{PSII}} = \frac{F_{m'} - F_s}{F_{m'}} \quad (\text{Genty et al., 1989}) \quad \text{Ecuación IV.1.}$$

$$qP = \frac{F_{m'} - F_s}{F_{m'} - F_0} \quad \text{Ecuación IV.2.}$$

$$NPQ = \frac{F_m - F_{m'}}{F_{m'}} \quad (\text{Schreiber et al., 1986}) \quad \text{Ecuación IV.3.}$$

$$PI_{\text{dyn}} = \frac{(F_v/F_m)_d - (F_v/F_m)_{\text{mid}}}{(F_v/F_m)_{\text{max}}} \times 100 \quad (\text{Werner et al., 2002}) \quad \text{Ecuación IV.4.}$$

Donde $(F_v/F_m)_d$ y $(F_v/F_m)_{\text{mid}}$ son los valores de F_v/F_m al amanecer y al mediodía, respectivamente. $(F_v/F_m)_{\text{max}}$ es el valor máximo de F_v/F_m , se tomó la media de las medidas del tratamiento control al amanecer al día siguiente de la aplicación de los herbicidas. También se calculó el quenching no fotoquímico (NPQ) a través de la Ecuación IV.4.



Figura IV.4. Fluorímetro modulado portátil.

IV.3.6.-Medida de intercambio gaseoso

El análisis de intercambio gaseoso se realizó con un analizador de gases por infrarrojo (IRGA) (Figura IV.5.) en sistema abierto y conectado a una cámara para hojas (LI-COR Biosciences Inc. LI- 6400, Lincoln, Nebraska, USA). Las medidas se tomaron en hojas completamente desplegadas elegidas al azar después de 24 horas, 15 y 60 días desde el tratamiento, coincidiendo con las medidas de fluorescencia de la clorofila *a*. Se determinó la tasa de fotosíntesis neta (*A*), la concentración de CO₂ intercelular (*C_i*) y la tasa de conductancia estomática al CO₂ (*G_s*) de 365 μmol mol⁻¹, en un rango de temperatura en torno a 25-28 °C, humedad relativa del aire de 50 ± 5 % y a una intensidad lumínica de 1000 μmol m⁻² s⁻¹.

CAPÍTULO IV. Efecto de la adición de alperujo y de los herbicidas terbutilazina y glifosato sobre la eficiencia fotosintética en plantas jóvenes de Olea europaea bajo condiciones de invernadero. Estudios de fluorescencia de la clorofila a e intercambio gaseoso

Los valores de A, G_s and C_i fueron calculados usando las fórmulas estándar de Von Caemmerer y Farquar. (1981). El área fotosintética fue calculada a partir del dibujo de la superficie de cada hoja sobre la superficie de un papel milimetrado.

$$A = \frac{F [(CO_2)_e - (CO_2)_s]}{S} \times \frac{P}{0.083(273 + T) \times 10^4 \times 60} \quad \text{Ecuación IV.5.}$$

$$\frac{1}{G_s} = \frac{1.61}{GH_{2O_{est}}} + \frac{1.37}{GH_{2O_{cl}}} \quad \text{Ecuación IV.6.}$$

$$C_i = \frac{(C_e - A)}{G_s} \quad \text{Ecuación IV.6.}$$

Siendo:

F= flujo (l min⁻¹)

(CO₂)_e = CO₂ a la entrada de la cámara (μmol mol⁻¹)

(CO₂)_s = CO₂ a la salida de la cámara (μmol mol⁻¹).

S = superficie fotosintética (cm²) calculada para cada hoja. La superficie de hoja introducida en la cámara del IRGA se calculó mediante su aproximación al área de un trapecio.

P= presión atmosférica (atmósferas).

T= temperatura del aire en la cámara (°C).

G_{H₂O_{est}} = conductancia estomática al agua (mol m⁻² s⁻¹).

G_{H₂O_{cl}} = conductancia de la capa límite al agua (mol m⁻² s⁻¹).

C_e = concentración de CO₂ externo (en la cámara) (μmol mol⁻¹).

C_i = concentración de CO₂ intracelular (en la hoja) (μmol mol⁻¹).



Figura IV.5. Analizador de gases por infrarrojo (IRGA) usado para las mediciones durante el experimento.

IV.3.7.-Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el programa Statistica versión 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). La comparación de medidas se realizó por medio de análisis de varianza de una y dos vías (ANOVA; F-test). Cuando el resultado del análisis de varianza fue significativo se identificaron las diferencias más importantes mediante el Test de Tukey (Day y Quinn, 1989).

IV.4.-Resultados y discusión

IV.4.1.-Suelo y residuo orgánico

El contenido en CO, el pH y textura del suelo H sin enmendar y enmendado al 5% y 10% (p/p) con el alperujo, se muestran en la Tabla IV.1. El alperujo (AJ) usado fue caracterizado en el Capítulo I de esta memoria (apartado II.4.1).

La adición de AJ incrementó el contenido de CO del suelo 2 y 2.7 veces para H5J y H10J respectivamente, respecto al suelo original, coincidiendo con otros autores (Alburquerque et al., 2004, 2009; Cabrera et al., 2009). Aunque el pH se redujo al enmendar con AJ (Tabla IV.1), la reducción fue menor que la encontrada en otros estudios con estos residuos (Roig et al., 2006).

Tabla IV.1. Propiedades físico-químicas del suelo contenido en las macetas, sin enmendar (H) y enmendado al 5% y 10% (p/p) con AJ (H5J y H10J, respectivamente).

| Suelos | CO (%) | pH (H ₂ O) | Arcilla | Limo (%) | Arena |
|--------|--------|-----------------------|---------|----------|-------|
| H | 1.9 | 7.4 | 18 | 22 | 59 |
| H5J | 3.7 | 7.1 | | | |
| H10J | 5.4 | 6.7 | | | |

IV.4.2.-Adsorción

Las isotermas de adsorción de terbutilazina y de glifosato se muestran en la Figura IV.6. y los coeficientes de adsorción de cada herbicida en el suelo sin enmendar y enmendado con el alperujo a las dosis de 5% y 10% (p/p) (H5J y H10J) se muestran en la Tabla IV.2.

Glifosato se adsorbe al suelo sin enmendar (H) alrededor de 5 veces más que terbutilazina (5.13 respecto a 0.960 mg^{-1/nf} kg⁻¹ ml^{-1/nf}), sin embargo no se detectaron diferencias significativas en la capacidad de adsorción de glifosato al enmendar los suelos con alperujo al 5% y 10% (H5J y H10J) (Tabla IV.2., Figura IV.6.). Esto se atribuye a que glifosato se adsorbe fuertemente a lo suelos, y que ésta interacción ocurre principalmente con los coloides inorgánicos de los mismos (Veiga et al., 2001; Borggaard y Gimsing, 2008). Por el contrario, sí se encontró que la adición de alperujo

al suelo aumentó la adsorción de la terbutilazina respecto al suelo original por un factor de 1.4 y 7.9 en H5J y H10J, respectivamente (Tabla IV.2.). Terbutilazina presenta una baja solubilidad en agua (8.5 mg l⁻¹) y como consecuencia, alta afinidad por la fracción hidrófoba de la materia orgánica de los suelos, que explica el aumento de adsorción al enmendar H con los residuos orgánicos, que no se vio para el herbicida glifosato. Esto se ha demostrado en trabajos anteriores (Celis et al., 1998; Cabrera et al., 2007, 2009; Krawariti et al., 2010). A medida que aumenta la capacidad de adsorción del herbicida, menor cantidad de moléculas de terbutilazina pueden ser absorbidas por la plantas, reduciendo o evitando desencadenar un efecto tóxico sobre las mismas.

Tabla IV.2. Coeficientes de adsorción para terbutilazina y glifosato en el suelo sin enmendar (H) y enmendados al 5% y 10% con alperujo (H5J y H10J).

| Herbicidas | Suelos | R ² | K _f (mg ^{-1/nf} kg ⁻¹ ml ^{-1/nf}) | 1/n _f |
|---------------|--------|----------------|---|------------------|
| Terbutilazina | H | 0.859 | 0.964 (0.622/1.49)* | 0.57±0.230** |
| | H5J | 0.938 | 1.38 (1.09/1.76) | 0.696±0.131 |
| | H10J | 0.899 | 7.68 (5.34/9.68) | 0.865±0.253 |
| Glifosato | H | 0.999 | 5.130 (4.79/5.49) | 0.832±0.090 |
| | H5J | 0.999 | 5.44 (5.29/5.64) | 0.812±0.045 |
| | H10J | 0.999 | 5.411 (5.19/5.63) | 0.780±0.050 |

*Los números entre paréntesis son desviaciones estándar respecto a la media

**Los números son medidas de nf ± desviación estándar.

La molécula del glifosato presenta 3 grupos funcionales polares: un grupo carboxilo, otro amino y un tercer grupo fosfato (Figura IV.2.), que determinan que su adsorción ocurra preferentemente en la fase mineral del suelo (principalmente en minerales de arcilla con carga variable), siendo fuertemente adsorbido a éstos componentes y convirtiéndose en una molécula fundamentalmente inmóvil en el suelo (Vereecken., 2005; Mamy y Barriuso., 2007; Borggaard y Gimsing., 2008). Cuando los valores de pH de la solución del suelo se encuentran comprendidos entre 4 y 8, como ocurre el caso de los suelos H, H5J y H10J (Tabla IV.1.), las moléculas de glifosato presentan gran afinidad por cationes trivalentes como Fe³⁺ y Al³⁺. A través de su grupo

fosfato, glifosato se adsorbe fuertemente a hidróxidos de aluminio y hierro de los suelos, formando Al-O-P y Fe-O-P, compitiendo por los mismos sitios de adsorción que el fósforo inorgánico (Laitinen et al., 2009; Borggaard y Gimsing., 2008). Esto explica que el aumento en contenido de CO no afecte a la adsorción del glifosato en la medida en que ocurre con terbutilazina. Sin embargo, Mc Bride. (1991) y Yu y Zhou. (2005) encontraron que glifosato se puede unir a la materia orgánica a través de puentes de iones metálicos a pesar de su alta solubilidad en agua y bajo coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}) ($Sol.= 10.5 \text{ g l}^{-1}$; $K_{ow}=-4$).

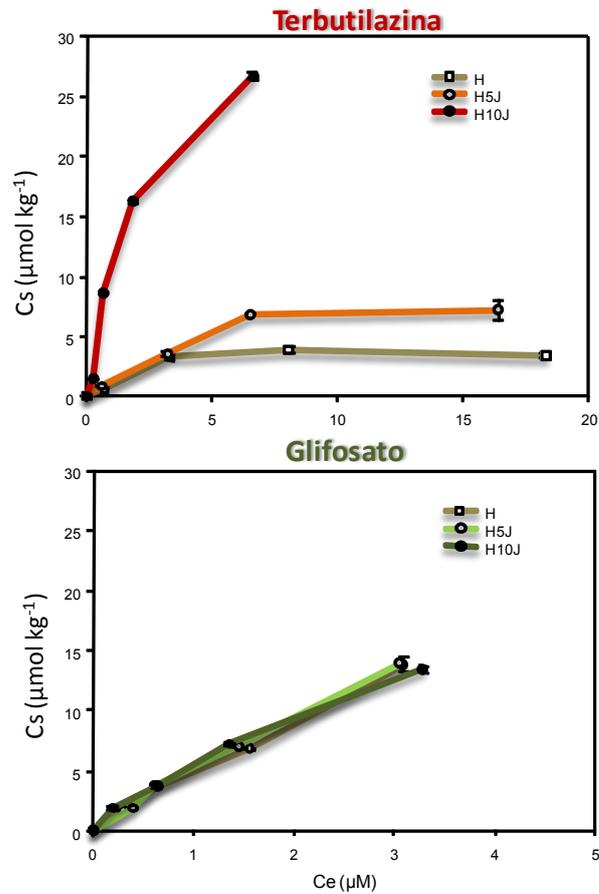


Figura IV.6. Isothermas de adsorción de terbutilazina (arriba) y de glifosato (abajo) en el suelo (H) sin enmendar y enmendados al 5% y 10% con alperujo (H5J y H10J).

IV.4.3.-Fluorescencia

La eficiencia fotoquímica potencial del PSII ($F_vF_m^{-1}$), la eficiencia real del PSII (Φ_{PSII}) y el quenching no fotoquímico (NPQ) medidos al mediodía para los tratamientos C, AJ, T, G, TJ y GJ, a las 24 horas, 15 y 60 días después de la aplicación de los herbicidas, se muestran en la Figura IV.7. La eficiencia fotoquímica potencial del PSII ($F_vF_m^{-1}$) al amanecer tras 60 días en *Olea europaea* L. se muestra en la Figura IV.8. No se muestran los datos de $F_vF_m^{-1}$, Φ_{PSII} y el NPQ al amanecer tras 24 horas, 15 y 60 días, ya que no se observaron diferencias significativas para los distintos tratamientos (ANOVA, $P > 0.05$).



Figura IV.7. Eficiencia fotoquímica potencial del PSII ($F_vF_m^{-1}$) (A-C), Eficiencia real del PSII (Φ_{PSII}) (D-F), y quenching no fotoquímico (NPQ) (G-I) medidos al mediodía en los tratamientos de *Olea europaea* tratados con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TJ) tras: 24 horas (A, D, G); 15 días (B, E, H); y 60 días (C, F, I). Los valores representan la media \pm SE, $n = 9$. Las distintas letras indican que las medias son significativamente diferentes entre sí (Tukey test, $P < 0.05$).

Tras 15 días de exposición a los herbicidas no se observaron diferencias significativas en $F_vF_m^{-1}$ entre los tratamientos (Figura IV.7.A-C), sin embargo, tras 60 días, los olivos tratados con la terbutilazina (T) expresaron efecto fitotóxico

estadísticamente significativo, mostrando menor eficiencia fotoquímica al mediodía (0.60 respecto a 0.80 para C; ANOVA, $P < 0.0001$; Figura IV.7.). Este efecto se reduce al añadir alperujo al suelo, que aumenta la adsorción del herbicida a las partículas del suelo, exponiendo a los olivos a menor cantidad de herbicida.

Aunque el aumento de CO al enmendar el suelo no afectó a la adsorción de glifosato (Tabla IV.1.; Figura IV.6.) como se ha visto anteriormente, éste mostró mayor adsorción respecto a terbutilazina (a excepción del suelo enmendado al 10% (H10J)). Esta fuerte adsorción de glifosato, junto con la baja cantidad que puede ser absorbida por las raíces (Coupland y Lutman., 1982; Rodrigues et al., 1982; Laitinen, et al., 2007) provoca que glifosato esté menos biodisponible para ser absorbido por las plantas y, consecuentemente, no afecte a la fotoquímica potencial de los olivos como ocurre para el herbicida terbutilazina (Figura IV.8.).

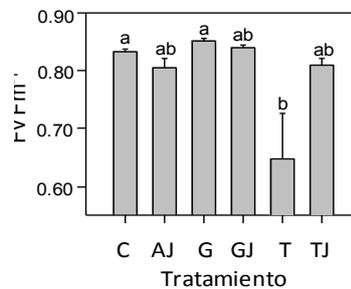


Figura IV.8. Eficiencia fotoquímica (F_v/F_m) en los tratamientos de *Olea europaea* con alperujo y glifosato (GJ), con alperujo y glifosato (TJ) y con alperujo (AJ) a las 60 días. Los valores representados son las medias y las letras indican que las diferencias son significativas ($P < 0.05$).

medida al amanecer en las plantas de control (C), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GJ), con alperujo y glifosato (TJ) tras 60 días de experimento. Los valores representados son las medias y las letras indican que las diferencias son significativas ($P < 0.05$).

Los bajos valores de F_v/F_m para los olivos tratados con la terbutilazina, al mediodía tras 60 días de experimento (Figura IV.7. A-C) se atribuyen a la fotoinhibición causada por un alto flujo de luz, el cual tiene por consecuencia un menor número de centros de reacción abiertos (Maxwell y Johnson, 2000). Esto se ha observado anteriormente en otros estudios con herbicidas (Bigot et al., 2007). Esta fotoinhibición es causada por un daño (exposición al herbicida) en los componentes fotosintéticos, como son las moléculas de clorofila del PSII de los cloroplastos, y se traduce en un

efecto bien a corto plazo y a la vez reversible. Esto fue observado también por Popov y Cornisa. (2006) al exponer a cuatro malas hierbas a concentraciones altas del herbicida atrazina y es lo que se denomina fotoinhibición dinámica. También puede ocurrir un efecto a largo plazo e irreversible, observándose efectos negativos del tratamiento que persisten hasta el amanecer siguiente a las medidas de fluorescencia al mediodía, proceso que se llama fotoinhibición crónica (Maxwell y Johnson, 2000; Werner et al., 2002).

Por el contrario, Catriona et al. (2003) observaron recuperación de la eficiencia fotoquímica potencial del PSII tras cuatro días bajo tratamiento con diurón de *Zostera capricorni*. Nuestro estudio no detectó recuperación al amanecer en olivos tratados con terbutilazina (Figura IV.8. (ANOVA, $P < 0.0001$) lo cual indica fotoinhibición crónica a largo plazo (Figura IV.8), lo que se atribuye a que terbutilazina inhibe el flujo de electrones en el PSII en plantas (Liñán., 2009). Cabría esperar que los olivos TJ también mostrasen este efecto negativo causa de la presencia del herbicida, sin embargo, se encontró recuperación de los valores bajos de $F_v F_m^{-1}$ en las medidas al amanecer (Figura IV.8.). Esto indica que la mayor retención del herbicida en presencia del alperujo (Tabla IV.6) reduce su capacidad fitotóxica sobre el olivo, lo cual es beneficioso para el cultivo.

Las macetas tratadas con los herbicidas mostraron menores Φ_{PSII} tras 15 días de tratamiento (Figura IV.8.E), aunque no se registraron diferencias significativas, (ANOVA, $P > 0.05$). Sin embargo, los valores de Φ_{PSII} para las plantas tratadas con la terbutilazina fueron significativamente menores tras 60 días (ANOVA, $P > 0.01$; Figura IV.8.F). Redondo-Gómez et al. (2007b) mostraron tras una semana de tratamiento con diurón y simazina menor eficiencia fotoquímica potencial y Φ_{PSII} en plantas jóvenes de olivo, mientras que un estudio similar en árboles adultos de olivo este efecto se observaba sólo a partir de dos meses de aplicación del herbicida (Redondo-Gómez et al. 2007a), al igual que ocurre en nuestro estudio con olivos de 3 años de edad.

La coaplicación de la terbutilazina y alperujo, contrarrestó la reducción de $F_v F_m^{-1}$ y Φ_{PSII} , ya que, como se ha descrito, la presencia de alperujo, aumenta la adsorción de terbutilazina, por lo que se encuentra menos disponible para ser absorbida por las plantas. En caso de los olivos tratados con el glifosato (G), no se

encontró efecto fitotóxico. Aunque se sabe que el glifosato inhibe la síntesis del ácido δ -aminolevulínico, bloqueando la síntesis de clorofila y otras porfirinas (Li et al., 2005), su principal modo de acción no es éste, sino inhibir la síntesis de la enzima 3-enolpiruvil-siquimato-5-fosfato sintetasa, localizada en los cloroplastos e involucrada en la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales como triptófano y fenilalanina y tirosina (Della Cioppa et al., 1986), el cual no está directamente relacionado con la fotosíntesis (Franz et al., 1997).

El daño crónico y dinámico para los distintos tratamientos se muestra en la Figura IV.9. La disipación de energía como calor (NPQ) (Figura IV.8.G-I) es un mecanismo protector que poseen las plantas que expresan bajo condiciones de estrés y daño dinámico, y que normalmente se ve favorecido cuando $F_v F_m^{-1}$ y Φ_{PSII} bajan (Maxwell y Johnson, 2000). Sin embargo, los olivos tratados con terbutilazina, tras 60 días de tratamiento, no mostraron un aumento en NPQ, lo que podría ser consecuencia del daño crónico que sufrieron (fotoinhibición crónica) los olivos bajo este tratamiento (Figura IV.9.). Estos resultados no concuerdan con otros trabajos con olivos (Redondo-Gómez et al., 2007a, b), mientras que coincide con los bajos valores de NPQ encontrados por Catirona et al. (2003), en estudios con diurón en el alga *Zostera capricorni*. Mientras que los olivos T mostraron la mayor fotoinhibición crónica, en presencia de alperujo (TJ) este efecto se ve reducido. Por el contrario, los olivos G y GJ mostraron una respuesta a la fotoinhibición similar al control.

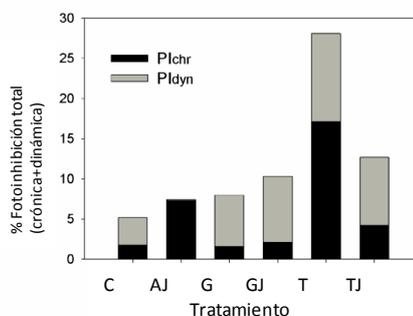


Figura IV. Fotoinhibición de las hojas de adultos *Olea europaea* tratados con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TJ). (barras negras) fotoinhibición crónica (Plchr) y (barras grises) fotoinhibición dinámica (Pldyn).

IV.4.4. Intercambio gaseoso

La Tasa fotosintética, la conductancia estomática, y concentración intercelular de CO₂ *Olea europaea* medidos al mediodía para los tratamientos C, AJ, T, G, TJ y GJ, a las 24 horas, 15 y 60 días después de la aplicación de los herbicidas se muestran en la Figura IV. 10. La Tasa Fotosintética Neta (A) manifestó un claro efecto negativo en los olivos tratados con la terbutilazina, registrándose una reducción en los valores tras 15 días con respecto a los olivos control (ANOVA, P<0.05), la cual se agudizó tras 60 días de tratamiento (ANOVA, P <0.0001) (Figuras IV.10.B-C). Sin embargo estas diferencias no fueron observadas en los tratamientos G, TJ y GJ. El descenso de la A se atribuye a limitaciones estomáticas y/o no estomáticas (Flexas y Medrano, 2002). En caso de que esta reducción sea producida por limitaciones no estomáticas, se deberían observar cambios bioquímicos causando inhibición de la síntesis de moléculas de clorofila, lo que no puede ser comprobado al no haberse analizado los pigmentos de las hojas.

C AJ G GJ T TJ C AJ G GJ T TJ C AJ G GJ T TJ
 Tratamiento

Figura I

concentra
 (AJ), glif
 terbutilaz
 (C, F, I). Los valores representan la media \pm SE, $n = 7$.

D-F), y
 lperujo
 y con
 30 días

En el caso de reducción de A por limitaciones estomáticas debido a reducción de la conductancia estomática (G_s), debería observarse una disminución de la concentración intercelular de CO_2 , que sí ocurre tras 15 días de tratamiento con terbutilazina, aunque no ocurre al final del estudio. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, no se encuentran diferencias significativas para los olivos TJ. Además la adición de AJ incrementa G_s en ambos casos (TJ y GJ) (Figura IV.10.B-C), lo que confirma que no existe efecto negativo de la adición de AJ. Nuestra hipótesis es que las limitaciones estomáticas ocurren a corto plazo, justo tras la aplicación del herbicida, afectando directamente a la síntesis de las moléculas de clorofila tras una larga exposición al tratamiento (Flexas y Medrano, 2002). Los valores para la tasa fotosintética confirman que la adición de AJ reduce el efecto negativo producido por la exposición a terbutilazina, debido al incremento en la adsorción, ya que no se encontró una reducción significativa tras 60 días de estudio en los olivos del tratamiento T.

Para los olivos tratados con glifosato, no se encontraron diferencias significativas para A, G_s ni C_i durante el experimento, pero en caso de GJ, se encontró que tanto G_s como C_i disminuían tras 15 días de estudio, efecto que desaparecía al final del estudio. Redondo-Gómez et al. (2007a, b) encontró resultados parecidos en trabajos con olivos y otro herbicida perteneciente a la familia de las triazinas, donde sugería que, aunque la adición de terbutilazina a los suelos podría afectar negativamente a la fotoquímica de la planta del olivo, este efecto podría ser reducido por el uso de enmiendas como el alperujo en los suelos, al verse reducida su fitotoxicidad al aumentar su adsorción. La adición de este residuo al suelo a las dosis estudiadas no afecta a la actividad biológica del herbicida (Cañero et al., 2010) y mejora las propiedades del suelo (Albuquerque et al., 2009). Además, este residuo es fácilmente accesible ya que es generado cerca de los cultivos de olivo.

IV.5.-Conclusiones

El uso de plaguicidas seguros y efectivos en los cultivos, sin desarrollar efectos indirectos es crucial para los agricultores. En este estudio se demuestra que por un lado la aplicación de glifosato no constituye daño para los olivos, mientras que terbutilazina es una fuente indirecta de fitotoxicidad para los olivos, reduciendo la eficiencia fotosintética que fue contrarrestada por la adición de alperujo a los suelos, debido al aumento de la adsorción del herbicida al suelo. Los resultados obtenidos pueden ser útiles para el manejo de estrategias que engloban el uso de herbicidas en el cultivo del olivar. En el caso de glifosato habría que evaluar su efecto tras una aplicación foliar.

IV.6.-Bibliografía

- Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Biores. Technol.* **2004**, 91, 195-200.
- Alburquerque, J.A., González, J., Tortosa, G., Cegarra, J. Evaluation of "alperujo" composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation.* **2009**, 20, 257-270.
- Alistar, C., Kogan, M., Pino, I. Differential phytotoxicity of glyphosate in maize seedling following applications to roots or shoot. *Weed Res.* **2005**, 45, 27-32.
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gandara, J., Mejuto, J.C., García-Río, L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agr. Ecosyst. Environ.* **2008**, 123, 247-260
- Bigot, A., Fontaine, F., Clément, C. Vaillant-gaveau, N. **2007**. Effect of the herbicide flumioxazin on photosynthetic performance of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Chemosphere.* **2007**, 67, 1243-1251.
- Borggaard, O.K. y Gimsing A.L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest. Manage. Sci.* **2008**, 64, 441-456.
- Cabrera, A., Cox, L., Velarde, P., Koskinen, W.C., Cornejo, J. Fate of diuron and terbutylazine in soils amended with two-phase olive oil mill waste. *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, 55, 4828-4834.
- Cabrera, A., Cox, L., Fernández-Hernández, A., García-Ortiz Civantos, C., Cornejo, J. Field appraisalment of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2009**, 132, 260-266.
- Cañero, A.I., Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Effect of soil amendment with an organic residue on S-metolachlor fate. 14th Ramiran International Conference, Lisboa, Portugal. **2010**, C7, 0086.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Fernández-Laespada, M.E., Calvo-Seronero, L., Sánchez- San Román, F.J. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res.* **2003**, 37, 928-938.

- Casierra-Posada, F. Fotoinhibición: Respuesta fisiológica de los vegetales al estrés por exceso de luz. Revisión. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. Vol 1. Nº1 pp, **2007**, 114-123.
- Castillo, J.M. Fernández-Baco, L., Castellano, E.M., Luque, C.J., Figueroa M.E., Davy, A.J. Lower limits of *Spartina densiflora* and *S. maritima* in a Mediterranean salt marsh determined by different ecophysiological tolerances. J. Ecol. **2000**, 88, 801-812.
- Catriona, M.O., Macinnis-Ng, P. J.R. Short-term response and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure. Aquatic. Botany. **2003**, 1-15.
- Celis, R., Barriuso, E., Houot, S. Effect of liquid sewage sludge addition on atrazine sorption and desorption by soil. Chemosphere. **1998**, 37, 1091-1107.
- Coupland, D. y Lutman, P.J.W. Investigations into movement of glyphosate from treated to adjacent untreated plants. Ann. Appl. Biol. **1982**, 101, 315-321.
- Dalton, R. y Boutin, C. Comparison of the effects of glyphosate and atrazine herbicides on nontarget plants grown singly and in microcosms. Environ. Toxicol. Chem. **2010**, 29, 2304-2315.
- Day, R.W. y Quinn, G.P. Comparisons of treatments after analysis of variance in ecology. Ecol Monogr **1989**, 59, 433-463
- Della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Klein, B.K., Shah, D.M., Fraley, R.T., Kishore, G.M. Translocation of the precursor of 5-*enol*pyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. **1986**, 83, 6873-6877.
- Delgado-Moreno, L., Almendros, G., Peña, A. Raw or incubated olive-mill wastes and its biotransformed products as agricultural soil amendments - Effect on sorption-desorption of triazine herbicides. J. Agric. Food Chem. **2007**, 55, 836-843.
- Dolaptsoglou, C., Karpouzas, D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., Eleftherohorinos, I., Voudrias, E.A. Influence of different organic amendments on the degradation, metabolism and adsorption of terbutylazine. J. Environ. Qual. **2008**, 36, 1793-1802.

CAPÍTULO IV. Efecto de la adición de alperujo y de los herbicidas terbutilazina y glifosato sobre la eficiencia fotosintética en plantas jóvenes de Olea europaea bajo condiciones de invernadero. Estudios de fluorescencia de la clorofila a e intercambio gaseoso

- Laitinen, P., Ramo, S., Nikunen, U., Jauhainen, L., Simes, K., Turtola, E. Glyphosate and phosphorous leaching and residues in boreal sandy soil. *Plant Soil*. **2009**, 323, 267–283.
- Laitinen, P., Ramo, S., Siimes, K. Glyphosate translocation from plants to soil-does this constitute a significant proportion of residues in soil? *Plant Soil*. **2007**, 300, 51–60.
- Li, J., Smeda, R.J., Sellers, B.A., Johnson, W.G. Influence of formulation and glyphosate salt on absorption and translocation in three annual weeds. *Weed Sci*. **2005**, 53, 153-159.
- Liñán. **2009**. Vademecum of phytosanitary and nutritional products. C. Liñan (ed) Madrid.
- Mamy L., Barriuso, E. Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaces with the introduction of glyphosate resistant crops. *Chemosphere*. **2005**, 61, 6, 844-55.
- MAGRAMA, **2012**.
- McBride, M.B. Electron Spin resonance study of copper ion complexation by glyphosate and related ligands. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **1991**, 55, 4, 979-985.
- Maxwell, K. Johnson, G.L. Review. Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *J. Exp. Bot.* **2000**, 51, 345, 659-668.
- Negri, A., Vollhardt, C., Humphrey, H., Heyward, A., Jones, R., Eaglesham, G., Fabricius, K.. Effects of the herbicide diuron on the early life history stages of coral. *Mar. Pollut. Bull.* **2005**, 51, 370-383.
- Nelson, D.W. y Sommers, L.E. **1982**. *Methods of Soil Analysis, Part 2*; American Society of Agronomy. Wisconsin.
- Popov, V. H. y Cornish, P.S. Atrazine tolerance of grass species with potential for use in vegetated filters in Australia. *Plant and Soil*. **2006**. 280, 1-2, 115-126.
- Redondo-Gómez, S., Cox, L., Cornejo, J., Figueroa, E. Combined effect of diuron and simazine on photosystem II photochemistry in a sandy soil and soil amended with solid olive-mill waste. *J. Environ. Sci. and Heal. Part B*. **2007a**, 42, 249-254.

- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Cox, L., Cornejo, J., Figueroa, E. Effect of herbicide and soil amendment on growth and photosynthetic responses in olive crops. *J. Environ. Sci. and Heal. Part B.* **2007b**, 42, 523-528.
- Rodrigues, J.J.V., Worsham, A.D., Corbin, F.C. Exudation of glyphosate from wheat (*Triticum aestivum*) plants and its effects on interplanted corn (*Zea mays*) and soybeans (*Glycine max*). *Weed Sci.* **1982**, 30,316-320.
- Rodríguez-Lucena, P., Hernández, D., Hernández-Apaolaza, L., Lucena, J.J. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer. *J. Agric. Food. Chem.* **2010**, 58, 1085-1092.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manag.* **2006**, 26, 960-969.
- Saladin, G. y Clement, C. **2005**. Physiological side effects of pesticides on non-target plants, in: James V. Livingston. *Agriculture and soil Pollution: New research*, NOVA Science Publishers Inc., 53-86.
- Sayed, O.H. Review: Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica.* **2003**, 41, 321-330.
- Schreiber, U., Schliwa, W., Bilger, U. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorimeter. *Photosyn. Research.* **1986**, 10, 51-62.
- Singh, N., Kloeppel, H., Klein, W. Sorption behavior of metolachlor, isoproturon, and terbutylazine in soils. *J. Environ. Sci. Health B.* **2001**, 36, 397-407.
- Singh, N., Kloeppel, H., Klein, W. Movement of metolachlor and terbutylazine in core and packed soil columns. *Chemosphere.* **2002**, 47, 409-415.
- Simonsen, L., Fomsgaard, I.S., Svensmark, BO., Spliid, N.E. Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. *J. Environ. Sci. Health.* **2008**, 43, 365-375.
- Tomlin, C.D.S. (Ed.) **2007**. *The e-Pesticide Manual. A World Compendium. Version 4.0.* Fourteenth ed. BCPC, Surrey, U.K.
- Veiga, F., Zapata, J.M., Fernandez-Marcos, M.L., Alvarez, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Sci. Tot. Environ.* **2001**, 271, 1-3, 135-144.

CAPÍTULO IV. Efecto de la adición de alperujo y de los herbicidas terbutilazina y glifosato sobre la eficiencia fotosintética en plantas jóvenes de Olea europaea bajo condiciones de invernadero. Estudios de fluorescencia de la clorofila a e intercambio gaseoso

- Vereecken, H. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Manag., Sci.* **2005**, 61, 1139-1151.
- Von Caemmerer, S. Farquhar, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves, *Planta.* **1981**, 153, 377-387.
- Werner, B. y Hartmut, F. Chlorophyll a fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicol. Environ. Saf. Environ. Res. Section B.* **1998**, 40, 34-41.
- Werner, C., Correia, O., Beyschlag, W. Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Funct. Plant Biol.* **2002**, 29, 999-1011.
- Worthing, C.R y Hance, R.J. *The Pesticide Manual, a world compendium*, **1991**, 9ª edición, The British Crop Protection Council, Old Working, Surrey.

Capítulo V

Efecto de la adición de alperujo y herbicidas a suelos sobre comunidades microbianas autóctonas del mismo.

Estudios independientes y dependientes de cultivo.

V.1.-Introducción

La Ecología Microbiana se desarrolla como disciplina independiente durante la segunda mitad del siglo XX. Aunque su concepto y metodología ya estaban presentes en estudios anteriores del siglo XIX, el primer libro de texto en el que aparecía este término fue publicado en el año 1966 por Thomas D. Brock: *"Principles of Microbial Ecology"*.

El interés por los microorganismos del suelo se ha visto incrementado notablemente en las últimas décadas (Arias et al., 2005; Schmidt, 2006; Grenni et al., 2012). Se ha calculado que estos organismos constituyen una biomasa total equivalente a la de toda la flora y fauna existente en la Tierra. Su abundancia es tal, que se estima que un gramo de suelo puede contener hasta 10^4 - 10^6 genomas diferentes pertenecientes a organismos procariotas (Wu et al., 2008). Su ubicuidad característica en toda clases de ecosistemas, tanto terrestres, acuáticos como aéreos, ha proporcionado a estos individuos una alta variabilidad genómica, que se traduce en una alta versatilidad metabólica.

Las técnicas clásicas cultivo-dependientes e identificación microscópica son insuficientes para evaluar la composición real de microorganismos en muestras naturales (Schafer y Muyzer, 2001) ya que proporcionan información sólo de un 0.1-10% de la población microbiana total presente en los suelos (Amann et al., 1995; Torsvik, et al., 1990), que se corresponde con la parte de microorganismos que son cultivables bajo condiciones de laboratorio. Consecuentemente, la composición real de comunidades autóctonas de las muestras de suelo se desconocía en su mayoría al aplicarse dichas técnicas. Aún así, estas técnicas permiten la valoración cualitativa de los organismos cultivables bajo condiciones de laboratorio. Incluso hay autores que han aplicado técnicas moleculares en estudios de ecología microbiana utilizando de forma simultánea técnicas cultivo-dependientes y cultivo-independientes (Edenborn y Sextstone, 2007).

La introducción de técnicas moleculares en la tecnología del mundo microbiano en los años 80, ha aumentado exponencialmente la información sobre la diversidad/composición microbiana de todos los ambientes. Estas técnicas permiten establecer relaciones filogenéticas entre organismos sin necesidad de cultivarlos en laboratorio a través del estudio de determinadas regiones de alta variabilidad presentes en los ARN ribosómicos 16S procarióticos (ARNr 16S) en el caso de las bacterias, estimados como los microorganismos más abundantes del suelo. Entre estas técnicas se encuentran

las de “huella molecular” como es la Electroforesis en Gel en Gradiente Desnaturalizante (DGGE), que constituye una vía excepcional para comparar grandes cantidades de muestras y refleja con alta fiabilidad la diversidad genética de las comunidades en los ecosistemas (Muyzer et al., 1999). La DGGE, es una de las técnicas moleculares más usadas en el área de la microbiología ecológica desde que se introdujo en 1993 (Muyzer et al., 1993) y se basa en la separación de fragmentos de ADN de longitudes similares en base a su secuencia nucleotídica (Claesson et al., 2009; Wang y Qian, 2009).

La importancia de los microorganismos de los suelos radica en su implicación en los procesos de transformación de materia orgánica, en los ciclos biogeoquímicos (como nitrógeno, fósforo, sulfuro y carbono), como intercambiadores de gases con la atmósfera o secuestro de carbono en los suelos, como reguladores del crecimiento de plantas y como estabilizadores de agregados del suelo (mantienen la estructura de los suelos) (Torsvik y Orveas, 2007; Wertz et al., 2006; Wu et al., 2008). Por lo tanto, constituyen una pieza clave para mantener los suelos en condiciones saludables (Viti et al., 2008) y se consideran bioindicadores de calidad y productividad de muchos sistemas agrícolas (Killham et al., 1994; O’Donnell et al., 1994; Girvan et al., 2003).

Las poblaciones microbianas de los suelos son especialmente vulnerables a procesos antropológicos que incluyen prácticas agrícolas como la rotación de cultivos, fertilización, cultivos intensivos, laboreo, aplicación de plaguicidas y enmiendas orgánicas, que impactan sobre la comunidad microbiana de los suelos (Viti et al., 2008; Wu et al., 2008; Caraciolo et al., 2010). Al incorporarse al sistema suelo los plaguicidas, además de actuar sobre especies diana, afectan a los microorganismos presentes en el mismo (Perucci et al., 2000; Vichetti et al., 2002), y este impacto puede ser positivo, negativo o simplemente no producir efecto sobre las comunidades microbianas del suelo. Singh y Ghoshal. (2010) han comprobado que la adición de butacloro reduce la tasa de respiración de suelos agrícolas, lo que generalmente se asocia a una reducción en la biomasa microbiana en los mismos (Klose y Ajwa, 2004), mientras que otros estudios con glifosato han revelado un aumento en la tasa de respiración, que a su vez puede implicar un crecimiento de la población bacteriana (Voos y Groffman, 1997; Haney et al., 2000).

Se ha visto que la aplicación de plaguicidas a los suelos puede reducir la diversidad microbiana pero a la vez puede aumentar la diversidad funcional de las comunidades. En ocasiones la población microbiana se afecta por la aplicación de

plaguicidas y tras un periodo de aclimatación, recupera su actividad normal o incluso en ocasiones, se ve incrementada (Fließbach y Mader, 2004; Niewiadomska, 2004). Gonod et al. (2006) en estudios de DGGE observaron modificaciones en la estructura de comunidades en respuesta de la aplicación de 2,4-D y que este efecto desaparecía tras 7 días de tratamiento.

Otra práctica cultural que se está usando en la actualidad y que altera la composición microbiana de los suelos es la aplicación de residuos orgánicos. Como se ha comentado en capítulos anteriores de esta Memoria, esta actividad mejora la estructura del suelo, disponibilidad de nutrientes y fertilidad, ayudando a la restauración de suelos degradados (Melero et al., 2007; Badalucco et al., 2010) (Ver Capítulos I, II y III). Además su aplicación puede reducir los procesos de transporte y por tanto pérdida y posible contaminación por plaguicidas, muy frecuente en suelos agrícolas de bajo contenido en carbono orgánico (Albarrán et al. 2003, 2004; Si et al., 2006; Majumdar y Singh, 2007). Algunos estudios han revelado que la adición de residuos orgánicos se traduce en un aumento en la actividad biológica de los suelos (Lai et al., 1998; Albiach et al., 2000; Singh y Ghoshal, 2010), constituyendo una práctica agrícola beneficiosa. En el caso de los residuos de la extracción de aceite de oliva, se ha visto que no constituyen una fuente de toxicidad para los organismos autóctonos del suelo (Sampedro et al., 2009).

En este capítulo se ha estudiado el efecto de la adición de alperujo a suelos agrícolas sobre las poblaciones microbianas endógenas de dos suelos, así como el efecto de la incubación con los herbicidas MCPA y S-metolacloro en esos suelos bajo condiciones de laboratorio. Además se han aislado cepas procedentes de estos suelos con el fin de encontrar organismos degradadores de estos herbicidas.

V.2.-Objetivos

Los objetivos de este estudio han sido caracterizar las poblaciones microbianas presentes en dos suelos agrícolas seleccionados de cultivos intensivos de la Vega del Guadalquivir y evaluar el efecto que la adición de alperujo tiene sobre estas poblaciones. También se ha querido evaluar el efecto de los herbicidas MCPA y S-metolacloro sobre poblaciones microbianas del suelo tras un periodo de tiempo determinado de incubación en laboratorio, aislar bacterias de los suelos con el fin de obtener organismos tolerantes o resistentes a los mismos y estudiar la degradación de herbicidas con esos organismos tolerantes o resistentes.

V.3.-Materiales y métodos

V.3.1.-Herbicidas

Los herbicidas que se usaron en los experimentos recogidos en este Capítulo fueron MCPA y S-metolacloro, ambos anteriormente descritos en los apartados II.3.1.1. y II.3.1.2. El método analítico de estos herbicidas fue descrito en el apartado II.3.1.3.

V.3.2.-Alperujos

Los residuos orgánicos usados en estos estudios fueron los mismos que aparecen en el Capítulo II (apartado II.3.2.), los alperujos AJ y AM, cuya caracterización se recoge en el apartado II.4.1. del mismo capítulo.

V.3.3.-Suelos

Para este capítulo se seleccionaron tres suelos agrícolas de cultivos intensivos de la Vega del Guadalquivir (S, C y T) anteriormente usados en el Capítulo II, conservados a -4°C. Las propiedades principales de estos suelos se describen en el apartado II.4.2. Además se estudiaron muestras del suelo S frescas sin congelar, ya que era el único suelo con posibilidad de conseguir muestras en el momento del estudio. También se usaron estos mismos suelos enmendados con los residuos AJ y AM al 10% (p/p) (S10J, C10J, T10J, S10M, C10M y T10M) y por otro lado, muestras del suelo T10J previamente incubadas por

separado con MCPA y S-metolacloa a las dosis de 1.5 y 1 kg ha⁻¹, bajo condiciones de laboratorio durante 45 y 72 días, respectivamente.

V.3.4.-Extracción de ADN de suelos y alperujos

Para la caracterización de la comunidad microbiana autóctona, se hizo una extracción de ADN total contenido en 0.5 g de las muestras de los alperujos y muestras de suelo sin enmendar (S, C y T) y de los suelos enmendados al 10% (p/p) con estos residuos por separado. Para ello se usó el kit comercial "Fast DNA Spin Kit"(suministrado por Q BIOgene). Una vez extraídas las muestras se conservaron a -20°C para su posterior análisis por PCR y DGGE.

V.3.5.-Extracción de ARN

El ARN representa la población biológicamente activa de los suelos en el momento de la extracción. En estos estudios se extrajo ARN de muestras de suelo siguiendo el método modificado de Griffiths et al. (2000).

Este método de extracción consiste en lisar 0.5 g de suelo usando una matriz de perlas de sílica suministrada por Q-Biogene que se mezcla con solución tampón Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico (25:24:1, pH 4.3). Estas muestras se agitan a 5.5 ms⁻¹ durante 30 s en un sistema de agitación rápida (Precellys 24-Lysis&homogenation, Stretton Scientific Ltd.), se centrifugan a 13500 rpm durante 5 min a 4°C y la fase acuosa de los ácidos nucleicos se traspasa cuidadosamente en un tubo eppendorf. Se extrae con cloroformo-alcohol-isoamil (24:1) en una relación (1:1) (v/v) y se centrifuga a 13500 rpm durante 5 min a 4°C. Seguidamente, se precipitan los ácidos nucleicos con Polientilenglicol 8000 (30%) (Fluka BioChemika) durante 2 horas a temperatura ambiente (relación 2:1 v/v). Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Los precipitados se lavaron 3 veces con etanol (70%), se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 min y se resuspendieron en 50 µl de agua libre de ARNasas tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato).

Tras la extracción de ARN, las muestras se trataron para eliminar posibles restos de ADN que pudieran interferir en los análisis posteriores. Para ello se mezclaron 7.5 µl de agua estéril, 5 µl de solución Turbo DNase, 2.5 µl de tampón (10x) y 25 µl de muestra y se

incubó a 37°C durante 25 min. Transcurrido ese tiempo se añadieron 8 µl de Agente de inactivación de las ADNasas y se incubaron 5 min a temperatura ambiente mezclándose ocasionalmente. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 1.5 min y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Inmediatamente después se hizo una PCR con los cebadores 27F y 1525R y se comprobó en gel de agarosa que no existía amplificación al haberse eliminado eficazmente todo el ADN de las muestras.

Las muestras de ARN se guardaron a -80°C para preservarlas de procesos de degradación. Muestras de 2 µl se mandaron a analizar por Bioanalyser en el Servicio de Análisis de Biología molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Warwick.

Tras la extracción de ARN se realizó una síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el protocolo High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Tras esto se aplicó una reacción térmica al producto obtenido con las siguientes características: 37°C 60 min (1 ciclo) y 95°C durante 5 min (1 ciclo). Con este producto se hizo una PCR con los cebadores P2 y P3 (Tabla V.1.) todo esto se comparó con el ADN previamente extraído del suelo por la técnica de DGGE, de modo que vemos bandas correspondiente a los organismos presentes en el suelo, activos y no activos biológicamente (ADN) frente a sólo los activos biológicamente (ARN).

V.3.6.-Caracterización morfológica y conteo de microorganismos por técnicas cultivo-dependientes

Se identificó morfológicamente (*de visu*) la composición de las poblaciones microbianas de los suelos tanto sin enmendar como enmendados, antes y después de tratamientos de 45 días y 72 días con MCPA y S-metolacoloro, respectivamente (T, T10J, T10J-MCPA y T10J-S-metolacoloro) y las muestras de alperujos (AJ y AM). Para ello, se puso a interactuar 1 g de cada uno de los suelos en estudio y los alperujos por separado con 10 ml de una solución salina (y así reducir choque osmótico y rotura de las células vivas presentes en la muestra). Estas disoluciones se agitaron durante 5 min a 4 ms⁻¹, se diluyeron por un factor de dilución 10⁻² en caso de los suelos sin enmendar y enmendados y por factores de 10⁻⁴ y 10⁻⁶ para los alperujos AJ y AM, respectivamente. Los extractos se sembraron en medio sólido Tryptic Soy Agar (TSA) (composición: caseína (17 g) peptona de soja (3 g) bacto-dextrosa (2.5 g), CaCl (5 g), K₂HPO₄ (2.5 g), agar (15 g) para un litro de

agua destilada, de pH 7) seleccionado por ser un medio no selectivo para el recuento del mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC). El medio fue esterilizado en autoclave durante 1 h a 121 °C y se vertió en placas Petri (20 ml/placa). Una vez solidificado y enfriado, se sembraron 100 µl por triplicado de extractos de los suelos y residuos. Las placas se incubaron a 30°C en oscuridad durante 6 días. Previamente se realizaron pruebas a 20, 30°C y 37°C y se seleccionó 30°C como la temperatura más idónea para el crecimiento de los microorganismos de estas muestras de suelos y residuos.

Para la identificación morfológica de los microorganismos cultivables se determinaron *de visu* según su morfología, color y examen microscópico.

V.3.7.-Electroforesis en gel de agarosa

A través de la técnica de electroforesis en gel de agarosa se confirmaba que las extracciones de ADN y ARN de tanto las muestras de suelo, como de las colonias aisladas, presentaron suficiente calidad para ser amplificadas posteriormente. Para ello se cargó 5 µl de muestra de ADN extraído, previamente mezclados con 2 µl de tampón de carga 6x que lleva incorporado el colorante azul de bromofenol para visualizar el frente de migración, en un gel de agarosa (1%) previamente teñido con bromuro de etidio (1%) para la visualización de ADN. Este gel se sumergió en una unidad de electroforesis horizontal que contenía tampón TAE 1x (a partir de una solución stock TAE 50X: Tris base (242 g) ácido acético glacial (57.1 ml), EDTA 0.5 M (100 ml), y enrasar con agua hasta un litro) durante 20 minutos a 120 V. La migración de la banda de ADN extraído se visualizó con la ayuda de un TRANSILUMINADOR de emisión ultravioleta Gene Flash UV imager (Syngene BIO imager, Cambridge, UK). Una vez comprobado que se extrajo ADN de las muestras, se procede a la amplificación de ADN por PCR. Las imágenes de los geles se capturaron con un equipo de análisis de imagen (Biorad) que lleva acoplado un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509).

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se ha efectuado teniendo en cuenta marcadores de tamaño molecular (de 100 pb) de los fragmentos de restricción del ADN del Fago lambda resultado de la digestión con endonucleasa H_{ind} III o EcoRI/H_{ind}III.

V.3.8.-Amplificación de ARNr 16S a través de PCR

A partir de las distintas muestras de ADN se amplificó por PCR cada uno de los fragmentos del gen codificante para ARNr 16S. El objetivo de esta técnica es estudiar la población bacteriana del suelo, al ser éstos, los microorganismos más abundantes del suelo. Para ello se usaron los cebadores universales del dominio Bacteria (Tabla V.1.) que fueron suministrados por Invitrogen, y se diluyeron con agua desionizada hasta una concentración stock (25 pmol) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Todas las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo usando PCR-Promega Master mix (Promega, London, UK).

Tabla V.1. Cebadores usados en las distintas reacciones de PCR.

| Nombre del cebador | | Secuencia (5'-3') |
|--------------------|------------------------|----------------------------------|
| 27F | <i>Suelo-alperujos</i> | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG |
| 1525R | | AGGAGGTGWTCCARCC |
| P2 | <i>Bandas</i> | CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGCGG |
| P3 | | GGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCA |
| P341F | <i>DGGE</i> | ATTACCGGCTGCTGG |
| P907R | | CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGG |
| | | GCACGGGGGGCCTACGGGAGGGAGCAG |
| | | CCGTCAATTCCTTTRAGTTT |

Todas las reacciones de PCR se completaban hasta un volumen total de 50 µl conteniendo: 25 µl Master Mix (50 unidades ml⁻¹ de la polimerasa Taq DNA en una reacción tampón (pH 8.5), 400 µM de cada uno de los dinucleótidos (dNTP), 3 mM MgCl₂), 10 µM de cada cebador, 2.5 µl de Dimetil sulfóxido (DMSO) (Fisher Scientific Loughborough, Leicestershire, UK), 2 µl de albúmina de suero bovino (BSA 10 mg ml⁻¹, SIGMA, St Louis, MO, USA) y 2 µl de ADN molde para la síntesis. Estos 50 µl se sometieron a una reacción en un termociclador Mastercycler pro (Eppendorf) bajo las condiciones del programa de amplificación que se muestra en la Tabla V.2. Una vez finalizado el programa las muestras se mantuvieron a 4°C en el termociclador hasta su uso.

Tabla V.2. Programa usado en el termociclador para las reacciones de PCR de cada uno de los cebadores.

| Cebadores P2-P3 | | | Cebadores 341F-907R | | | Cebadores 1525R-27F | | |
|-----------------|--------------|-----------|---------------------|--------------|-----------|---------------------|--------------|-----------|
| Tª (Cº) | Tiempo (seg) | Nº Ciclos | Tª (ºC) | Tiempo (seg) | Nº Ciclos | Tª (ºC) | Tiempo (seg) | Nº Ciclos |
| 95 | 60 | 1 | 95 | 60 | 1 | 95 | 60 | 1 |
| 95 | 45 | | 72 | 45 | 35 | 72 | 60 | 35 |
| 55 | 30 | 35 | | | | | | |
| 72 | 45 | | 72 | 45 | | 72 | 45 | |
| 72 | 600 | 1 | 45 | 350 | 1 | 45 | 600 | 1 |

V.3.9.-Electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE)

El análisis de la comunidad total de bacterias presentes en las muestras de suelos y alperujos se llevó a cabo por medio de DGGE usando el Sistema DCode (Bio-Rad, Hertfordshire, United Kingdom) (Muyzer et al., 1993). El fundamento de esta técnica se muestra en la Figura V.1. Esta técnica consiste en la separación electroforética de las cadenas de ADN en un gradiente químico de urea y formamida en un gel de poliacrilamida, que desnaturaliza la molécula de ADN de forma progresiva a medida que avanza por el perfil de electroforesis, lo que reduce su movilidad en el mismo. Este incremento de resistencia al paso que ejerce el gel en las moléculas más desnaturalizadas (más abiertas), genera una banda en el gel (Figura V.1.) y permite la separación de las moléculas de ADN en función de diferencias sencillas en el contenido en pares de bases Guanina-Citosina.

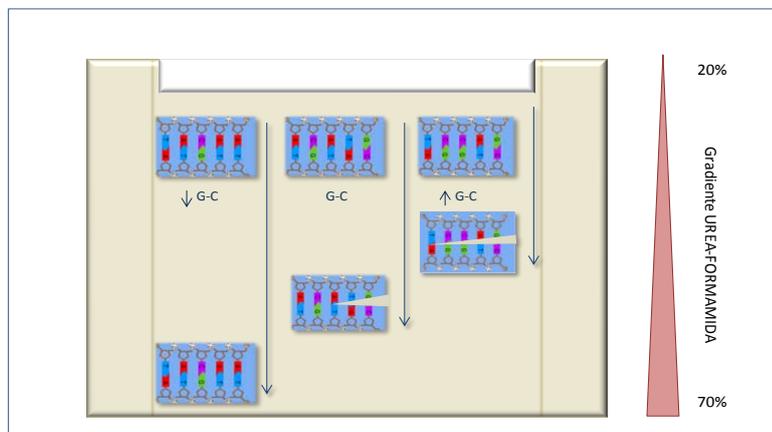


Figura V.1. Fundamento de la técnica DGGE. Fragmentos de ADN de la misma longitud (rojo: nucleótidos de Adenina; azul Timina; verde: Guanina y morado: Citosina) son separados en función de su contenido en bases Guanina-Citosina (G-C) en un gel con gradiente creciente de Urea-formamida.

El equipo que se utilizó para esta técnica se muestra en la Figura V.2. Para la DGGE se preparó un gel (al 12% de acrilamida) de 1.5 mm de grosor con un gradiente químico creciente de urea-formamida (Muyzer et al., 1993). Tras realizar varias pruebas con distintos gradientes químicos, se seleccionó el gradiente 20-70% como el más óptimo para nuestros estudios. Para ello se mezclaron distintos volúmenes de dos soluciones madres desnaturalizantes S0 y S100 (su composición se muestra en la Tabla V.3.) para preparar 20 ml de las soluciones desnaturalizantes al 20% (S20) y al 70% (S70) necesarias para la formación del gel.

-16 ml de S0 y 4 ml de S100, para S20.

-8 ml de S0 y 12 ml de S100, para S70.

Para catalizar la polimerización de la acrilamida se utilizó 37.5 µl de N,N,N, N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Merck, Darmstadt, Alemania) y 75 µl de una solución fresca de peroxodisulfafo amónico (10%) (APS) para S20 y S70. Para la formación del gradiente químico en el gel de poliacrilamida se empleó un soporte vertical y una bomba manual conectada con dos depósitos, cerradas con una llave para controlar el paso de líquido hacia el soporte vertical que sostenía dos placas de vidrio separadas 1.5 mm, entre las cuales se polimerizaría el gel. El control de estos dos depósitos, permitía regular la cantidad de líquido que entraba entre las placas de vidrio y así la mezcla de las soluciones S20 y S70. Una vez que mezclados los 40 ml de las dos soluciones S20 y S70 e incorporados a la estructura para la formación del gel, se selló la parte superior del mismo con una solución de acrilamida sin agentes desnaturalizantes (S0 mezclada con 20 µl de TEMED y 37.5 µl de APS), donde se colocaría el peine para formar pocillos para la posterior carga de muestras.

Una vez polimerizado el gel (tras 2 horas), éste se introdujo en una cubeta para electroforesis DGene System para DGGE (BIO RAD) con aproximadamente 7 l de tampón TAE (1%). Las muestras (productos PCR con los cebadores 341F y 907R) se cargaron en los pocillos del gel (25 µl mezclados con 5 µl tampón de carga 6x (1:1) (v/v) y después se aplicó una carga eléctrica de 150 V durante 10 min a 60°C. Tras esto, se dejó una carga eléctrica de 60 V durante 16 horas. Los geles se examinaron con un Transiluminador.

Tabla V.3. Composición de las soluciones desnaturalizantes S0 y S100 a partir de las que se preparan las S20 y S70.

| Solución desnaturalizante | S0 (0%) | S100 (100%) |
|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Acilamida/Bis (37.5:1)(40%) | 30 ml | 30 ml |
| TAE (50x) | 2 ml | 2 ml |
| Formamida desionizada | - | 40 ml |
| Urea | - | 42 g |
| H2O destilada | <i>(hasta completar 100 ml)</i> | <i>(hasta completar 100 ml)</i> |

El gel con las muestras de ADN cargadas se dejaron a 60 V durante 16 h a una temperatura constante de 60 °C en una solución tampón TAE (40mM Tris-acetato y 1nM EDTA, pH 8.0). Transcurrido este tiempo, se extrajeron los geles del sistema y se tiñeron durante 20 min en una solución TAE 1x que contenía bromuro de etidio (0.5 mg l⁻¹) y más tarde desteñidos durante otros 20 min en Agua Milli-Q. Los geles fueron visualizados y fotografiados con un Transiluminador. Bandas seleccionadas de estos geles DGGE fueron extraídas del gel y entonces amplificadas por PCR, y limpiadas (QIAquick, Qiagen) antes de ser secuenciadas. Todas las secuencias fueron editadas con el paquete de análisis DNASTar SeqMan II (Lasergene, Inc.) y las mejores coincidencias para especies bacterianas fueron determinadas usando BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). El marcador que se usó fue 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas).

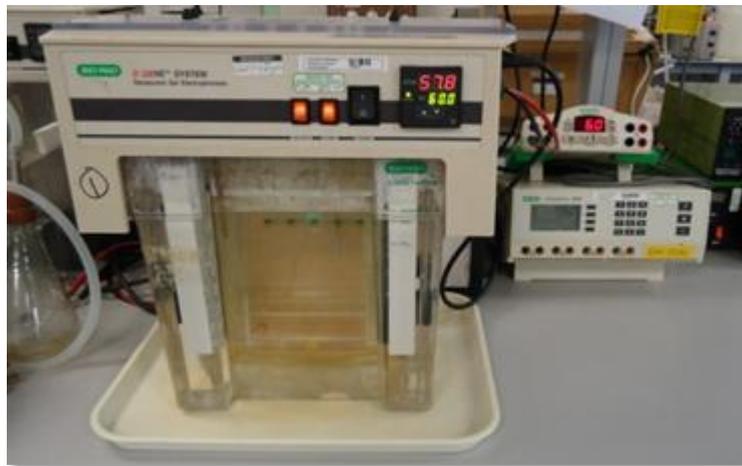


Figura V.2. Equipo de electroforesis D Gene System-Denaturing Gel Electrophoresis para DGGE (BIO RAD).

V.3.10.-Estudio de tolerancia de las poblaciones microbianas frente a herbicidas

Para este estudio se prepararon placas de Petri con medio TSA con glucosa como fuente de carbono y placas de Petri con TSA con única fuente de carbono soluciones de los herbicidas MCPA y S-metolacloro a las concentraciones de 0, 2, 3, 5, 7, 10 kg ha⁻¹. Para ello se mezclaron 20 ml de medio TSA con los herbicidas por separado hasta conseguir las concentraciones deseadas, para lo que se esperó a que la temperatura del medio bajara a 40°C, antes de solidificarse y poder homogeneizar la mezcla en un vial de tubo estéril. Esta mezcla se vertía en las placas Petri y dejaba solidificar. Sobre estas placas se inocularon diferentes cepas y se comprobó la tolerancia a los distintos herbicidas de los individuos seleccionados previamente.

También se hizo un estudio de tolerancia sobre la población microbiana de los alperujos (AJ y AM), con herbicidas a las concentraciones 0.3, 0.6, 1 kg ha⁻¹, con el fin de evaluar el efecto de la adición de MCPA y S-metolacloro sobre las poblaciones microbianas de estos residuos.

V.3.11.-Estudios de degradación de los herbicidas MCPA y S-metolacloro por cepas aisladas

Una vez se obtuvieron cepas que eran capaces de crecer en presencia de los herbicidas como única fuente de carbono, se inocularon en matraces que contenían 250 ml de medio TSA líquido con los herbicidas por separado como única fuente de carbono (Figura V.5.). Se aplicó herbicida a la concentración con mayor crecimiento de UFC (apartado V.3.10.).

La degradación microbiana de los herbicidas MCPA y S-metolacloro se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a partir de 5 ml del medio de 250 ml de cultivo TSA con los herbicidas como fuente de carbono líquido inoculado con las distintas cepas, que se centrifugaba a 6000 rpm y se filtraba previo análisis.

V.3.12.-Secuenciación

El ADN amplificado y purificado (10 µl de la muestra junto con 5.5 pmol de los cebadores P2 y P3, por separado, para el caso de productos de PCR procedentes de bandas de gel y 1525R y 27F para productos PCR extraídos de bandas de gel de agarosa o

de suelo) correspondiente a cada tipo de microorganismos aislados, se envió al Servicio de Análisis de Biología molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Warwick. Todas las secuencias se analizaron usando MEGA4 (Tamura et al., 2007). Se usó el algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul et al., 1990) para obtener índices de similitud de homólogos en la base de datos de ADN del GenBank, disponible online en el National Centre for Biotechnology Information (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

En este estudio se consideró que las secuencias que diferían entre sí menos de 1% pertenecían a la misma unidad taxonómica operacional (OTU) atribuyendo las diferencias a artefactos experimentales producidos durante el proceso de amplificación por PCR o a diferencias existentes entre individuos muy cercanos filogenéticamente.

V.4.-Resultados y Discusión

V.4.1.-Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN de todos los suelos utilizados y sólo se consiguió obtener producto en los casos: S, S CONGELADO, S10J y S10M y para los suelos T10J-MCPA y T10JS-metolacloro, que habían sido incubados bajo condiciones de laboratorio con MCPA y S-metolacloro, respectivamente. La Tabla V.4. resume la concentración de ARN y el valor para el Número de Integridad de ARN (RIN) de los suelos comentados.

Se probaron tres métodos de extracción de ARN: Griffiths et al. (2000), Shestha, et al. (2008) y Mettel, et al. (2010), y sólo con el método de Griffiths et al. (2000) modificado, se consiguió extraer ARN de las muestras en estudio. Como muestras control positivo, se inocularon muestras de suelo (T, C, T10J, C10J, T10M y C10M) con organismos previamente cultivados en laboratorio y además muestras de suelo frescas colectadas de un jardín en el momento del estudio y se incubaron durante 96 h a 37°C a un contenido de humedad equivalente a la capacidad de máxima de retención de agua del suelo. De las muestras de los suelos T, C, T10J, C10J, T10M y C10M no se obtuvo ARN, mientras que de las muestras de suelo fresco de jardín, sí (estos datos no se presentan). El método de extracción fue efectivo aunque no funcionó con algunas de nuestras muestras. Esto se puede deber a que, como se ha dicho con anterioridad, el ARN extraído del suelo, que representa la población biológicamente activa en el momento de la extracción (Griffiths et al., 2000), presentan alta sensibilidad a la degradación por nucleasas (ARNasas), enzimas

abundantes en las muestras biológicas y también presentes en las manos y en general por toda la superficie de nuestros cuerpos (Mettel et al., 2010).

Las muestras de ARN que sí se extrajeron se cuantificaron con Bioanalyser, que posee un software que calcula la concentración de ARN y dos parámetros que explican la calidad del mismo, que constituyen la relación que existe entre las cantidades de las subunidades 23S y 16S y el valor RIN. El uso de éste coeficiente facilita la determinación objetiva de la calidad del ARN. Este valor que puede ser desde 1 hasta 10 (correspondiendo a moléculas de ARN muy degradadas (1), y a moléculas intactas (10)) y se basa en la cuantificación de productos de degradación del ARN a lo largo de toda su migración electroforética (Tabla V.4.).

Tabla V.4. Concentración de ARN obtenido tras la extracción y valor del Número de Integridad de ARN (RIN).

| MUESTRAS | CONCENTRACIÓN (n gµl ⁻¹) | RIN |
|-------------------|--------------------------------------|-----|
| S FRESCO | 600±38.1* | 8.8 |
| S CONGELADO | 31.7±4.3 | 5.1 |
| S10J | 311±23.0 | 7.3 |
| S10M | 212±1.3 | 7.1 |
| T10J-MCPA | 418±64.2 | 6.5 |
| T10JS-metolacloro | 108±17 | 6.6 |

*Los números son medidas ± desviación estándar

Se encontró que el suelo S CONGELADO sufrió una reducción significativa de la concentración de ARN respecto al S FRESCO (mismo suelo arenoso S que no se congeló previo análisis) (Tabla V.4.). Esto es debido a que el proceso de congelación afecta a la población microbiana biológicamente activa presente en el mismo (Pesaro et al., 2003).

Al añadir alperujo, aunque el suelo se encontraba congelado previamente, la concentración de ARN aumentó hasta 10 veces respecto al suelo sin enmendar, siendo el aumento mayor al enmendar con AJ que con AM (Tabla V.4.). Esto demuestra que la adición de alperujo al suelo no reduce la actividad biológica de este suelo sino que por el contrario aumenta el contenido en microorganismos activos. El mayor número RIN cuantificado se encontró para el único suelo fresco (S FRESCO), seguido por los suelos S enmendados (S10J y S10M) (7.3 y 7.1, respectivamente), sin embargo, los suelos T10J-MCPA Y T10J-S-metolacloro mostraron ARN de menor calidad, lo que se atribuyó a la

posible degradación del mismo durante el proceso de incubación con los herbicidas (Tabla V.4.).

V.4.2.-Caracterización morfológica y recuento de UFC

Tras 6 días de incubación a 30°C y oscuridad, se procedió al recuento *de visu* y estudio morfológico de colonias de las placas inoculadas con extracto de suelo T sin enmendar (T0) y enmendado con AJ al 10% (p/p) (T10J) y suelos enmendados con AJ al 10% (p/p) incubados con MCPA y S-metolacloro 45 y 72 días, respectivamente (T10J-MCPA Y T10J-S-metolacloro). Con el fin de caracterizar la población microbiana de los residuos usados (AJ y AM), también se inoculó extracto de estos residuos (diluidos 10^{-4} y 10^{-6} para los alperujos AJ y AM, respectivamente). En la Figura V.3. se muestra el estado de las placas tras la incubación en el caso del herbicida MCPA (T10J y T10J-MCPA). Para los suelos S y C no se hizo el estudio de comparación con suelos incubados con los herbicidas porque no se disponía de muestra suficiente.

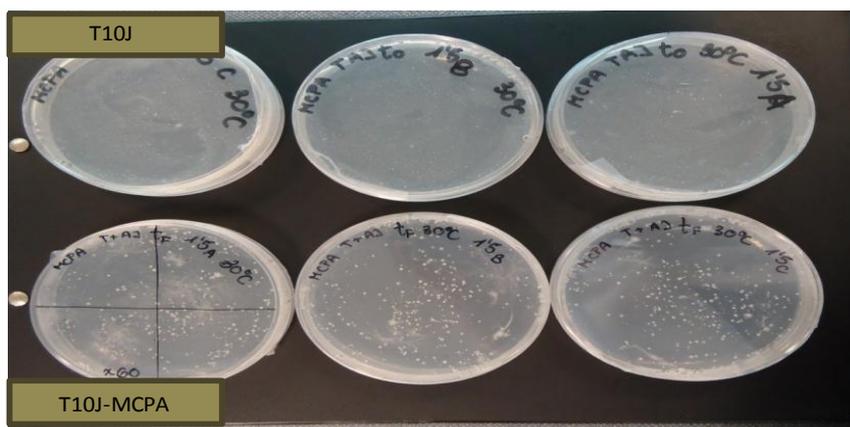


Figura V.3. Placas de medio TSA inoculadas con suelo T10J y T10J-MCPA tras 6 días a 30°C y oscuridad.

Durante el conteo *de visu* en los suelos T (T0) sin enmendar se encontraron mayoritariamente colonias de color blanco y azul. Las colonias azules no aparecían o su presencia era baja en el suelo T10, mientras que en los suelos enmendados tratados con los herbicidas (sobre todo el suelo T10J-MCPA), aparecían en mayor número que las blancas, lo que se ha atribuido a la presencia de herbicidas.

Tabla V.5. Número medio de UFC presentes en las placas inoculadas con los suelos T, T10J, T10J-MCPA Y T10J-Smetolacoloro.

| MUESTRA | COLONIAS BLANCAS (UFCx10 ² g ⁻¹) | COLONIAS AZULES (UFCx10 ² g ⁻¹) | TOTAL (UFCx10 ² g ⁻¹) |
|---------------------|--|---|---|
| T0 | 36±6* | 18±3* | 58 |
| T10J | 28±3 | 20±4 | 48 |
| T10J-MCPA | 19±4 | 70±12 | 89 |
| T10J-S-METOLACOLORO | 38±7 | 41±7 | 79 |

*Los números son medidas ± desviación estándar

Dichas colonias se aislaron, se purificaron y por un lado se extrajo su ADN para secuenciar, y por otro lado se sembraron en medio no selectivo TSA, con MCPA a distintas dosis (0, 0.3, 0.6, 1.5 y 2 kg ha⁻¹). Tras 6 días de incubación, se contaron las colonias presentes en los distintos tratamientos (Tabla V.5.) y se encontró que el número de colonias azules se veía incrementado frente a las colonias blancas, al aumentar la dosis de MCPA (Tabla V.5.). La incubación con el herbicida favoreció el crecimiento de estos organismos frente a los organismos formadores de colonias blancas.

Tabla V.6. Número de UFC de color blanco y azul en placas con concentraciones crecientes de MCPA.

| MCPA (kg ha ⁻¹) | COLONIAS BLANCAS (UFCx10 ² g ⁻¹) | COLONIAS AZULES (UFCx10 ² g ⁻¹) |
|-----------------------------|--|---|
| 0 | 18±4* | 67±12 |
| 0.3 | 17±3 | 72±9 |
| 0.6 | 23±3 | 82±12 |
| 1.5 | 10±2 | 85±9 |
| 2 | 11±2 | 110±15 |

*error estándar respecto a la media

V.4.3.-Aislamiento colonias seleccionadas, purificación y secuenciación

Se seleccionaron 25 colonias distintas visualmente de las placas TSA inoculadas con los suelos T0, T10J, T10J-MCPA, se sembraron en placas TSA de nuevo individualmente (técnica cultivo-dependiente) y una vez confirmado que representaban una única colonia se extrajo su ADN y se mandó a secuenciar (técnica cultivo-independiente). Los resultados de la secuenciación se muestran en la Tabla V.6.

Tabla V.7. Presencia (X) o ausencia (-) de las cepas (A1-A25) secuenciadas en los suelos T0, T10J, T10MCPA y T10JS-metolacloro.

| cepa | IDENTIDAD (%) | Identificación cepa | T0 | T10J | T10J | |
|------|---------------|--|----|------|------|---------------|
| | | | | | MCPA | S-metolacloro |
| A1 | 99 | <i>Achromobacter piechaudii</i> | x | x | x | x |
| A2 | 99 | <i>Achromobacter xylosoxidans*</i> | x | x | x | x |
| A3 | 100 | <i>Achromobacter sp</i> | x | x | x | x |
| A4 | 99 | <i>Bacillus sp.</i> | x | - | - | - |
| A5 | 99 | <i>Paenibacillaceae bacterium</i> | x | - | - | - |
| A6 | 99 | <i>Alcaligenes faecalis</i> | x | x | x | x |
| A7 | 98 | <i>Ensifer sp.</i> | x | - | - | - |
| A8 | 99 | <i>Ensifer adhaerens**</i> | x | - | - | - |
| A9 | 99 | <i>Acinetobacter schindleri</i> | x | x | x | x |
| A10 | 100 | <i>Acinetobacter sp</i> | x | x | x | x |
| A11 | 99 | <i>Acinetobacter johnsoni</i> | x | - | - | - |
| A12 | 100 | <i>uncultured bacterium clone A43</i> | | x | x | x |
| A13 | 96 | <i>Pseudomonas sp.</i> | x | x | x | x |
| A14 | 99 | <i>Pseudomonas putida</i> | x | x | x | x |
| A15 | 99 | <i>Pseudomonas fluorescens.</i> | x | - | - | - |
| A16 | 96 | <i>Gordonia sp.</i> | x | x | x | x |
| A17 | 98 | <i>uncultured Actinoplanes sp</i> | x | - | - | - |
| A18 | 98 | <i>uncultured Rhodocyclaceae bacterium</i> | x | - | - | - |
| A19 | 99 | <i>uncultured compost bacterium</i> | - | x | x | x |
| A20 | 98 | <i>uncultured actinobacterium</i> | x | x | x | x |
| A21 | 99 | <i>Rhizobium sp</i> | x | x | x | x |
| A22 | 99 | <i>uncultured Sinorhizobium</i> | x | x | x | x |
| A23 | 99 | <i>Janthinobacterium sp.</i> | x | x | x | x |
| A24 | 99 | <i>Duganella nigrescens</i> | x | x | x | x |
| A25 | 99 | <i>Oxalobacteraceae sp.</i> | x | x | x | x |

*También identificada por *Alcaligenes xylosoxydans*; ***Sinorhizobium morelense*

Todos los individuos que se secuenciaron en el suelo T sin enmendar (T0) se encontraron en el mismo suelo enmendado (T10J) (Tabla V.6.), lo que muestra que la población autóctona del suelo cultivable que fue secuenciada, no se afecta negativamente por la adición de enmienda, (AJ, en este caso), al contrario que lo encontrado en un estudio que detectó un efecto tóxico sobre microorganismos del suelo al enmendar con un residuo de extracción de aceite de oliva como en nuestro caso (Sampedro et al., 2009). La presencia de MCPA y S-metolacloro tampoco eliminó ninguna especie (entre las

cultivables), ni favoreció el crecimiento de ninguna nueva (Tabla V.6.). Además, no se encontraron diferencias entre los individuos secuenciados entre los suelos incubados con MCPA y con S-metolacloro. Estos resultados indican que la incubación a medio plazo no es suficiente para favorecer la presencia de organismos especializados en la degradación de estos herbicidas. En un estudio a largo plazo presentado por Singh y Ghoshal. (2010), la aplicación del herbicida butalacloro, sin embargo, reducía la actividad biológica total del suelo. Este efecto desaparecía cuando se aplicaban distintas enmiendas orgánicas (restos de poda, y estiércol) al suelo junto con el tratamiento de herbicida.

Tabla V.8. Tolerancia (T) y no tolerancia (NT) a MCPA a las dosis 2, 3, 5, 7 y 10 kg ha⁻¹.

| IDENTIDAD Cepa (%) | Nombre científico | Tolerancia a MCPA (kg ha ⁻¹) | | | | | |
|--------------------|-------------------|--|----|----|----|----|----|
| | | 2 | 3 | 5 | 7 | 10 | |
| A1 | 99 | <i>Achromobacter piechaudii</i> | T | T | T | T | NT |
| A2 | 99 | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> * | T | T | T | T | T |
| A3 | 100 | <i>Achromobacter sp</i> | T | T | T | T | T |
| A4 | 99 | <i>Bacillus sp.</i> | T | T | NT | NT | NT |
| A5 | 99 | <i>Paenibacillaceae bacterium</i> | T | T | NT | NT | NT |
| A6 | 99 | <i>Alcaligenes faecalis</i> | T | T | T | T | NT |
| A7 | 98 | <i>Ensifer sp.</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A8 | 99 | <i>Ensifer adhaerens</i> ** | NT | NT | NT | NT | NT |
| A9 | 99 | <i>Acinetobacter schindleri</i> | T | T | T | T | NT |
| A10 | 100 | <i>Acinetobacter sp</i> | T | T | T | T | NT |
| A11 | 99 | <i>Acinetobacter johnsoni</i> | T | T | T | T | NT |
| A12 | 100 | <i>uncultured bacterium clone A43</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A13 | 96 | <i>Pseudomonas sp.</i> | T | T | NT | NT | NT |
| A14 | 99 | <i>Pseudomonas putida</i> | T | T | NT | NT | NT |
| A15 | 99 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | T | T | NT | NT | NT |
| A16 | 96 | <i>Gordonia sp.</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A17 | 98 | <i>uncultured Actinoplanes sp</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A18 | 98 | <i>uncultured Rhodocyclaceae bacterium</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A19 | 99 | <i>uncultured compost bacterium</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A20 | 98 | <i>uncultured actinobacterium</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A21 | 99 | <i>Rhizobium sp</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A22 | 99 | <i>uncultured Sinorhizobium</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A23 | 99 | <i>Janthinobacterium</i> | T | T | T | T | T |
| A24 | 99 | <i>Duganella nigrescens</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A25 | 99 | <i>Oxalobacteraceae sp.</i> | T | T | T | T | T |

*También identificada por *Alcaligenes xylosoxydans* ***Sinorhizobium morelense*

Tabla V.9. Tolerancia (T) y no tolerancia (NT) al herbicida S-metolacloro a las dosis 2, 3, 5, 7, y 10 kg ha⁻¹.

| | IDENTIDAD Cepa (%) | Nombre científico | Tolerancia a MCPA (kg ha ⁻¹) | | | | |
|-----|--------------------|--|--|----|----|----|----|
| | | | 2 | 3 | 5 | 7 | 10 |
| A1 | 99 | <i>Achromobacter piechaudii</i> | T | T | T | T | T |
| A2 | 99 | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> * | T | T | T | T | NT |
| A3 | 100 | <i>Achromobacter sp</i> | T | T | T | T | NT |
| A4 | 99 | <i>Bacillus sp.</i> | T | T | NT | NT | NT |
| A5 | 99 | <i>Paenibacillaceae bacterium</i> | T | T | NT | NT | NT |
| A6 | 99 | <i>Alcaligenes faecalis</i> | T | T | T | T | NT |
| A7 | 98 | <i>Ensifer sp.</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A8 | 99 | <i>Ensifer adhaerens</i> ** | NT | NT | NT | NT | NT |
| A9 | 99 | <i>Acinetobacter schindleri</i> | T | T | T | NT | NT |
| A10 | 100 | <i>Acinetobacter sp</i> | T | T | T | NT | NT |
| A11 | 99 | <i>Acinetobacter johnsoni.</i> | T | T | T | NT | NT |
| A12 | 100 | <i>Uncultured bacterium clone A43</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A13 | 96 | <i>Pseudomonas sp.</i> | T | NT | NT | NT | NT |
| A14 | 99 | <i>Pseudomonas putida</i> | T | NT | NT | NT | NT |
| A15 | 99 | <i>Pseudomonas fluorescens.</i> | T | T | NT | NT | NT |
| A16 | 96 | <i>Gordonia sp.</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A17 | 98 | <i>Uncultured Actinoplanes sp</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A18 | 98 | <i>uncultured Rhodocyclaceae bacterium</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A19 | 99 | <i>uncultured compost bacterium</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A20 | 98 | <i>uncultured actinobacterium</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A21 | 99 | <i>Rhizobium sp</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A22 | 99 | <i>Uncultured Sinorhizobium</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A23 | 99 | <i>Janthinobacterium</i> | T | T | T | NT | NT |
| A24 | 99 | <i>Duganella nigrescens</i> | NT | NT | NT | NT | NT |
| A25 | 99 | <i>Oxalobacteraceae sp.</i> | T | T | T | T | T |

*También identificada por *Alcaligenes xylosoxydans*; ***Sinorhizobium morelense*

Tampoco se encontraron diferencias importantes entre los organismos que toleraban (Tabla V.9.) concentraciones altas de MCPA y S-metolacloro (Tablas V.7. y V.8.). Individuos como *Alcaligenes faecalis*, *Oxalobacteraceae sp.* y *Acinetobacter sp.* mostraron misma tolerancia a las distintas dosis de los herbicidas, aunque en algunos casos los organismos no crecían a la dosis más alta (10 kg ha⁻¹) (*Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter sp.* o *Janthinobacterium* (éste último que corresponde con las colonias azules encontradas). Se ha visto con anterioridad que estas bacterias son tolerantes a

algunos metales como Zn y a herbicidas, como puede ser atrazina, metolacoloro y nicosulfurón, y esta mayor tolerancia les confiere la capacidad de desplazar a otras bacterias cuando se dan concentraciones altas de estas sustancias en el suelo (Jackson et al., 2012). Se seleccionaron algunas cepas que mostraron tolerancia a la mayor concentración de los herbicidas, con el fin de determinar su capacidad de usar el herbicida como fuente de carbono. De los organismos que toleraban los herbicidas, se seleccionaron *Janthinobacterium*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter sp* para hacer inoculaciones en medio TSA con los herbicidas como única fuente de carbono, como se describirá en el apartado V.4.7. de éste capítulo.

Recientes estudios han revelado la presencia de microorganismos como *Oxalobacteraceae sp*, y *Janthinobacterium sp* en muestras de residuos orgánicos. Microorganismos del género *Achromobacter* se ha visto que poseen una alta capacidad para degradar moléculas aromáticas y se han aislado de suelos contaminados con metales pesados (Ma et al., 2008). También bacterias del género *Acinetobacter*, puede usar S como fuente de energía, se han aislado de composts (Meade et al., 2001). Individuos del género de *Alcaligenes* se han encontrado en residuos de lodo de depuradoras (Tanio et al., 1981) y se ha comprobado que son capaces de degradar fenantreno (Kiyahara et al., 1982). También se ha visto que puede degradar moléculas orgánicas como 4-clorofenol (Balfanz y Rehm, 1991).

Extractos de los alperujos se inocularon en placas Petri con medio TSA y se caracterizó la morfología de las UFC (Figura V.4. y Tablas V.10. y V.11.). Resultado de la inoculación, observamos alta diversidad de microorganismos respecto a la encontrada en los suelos (Tablas V.10. y V.11.). Los residuos de almazara presentan alto contenido en MOT (81% para AJ y 91% para AM) (Tabla II.2.) y ésto explica la abundancia en organismos biológicamente activos y su alta diversidad en comparación con los suelos. La población total contenida en AM es hasta 4 veces menor que en AJ, que aunque presentara mayor contenido en COS (4.1 g l⁻¹ respecto a 2.2 g l⁻¹ de AJ) su pH (4.8) era más ácido y constituyó un factor limitante en el crecimiento microbiano (Figura V.4.). Por otro lado, la mayor presencia de microbiota en el alperujo AJ, se explica además por su menor contenido en sustancias fenólicas (Tabla II.2.), que se han visto reducidas como consecuencia del proceso de compostaje, más avanzado en este alperujo que en el caso de AM.

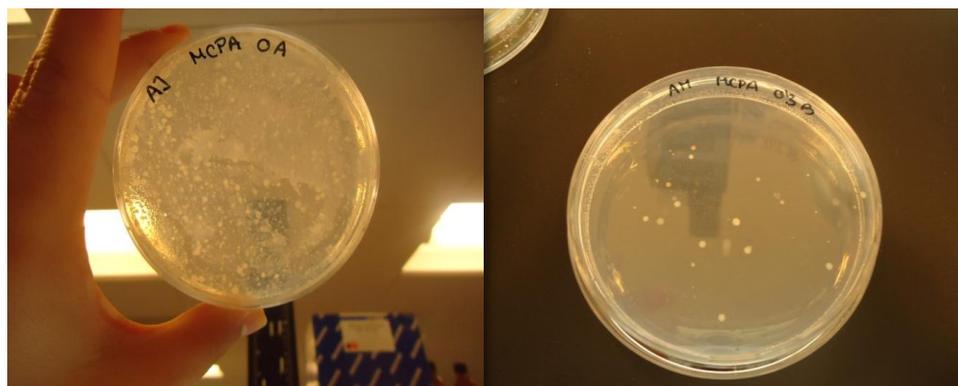


Figura V.4. Placas con medio TSA inoculado con extractos de los alperujos AJ (izquierda) y AM (derecha).

La presencia de *S*-metolacloro en las placas redujo el número medio de UFC y diversidad en el caso de las inoculadas con extracto de AM (Tabla V.10.), mientras que para el caso de MCPA, el número de UFC mostró una relación positiva con la concentración del mismo (Tabla V.10.). En el caso del alperujo AJ, en incremento en la concentración de tanto MCPA como *S*-metolacloro, redujo el número de UFC medio (Tabla V.11.).

Tabla V.10. Morfología y número de UFC en placas TSA inoculadas con extracto de AM.

| Tipos colonias AM (UFC g ⁻¹ de alperujo) | | | | | |
|---|-------|----------|------|--------|----------|
| Dosis MCPA (kg ha ⁻¹) | rosa | amarilla | azul | Blanca | MEDIA |
| 0 | 3±0 | 6±1 | - | 18±2 | 23±1 |
| 0,3 | 3±0 | 3±0 | 2±0 | 13±2 | 22.5±4.5 |
| 0,6 | 4±0.5 | 4±0 | - | 20±1 | 27.5±1.5 |
| 1 | 3±0.5 | 4±0 | - | 23±2.5 | 33.5±1.5 |
| Dosis <i>S</i> -metolacloro (kg ha ⁻¹) | rosa | amarilla | azul | Blanca | MEDIA |
| 0 | 2±0 | - | 3±0 | 24±2 | 24±0.5 |
| 0,3 | - | - | - | 16±1 | 16±1 |
| 0,6 | - | - | - | 14±1 | 14±2 |
| 1 | - | - | - | 16±1 | 16±0.5 |

*Los números son medidas ± desviación estándar

Tabla V.11. Morfología y número de UFC en placas TSA inoculadas con extracto de AJ.

| Tipos colonias AJ (UFC g ⁻¹ de alperujo) | | | | |
|---|------------------|------|----------|----------|
| Dosis MCPA (kg ha ⁻¹) | ramificada | azul | blanca | MEDIA |
| 0 | 2±0 [^] | 5±1 | 98±5.2 | 104±4.0 |
| 0,3 | - | - | 66.5±3.2 | 66,5±2.5 |
| 0,6 | - | - | 73.5±4.2 | 73.5±1.5 |
| 1 | - | - | 3.5±3.1 | 34.5±2.5 |
| Dosis S-metolacloro (kg ha ⁻¹) | amarilla | azul | blanca | MEDIA |
| 0 | 2±1 | 4±1 | 98±4.0 | 103±3.9 |
| 0,3 | 2±0 | 4±1 | 94±6.8 | 99±1.0 |
| 0,6 | 2±0 | 3±1 | 38±2.3 | 41±1.5 |
| 1 | 2±1 | 4±1 | 58±3.4 | 61±1 |

[^]error estándar respecto a la media.

V.4.4.-DGGE

Con el fin de evaluar el efecto de la adición de alperujo y de herbicida sobre la población microbiana a través de otro tipo de métodos cultivo-independientes que completen los resultados obtenidos tras la secuenciación, se hicieron geles DGGE con muestras de ADN y ADNc de los suelos. La similitud que se encontró entre los individuos secuenciados de las placas T y T10J se corroboró con un número parecido de bandas. Cada una de estas bandas representa a una población de individuos presente al menos en un 1% del total de individuos de la muestra de suelo (Casamayor et al., 2000). La Figura V.5. muestra los perfiles para los ADN de los suelos T y S sin enmendar y enmendados.

La adición de enmienda no afecta a la población bacteriana presente en el suelo originalmente, tal y como se encontró en los estudios en placas para extractos de suelos S y T. Esto se confirmó con los geles de DGGE para estos suelos, que no mostraron menor número de bandas (Figura V.5.).

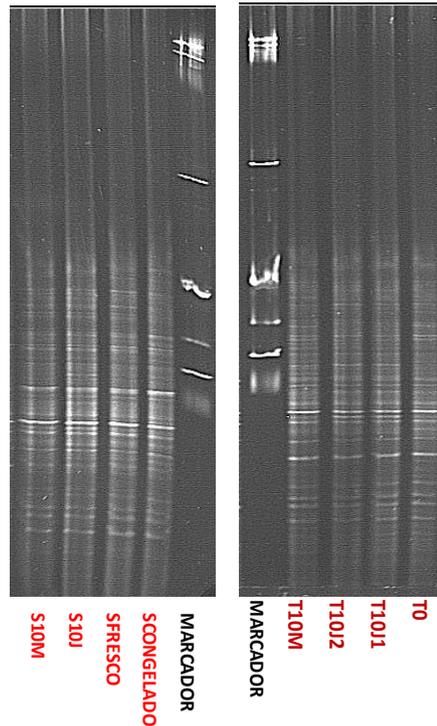


Figura V.5. Perfil DGGE comparando ADN extraído del suelo T (T0) sin enmendar y enmendado con AJ y AM (T10J y T10M) (derecha) y del suelo S congelado, fresco y enmendados con AJ y AM (S CONGELADO, S FRESCO, S10J Y S10M) (izquierda).

Aunque en el estudio de la concentración de ARN de estos suelos se encontró menor concentración en el suelo S CONGELADO respecto al S fresco (hasta 20 veces menos ARN), ni el número de bandas ni la intensidad de las mismas se redujo significativamente (Figura V.5.). Los suelos mostraron 25, 23, 26 y 25 bandas para los suelos T10M, T10J y T10I y T0, respectivamente. Los perfiles para el suelo arenoso, S, S CONGELADO, S FRESCO, S10J Y S10M, no mostraron diferencias entre el número de bandas ni intensidad de las misma (Figura V.5.). Hay que tener en cuenta que los perfiles de DGGE no proporcionan una cobertura completa de la diversidad bacteriana de los suelos, porque el número de bandas que pueden aparecer en él son limitadas (Muyzer, 1999; Nikolansz, et al., 2005), al presentar sólo bandas que representan mínimo un 1% de la totalidad de organismos presentes en las muestras, como se ha dicho anteriormente (Casamayor et al., 2000).

Frente a cultivos-dependientes, la técnicas PCR y DGGE se caracterizan por alta reproducibilidad y exactitud (Moreno et al., 2009), sin embargo, en este estudio el número total de bandas, no superó el número estimado de UFC observado a través de la técnica del conteo *de visu*.

Se comparó el ADN extraído con el ADNc sintetizado a partir de ARN de las muestras de suelos (Figura V.6.), ya que éste permite comparar las diferencias entre poblaciones microbianas activas biológicamente en el momento de la extracción y las no activas. La intensidad de algunas bandas, tanto en el caso del suelo T10J-MCPA como en el de T10J-S-metolacloro, fue mayor para el caso del ADNc que para ADN (flechas azules, Figura V.5.). La mayor intensidad de las bandas también coincide con los valores de concentración de ARN encontrados (Tabla V.4), aunque no se pudo cuantificar la concentración para el suelo T10J como referencia para los suelos incubados con herbicidas. Además, el perfil de ADNc para T10J-S-metolacloro mostró una banda que no aparecía en el perfil de ADN. Esto pudo deberse a que la población de estos organismos sea muy pequeña (igual o inferior al 1%), y a las limitaciones en la detección de bandas por la técnica de DGGE.

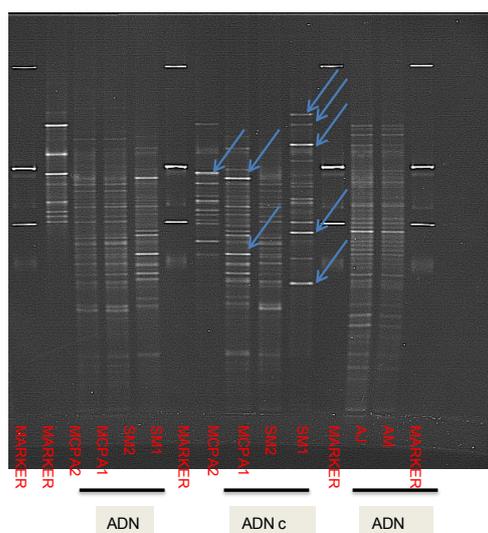


Figura V.6. Perfil DGGE comparando ADN y ADNc de los suelos T10J-MCPA y T10J-S-metolacloro AJ y AM.

Los perfiles para AJ y AM también se incluyeron en este gel para comparar la presencia de bandas en estos residuos frente a las de los suelos enmendados con ellos. Los alperujos mostraron mayor número de bandas y, por tanto, mayor diversidad microbiana que los suelos enmendados, lo que estaría de acuerdo con el mayor número de UFC y mayor diversidad morfológica encontrada en técnicas cultivo-dependientes mostrada en este capítulo (Tablas V.910. y V.11.). El alperujo AJ mostró 34 bandas fácilmente identificables, mientras que el AM, que mostró menor nitidez, sólo mostró 26.

V.4.5.-Selección de microorganismos resistentes

Resultado del estudio de tolerancia de cepas seleccionadas descrito en el apartado V.4.3., se escogieron *Janthinobacterium sp.*, *Achromobacter xylooxidans* y *Acinetobacter sp* para ser inoculadas por separado en matraces con 250 ml de medio líquido TSA (cuya composición ya ha sido descrita en el apartado V.3.6.) y con los herbicidas como única fuente de carbono. Al mismo tiempo se inocularon dos matraces como controles positivos con medio TSA y glucosa como fuente de carbono además del herbicida. Las Figuras V.7. y V.8. muestran la absorbancia del medio TSA respecto al tiempo de incubación y la cinética de degradación con los herbicidas MCPA y S-metolacoloro.

Antes de inocular las cepas en los matraces se purificaron y mandaron a secuenciar para confirmar que correspondían con una única especie. En el caso de *Acinetobacter sp*, la siembra en placas con medio enriquecido en glucosa reveló el crecimiento de dos tipos distintos de colonias. Tras varios intentos de aislamiento no se consiguió purificar la colonia. Esto puede ser debido a cometabolismo por parte de los dos individuos. La coexistencia y la participación en procesos de degradación multifásica de compuestos orgánicos se ha descrito con anterioridad (Schmidt y Gier., 1990). Por ello este organismo no se usó para los estudios de resistencia que a continuación se presentan.

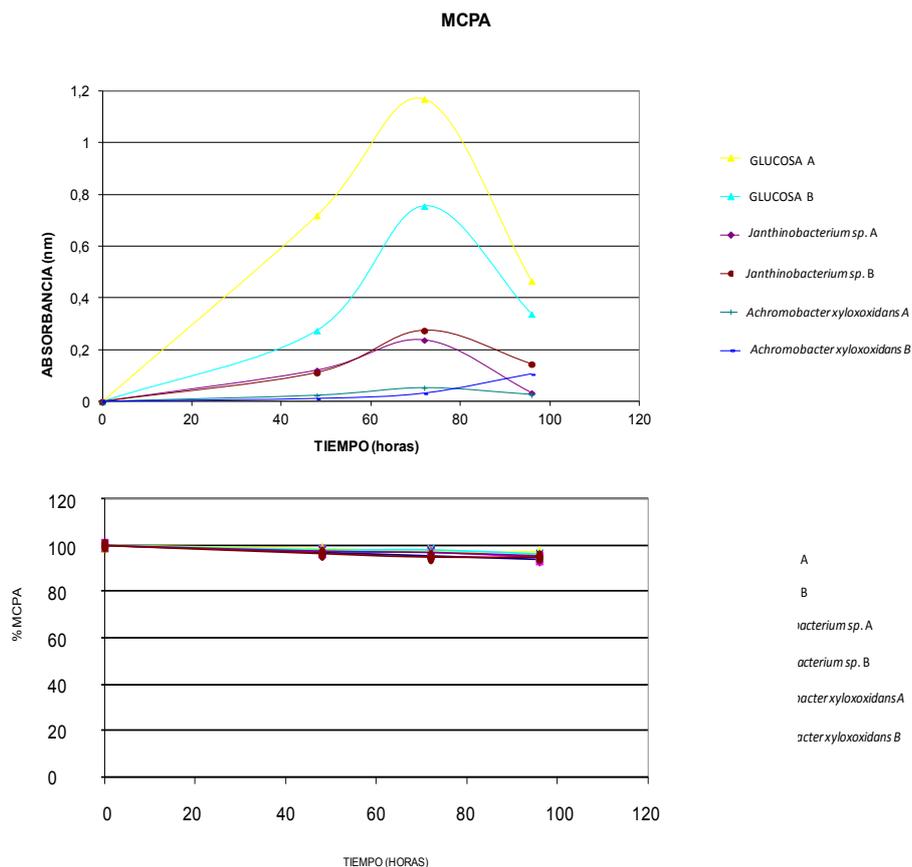


Figura V.7. Absorbancia del medio TSA respecto al tiempo de incubación con el herbicida MCPA (arriba) y cinética de degradación del herbicida (abajo).

Tras la inoculación de las cepas en los matraces se hizo un seguimiento del crecimiento de estas colonias a través de medidas de absorbancia del medio de cultivo a 600 nm, y a los mismos tiempos se midió en HPLC la concentración de herbicida en solución (Figuras V.7. y V.8). Este estudio reveló una absorbancia de hasta 1 nm para los organismos en el medio con glucosa (control positivo), mientras que en presencia de MCPA y *S*-metolacloro como fuente de carbono única, mostraron una absorbancia de 0.3 y 0.5, en presencia de MCPA y *S*-metolacloro, respectivamente. La cuantificación por HPLC de los herbicidas mostró muy baja capacidad de degradación de los mismos, más acusado para MCPA, que para *S*-metolacloro (Figuras V.7. y V.8.). Estudios recientes han mostrado la capacidad de levaduras para degradar el herbicida metolacloro (Muñoz et al., 2011). Además se encontró que el crecimiento de los organismos en los matraces se detenía en

torno a 70 h de incubación con los herbicidas tal y como se ve en las Figuras V.7. y V.8. La baja degradación de los herbicidas estudiados por los organismos *Janthinobacterium sp.* y *Achromobacter xylooxidans*, pudo deberse a este cese en el crecimiento de

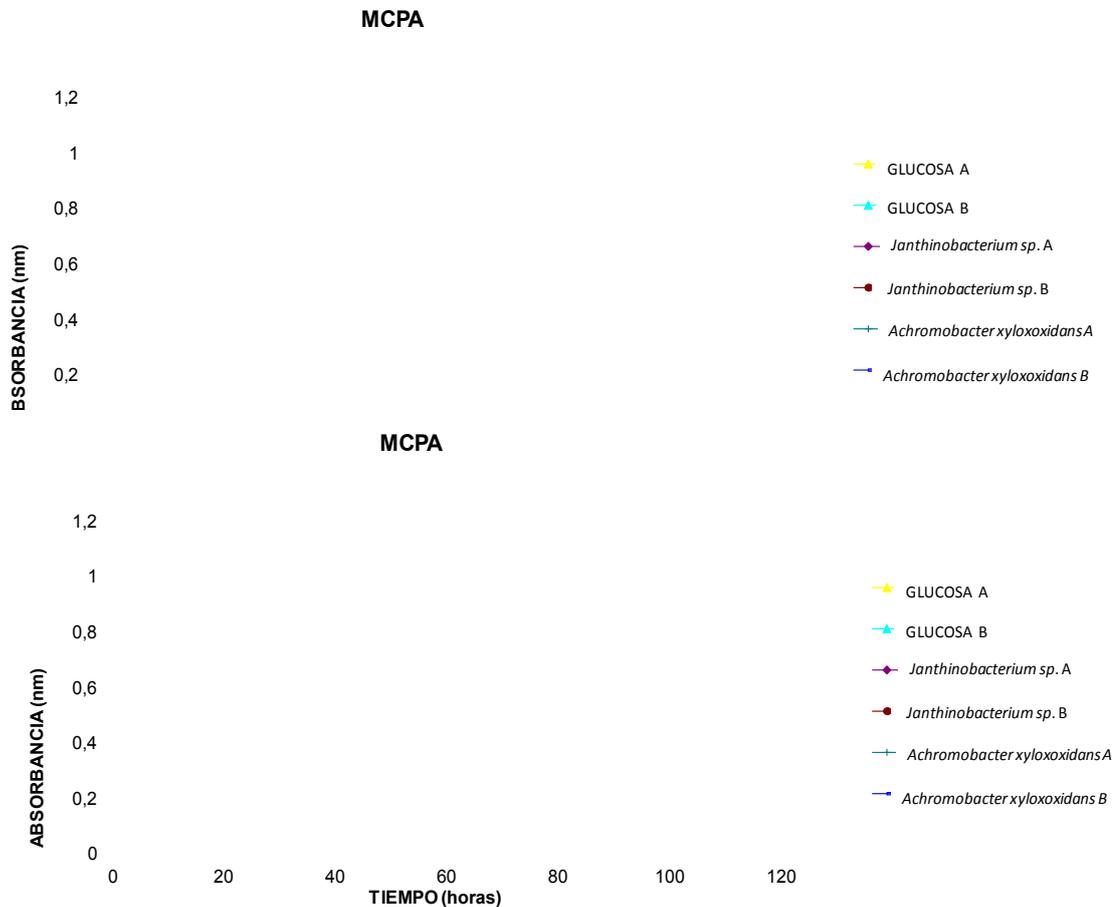


Figura V.6. Absorbancia del medio 15A respecto al tiempo de incubación con el herbicida S-metolaclo (arriba) y cinética de degradación del herbicida (abajo).

Durante los estudios de siembra en placas de Petri a altas dosis de herbicidas, se encontró la presencia de unas formaciones circulares similares a calvas de crecimiento. En la Figura V.9. se muestra el estado de estas estructuras. En estudios de suelos contaminados con herbicidas o con metales pesados, se ha encontrado que son frecuentes. La formación de estas estructuras se atribuye a la presencia de fagos en respuesta a una situación de estrés, como son las altas concentraciones de herbicidas o

contaminantes, y que destruyen las bacterias que se encuentran alrededor (deteniendo el crecimiento de las poblaciones presentes en los matraces), y surgen colonias resistentes mutantes en el interior de la calva.

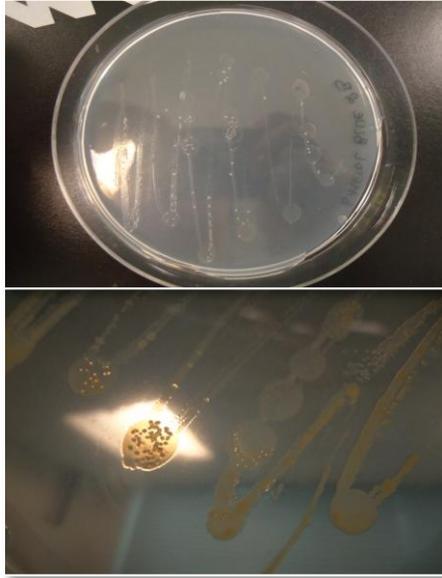


Figura V.9. Arriba placa de Petri en medio TSA con evidencia de las formaciones circulares (calvas) consecuencia de la presencia de fagos en la población microbiana. Abajo, detalle de una calva.

V.5.-Conclusiones

El uso de enmiendas orgánicas como los alperujos y los herbicidas MCPA y S-metolacoloro, no produjo efecto tóxico sobre la población microbiana presente en las muestras de suelo estudiadas, ya que estudios cultivo-dependientes como la inoculación en placas Petri, revelaron aumento en el número de colonias de los suelos enmendados respecto a los suelos sin enmendar y cierto cambio en la composición de las poblaciones microbianas, favoreciendo a aquellas más tolerantes a los herbicidas.

Con respecto a los estudios cultivo-independientes como la DGGE, las bandas en el perfil de los suelos enmendados se intensifican, lo que coincide con un aumento en la concentración de ARN de estos suelos, y por tanto de la actividad biológica. La adición de enmienda, por tanto a los suelos, no sólo no afecta negativamente a los suelos, sino que además parece que favorece la actividad microbiana, como revelan las concentraciones de ARN y el coeficiente RIN.

Muchos organismos que se detectaron en los extractos de suelos mostraron algún tipo de tolerancia a la presencia de los herbicidas, y sin embargo, los estudios con organismos tolerantes hasta la máxima dosis de herbicida aplicada, no fueron capaces de degradar eficazmente los dos herbicidas estudiados. Esto puede atribuirse a la presencia de fagos en las placas de cultivo, que surgen como respuesta a situaciones de estrés, como la presencia de altas concentraciones de herbicidas, y eliminan a las colonias vivas de las muestras de suelo.

V.6.-Bibliografía

- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñeiro, A., Ortega-Calvo, J.J., Cornejo, J. Effects of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use Manage.* **2003**, 19, 150-156.
- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñeiro, A., Cornejo, J. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere.* **2004**, 54, 717-724.
- Arias, M.E., González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Ball, A.S. Soil health-a new challenge for microbiologists and chemists. *Internat. Microbiol.* **2005**, 8, 13-21.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Inglesmo, F. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticulture soil. *Bioresource Technol.* **2000**, 75, 43-48.
- Altschul, S.C., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Molec. Biol.* **1990**, 215, 403-410.
- Badalucco, L., Rao, M., Colombo, C., Palumbo, G., Laudicina, V.A., Gianfreda, L. Reversing agriculture from intensive to sustainable improves soil quality in a semiarid South Italian soil. *Biol. Fertil. Soils.* **2010**, 46, 481-489.
- Balfanz, J. y Rehm, H.J. Biodegradation of 4-chlorophenol by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. A 7-2 in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, 35, 662-668.
- Brock, T.D. **1966**. Principles of Microbial Ecology. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ 306 pp.
- Calvo-Bado, L.A., Oakley, B.B., Dowd, Green, L.E. Medley, G.F., Ul-Hassan, Atiya, Bateman, V., Gaze, W., Witcom, L., Jasmeet Kaler, G-T., Russell, C.L., Wellington, E.M.H. Ovine pedometrics: the first study of the ovine foot 16S rRNA-based microbiome. *ISME J.* **2011**, 1-12.
- Caracciolo, A.B., Bottoni, P., Grenni, P. Fluorescence in situ hybridization in a soil and water ecosystems: a useful method for studying the effect of xenobiotics on bacterial community structure. *Toxicol. Environ. Chem.* **2010**, 92, 567-579.
- Casamayor, E.O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedro-Alió, C., Muyzer, G. Identification and spatiotemporal differences between microbial assemblages from two

- neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *App. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 499-508.
- Claesson, M.J., O'Sullivan, O., Wang, W., Nikkila, J., Marchesi, J.R. Smidt, H., M. de Vos, W., Ross, R.P., O'Toole, P.W. Comparative analysis of Pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *Plos one.* **2009**, 4, 8, 6669.
- Edenborn, S.L., Sextstone, A.J. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses. *Soil Biology and Biochemistry.* **2007**, 39, 1570-1579.
- Fliessbach, A. y Mader, P. Short-term effects on soil microorganisms of two potato pesticide spraying sequences with either glufosinate or dinoseb as defoliant. *Biol. Fertil. Soils.* **2004**, 40, 4, 268-267.
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., Glover, L.A. Bacterial diversity promoted community structure stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* **2005**, 7, 301-313.
- Grenni, P., Rodríguez-Cruz, M.S., Herrero-Hernández E., Marín-Benito J.M., Sánchez-Martín M.J., Caracciolo A.B. Effects of wood amendments on the degradation of Terbutylazine and on soil microbial community activity in a clay loam soil. *Water Air Soil Pollut.* **2012**, 223, 5401–5412.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., Bailey, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA-and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 5488-5491.
- Gonod, L.V., Martin-Laurent, F., Chenu, C. 2,4-D impact on bacterial communities, and the activity and genetic potential of 2,4-D degrading communities in soil. *Microbial Ecol.* **2006**, 58, 529-537.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed, Sci.* **1999**, 48, 89-93.
- Jackson, V.A., Paulse, A.N. Odendaal, J.P., Khan, S., Khan, W. Identification of metal-tolerant organisms isolated from the Plankenburg River, western Cope, South Africa. **2012**, *Water S.A.* vol. 38 nº1.
- Kilham, K. **1994**. *Soil Ecology*. Cambridge. Cambridge University Press.

- Kiyohara, H., Nagao, K., Kouno, K., Yano, K. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis*, AFK2. Appl. Environment. Microbiol. **1982**, 458-461.
- Klose, S., Ajwa, H.A. Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives. Soil Biol. Biochem. **2004**, 36, 1625-1635.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction *Brassica juncea*. J. Environ. Manage. **2009**, 90, 2, 831-7.
- Majumdar, K. y Singh, N. Effect of soil amendments on sorption and mobility of metribuzin in soils. Chemosphere. **2007**, 66, 630-637.
- Meade, M.J., Wadell, R.L., Callahan, T.M. Soil bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans* inactivate triclosan in liquid and solid substrates. FEMS Microbial Lett. **2001**, 204, 1, 45-48.
- Melero, S., Madejón, E., Ruiz, J. C., Herencia, J.F. Chemical and biochemical properties of a clay soil under dryland agriculture system as affected by organic fertilization. Europ J. Agronomy. **2007**, 26, 327-334.
- Mettel, C., Kim, Y., Shrestha, P.M., Liesack, W. Extraction of mRNA from soil. Appl. Environ. Microbiol. **2010**, 5995-6000.
- Moreno, V.R., Sifuentes, A.M., Pereyra, B. Herramientas para el análisis de ariación genético-molecular. Ciencia UANL. **2009**, XII, 2, 201-205.
- Muñoz, A., Koskinen, W.C., Cox, L., Sadowsky, M.J. Biodegradation and mineralization of Metolachlor and Alachlor by *Candida xestobii*. J. Agric, Food Chem. **2011**, 59, 619-627.
- Muyzer, G. de Waal, E.C. Uitterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environ. Microbiol. **1993**, 59, 695-700.
- Muyzer, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiology. **1999**, 317-322.
- Niewiadomska, A., Effect of Carbendazim, Imazetapir and Thiram on nitrogenase activity, the number of microorganisms in soil and yield of red clover (*Trifolium pretense* L.). Polish J. Environm. Studies. **2004**, 4, 403-410.

- Nikolausz, M., Sipos, R., Révész, S., Székely, A., Márialigeti, K. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbil. Letters*. **2005**, 244, 385-390.
- Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S.S., Mazzatur, A., Casucci, C. Effect of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*. **2000**, 32, 17-23.
- Pesaro, M., Widmer, F., Nicollier, G., Zeyer, J. Effects of freeze-thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. *Soil Biol. Biochem*. **2003**, 35, 8, 1049-1061.
- Petrosino, J.F., Hieghlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A., Versalovi, J. Metagenomic Prosequencing. *Clinic. Chem*. **2009**, 55, 5.
- Sampedro, I., Giubilei, M., Cajthaml, T., Federici, E., Federici, F., Petruccioli, M., D'anibale, A. Short-term impact of dry olive mil residue addition to soil on the resident microbiota. *Bioresource Technol*. **2009**, 100, 6098-6106.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. biochemistry*. **1977**, 74, 12, 5463-5467.
- Schmidt, S.K., Gier, M.J. Coexisting bacterial populations responsible for multiphasic mineralization kinetics in soil. *Amer. Soc. Microbiol*. **1990**, 2692-2697.
- Schmidt, T.M., The maturing of microbial ecology. *Internat. Microbiol*. **2006**, 9, 217-223.
- Shäfer, H., y Muyzer, G. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods. Microbial*. **2001**, 30, 425-468.
- Shrestha, P.M., Kube, M., Reinhardt, R., Liesack, W. Transcriptional activity of paddy soil bacterial communities. *Environ. Microbiol*. **2009**, 960-970.
- Si, Y., Zhang, J., Wang, S., Zhang, L., Zhou, D. Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethametsulfuron-methyl in acidic soils in China. *Geoderma*. **2006**, 130, 66-76.
- Singh, K., Munro, S., Potts, J. M y Millard, P. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Appl. Soil. Ecol*. **2007**, 36, 147-155.
- Singh, P. y Ghoshal, N., Variation in total biological productivity and soil microbial biomass in rainfed agroecosystems: Impact of application of herbicide and soil amendments. *Agric. Ecosyst. Environ*. **2010**, 241-250.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* **2007**, 24, 1596-1599.
- Tanio, T., Fukui, Y. S., Saito, T., Tomita, K., Kaiho, T., Masamune, S. An extracellular Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Eur. J. biochem.* **1982**, 124, 71-77.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, 56, 782-787.
- Torsvik, V. y Ovreas, L. **2007**. Microbial phylogeny and diversity in soil. En: *Modern Soil Microbiology*, second edition, van Elsas, J.D., Janson, J.K. y Trevors, J.D. (eds.) CRC Press, Boca Ratón, FL. USA, pp. 23-54.
- Viti, C., Quaranta, D., De Philippis, R., Corti, G., Agnelli, A., Cuniglio, R., Giovannetti, L., Characterizing cultivable soil microbial communities from copper fungicide-amended olive orchard and vineyard soils. *World. J. Microbial. Biotechnol.* **2008**, 24, 309-318.
- Voos, G. y Groffman, P.M. Relationships between microbial biomass and dissipation of 2, 4-D and dicamba in soil. *Biol. Fertil.* **1997**, 24, 1, 106-110.
- Wang, Y., Qian, P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **2009**, *PLoS ONE*, 4, 10, e7401.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Freitag, T., Guillaumanud, N., Roux, X.L. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environ. Microbiol.* **2006**, 8, 2162-2169.
- Wong, J.W.C., Lai, K.M., Fang, M., Ma, K.K. Effect of sewage sludge amendment on soil microbial activity and nutrient mineralization. *Environ. Internat.* **1998**, 24, 935-943.
- Wu, T., Chellemi, D.O., Graham, J.H., Martin, K.J., Roskopf, E.N. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. *Microbiol. Ecol.* **2008**, 55, 293-310.

Capítulo VI
General Conclusions

VI.-General conclusions

1. The olive oil mill waste AJ, with higher pH and lower soluble organic carbon (COS) than AM, presented low lignin and cellulose content, characteristic of humified material. The fluorescence spectrum of the COS of the wastes revealed higher HIX for AJ than for AM (9.5 and 1.3, respectively), corroborating the higher humification of AJ. The amendment AM presented more phenolic compounds in solution, which increased acidity of the residue. In case of AJ, these last compounds were degraded due to composting and humification processes. Both fluorescence and infrared results confirmed the different nature of the dissolved organic compounds of these residues. Despite the similar organic matter content, it is possible to conclude the AJ residue is a better option as organic amendment for the soils, as it provides more stable organic matter than AM.

2. Surface and porosity studies of the soils S, C and T revealed that addition of AJ and AM at 5% and 10% doses, increased the total pore volume in the three soils studied when compared to unamended soils. Olive mill residue addition increased dissolved organic carbon content and therefore bioavailable carbon source for soil microorganisms explaining higher respiration found in C and T soils.

3. MCPA sorption was concentration dependent (*L* type isotherms), while *S*-metolachlor sorption was not affected by concentration in the range studied (*C* type isotherms). The soils S, C and T showed very low and low sorption capacity of MCPA and *S*-metolachlor, respectively. K_{fads} values for MCPA in amended soils did not showed great increase in sorption in these three soils, while K_{d10} did, mainly when amending with AJ. K_{fads} and K_{d10} coefficients for *S*-metolachlor were both increased when amending with the wastes, but higher increased was found for AJ.

4. Sorption of MCPA and *S*-metolachlor in unamended soils, although low, was not reversible, as higher n_{fads} than n_{fdes} (except in case of the C soil) were found. However, amended soils showed reversible sorption for MCPA. Increase in dissolved organic carbon upon amendment could be responsible of this, as desorption of herbicide could be favored from the solid to the liquid phase. In case of MCPA, addition of the organic residues, did not favor desorption of *S*-metolachlor.

5. Half lives of MCPA in unamended soils were lower in the case of C and T soils, of higher organic carbon content. This was attributed to higher biological activity in the soils. No significant differences were found in case of *S*-metolachlor. Addition of the residues increased persistence of MCPA and *S*-metolachlor in the soils. This was attributed, on one hand, to the higher sorption capacity of amended soils, and on the other hand, to organisms in the soil using alperujo as organic carbon source instead the herbicide, increasing persistence in soil. Addition of amendment reduced the MCPA mineralization in all the studied soils, corroborating dissipation studies.

6. Mobility studies revealed low and high retention capacity for MCPA and *S*-metolachlor, respectively, showing lower leaching when amending, mainly in the case of the last herbicide. Increase in soil pore volume obtained when amending did not increase leaching of the herbicides. Organic matter is a determinant factor to be considered in leaching.

7. Organic residues (alperujo (OW) and orujo (DW)) addition increased sorption of the herbicides *S*-metolachlor and bentazone, especially in the case of the last. Higher sorption was observed in soils amended in the laboratory (OW5, OW10, DW5 y DW10) compared to field amended soils (OW30, OW60, DW27 y DW54). This was attributed to the high dissolved organic carbon content present in the laboratory amended soils.

8. Amended soils with OW showed similar bentazone half lives to unamended soils. At the contrary, amended DW-soils, increased bentazone half lives by a factor of 2 and 3 in DW27 and DW54 amended soils, respectively. Laboratory amended soils showed an increase in half lives of 18-fold respect the original soil. Amended soils did not show significant differences in persistence of *S*-metolachlor when compared to unamended soil. Increase in bentazone sorption did not result in lower leaching. On the contrary, a strong reduction in *S*-metolachlor leaching in amended soils was observed.

9. Bentazone mineralization was reduced in both field and lab amended soils. However, dehydrogenase activity of soils in presence of *S*-metolachlor did not revealed herbicide nor residue toxic effect, confirming the increase in soil respiration upon amendment.

10. Terbutylazine, unlike glyphosate, was an indirect phytotoxicity source for olive plants, reducing the photosynthetic efficiency under greenhouse conditions, which was counterbalanced by the addition of alperujo to the soil, as increase in sorption of the herbicides molecules was found.

11. Addition of the organic residues AJ or AM did not reduced microbial population in soils. Tolerance studies at high herbicide doses revealed the presence of tolerant, but not resistant organisms to MCPA and S-metolachlor in the soils used. Culture-dependent studies showed an increase in number of organisms in amended soil respect to the unamended ones and a slight change in population composition. The addition of amendment, modified the composition of microbial populations, favoring more tolerant organisms to wastes and herbicides, as no toxic effect on microbiota was found. Independent-culture studies (DGGE) showed an increase in intensity of bands in amended soils profile, which coincided with an increase in ARN concentration in soils. Absence of toxic effect of the residues, and indeed, a positive tendency, was observed in case of addition of alperujo to the soils.

Capítulo VII
Publicaciones

Effect of the Herbicides Terbutylazine and Glyphosate on Photosystem II Photochemistry of Young Olive (*Olea europaea*) Plants

Ana I Cañero,[†] Lucía Cox,^{*,†} Susana Redondo-Gómez,[†] Enrique Mateos-Naranjo,[†] María C. Hermosín,[†] and Juan Cornejo[†]

[†]Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC, Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain

^{*}Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 1095, 41080 Sevilla, Spain

ABSTRACT: The purpose of this study was to understand the effect produced by the addition of the herbicides terbutylazine (*N*⁴-*tert*-butyl-6-chloro-*N*⁶-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) and glyphosate (*N*-(phosphonomethyl)glycine) on photosystem II photochemistry of young plants of *Olea europaea* L. under greenhouse conditions. The effect of soil amendment with an organic residue from olive oil production was also assessed. Terbutylazine reduced the efficiency of photosystem II photochemistry of plants due to chronic photoinhibition, and this effect was counterbalanced by soil amendment with the organic waste, whereas the photosystem II photochemistry of olive plants was not affected by glyphosate or by glyphosate and organic waste addition. In this study, we have shown that the soil application of terbutylazine is a source of indirect phytotoxicity for olive plants. We have also observed that the olive plants were not affected by higher amounts of glyphosate in the soil.

KEYWORDS: herbicide, *Olea europaea*, organic waste, chlorophyll fluorescence, photosynthesis

■ INTRODUCTION

The use of pesticides, especially herbicides, has brought to the agricultural sector great advantages during the last 50 years, but equally the negative aspects of their use are also recognized. Herbicides can damage nontarget plants such as the crop itself, and great economic losses can be realized.¹ Furthermore, the repetitive use of these compounds can exceed the buffering function of soil compartments becoming great sources of contamination of surface and groundwater.^{2–5}

Despite their efficiency on target organisms, herbicides generate nonspecific phytotoxicity.⁶ The reduction in the photosynthetic efficiency of plants as a consequence of stressing environmental factors such as herbicides has been observed in several studies.^{7–9} Light energy absorbed by chlorophyll molecules in a leaf can undergo one of the three fates: it can be used to drive photosynthesis (photochemistry), excess energy can be dissipated as heat or it can be re-emitted as light-chlorophyll fluorescence. Hence, changes in the efficiency of photochemistry and heat dissipation can be obtained by measuring chlorophyll fluorescence of photosystem II (PSII),¹⁰ and this can be detected *in situ* using a pulse amplitude modulation fluorimeter.¹¹ Chlorophyll and gas exchange measurements are nondestructive biomarkers of sublethal plant stress in environmental monitoring or in ecological risk assessment of herbicide exposure.^{9,12–16}

Our group has previously shown that diuron and simazine, herbicides used in the past in olive crops and now banned in Spain, reduce the efficiency of photosystem II photochemistry (the ultrafast and ultraefficient light-induced charge separation and stabilization steps that occur when light is absorbed by chlorophyll¹⁷ of seedlings and adult olive trees due to chronic photoinhibition.^{15,16} In both cases, we have observed that the addition of an organic waste from olive oil production counterbalances this effect. The aim of this study was to investigate the effect of the herbicides terbutylazine and glyphosate, both

currently used in olive crops in Spain, on the photosynthetic apparatus (PSII chemistry) and gas exchange of three-year old olive trees, and to evaluate if this effect is influenced by soil amendment with an organic waste from olive oil production. These herbicides have a very different mode of action. Terbutylazine (*N*⁴-*tert*-butyl-6-chloro-*N*⁶-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) is a preemergence selective herbicide applied directly to the soil and mainly absorbed by roots. It inhibits the Hill reaction and CO₂ sorption in the chlorophyll function.¹⁸ Glyphosate (*N*-(phosphonomethyl)glycine) is a postemergence nonselective herbicide which inhibits 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase, an intermediate enzyme in aromatic amino acid synthesis, via the shikimic acid pathway.¹⁹ It is mainly absorbed by leaves, although some root absorption has also been reported.^{20–22} Beside soil surface contamination, translocation of glyphosate from leaves to plant roots has been shown to be also responsible for glyphosate residues in the soil.²³ These herbicides also have very different soil sorption behavior,^{24–27} and the effect of this soil process on photosystem II photochemistry will also be evaluated.

■ MATERIALS AND METHODS

Herbicides, Soil and Organic Waste. High purity (99%) standard terbutylazine and glyphosate (98%) were used in sorption studies under laboratory conditions. Both herbicides were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Terbutylazine is a colorless powder with a water solubility of 8.5 mg L⁻¹ at 20 °C, and glyphosate is an odorless white crystal very soluble in water (10 g L⁻¹ at 20 °C) and practically insoluble in common organic solvents.²⁸

Received: March 3, 2011

Accepted: April 25, 2011

Revised: April 20, 2011

Table 1. Physicochemical Properties of Unamended (S) and Amended Soils at 5% Rate (S + 5% OW) and 10% Rate (S + 10% OW)

| parameter | soil | | |
|--------------------|------|-----------|------------|
| | S | S + 5% OW | S + 10% OW |
| organic carbon (%) | 1.9 | 3.7 | 5.4 |
| clay (%) | 18.2 | 18.2 | 18.2 |
| silt (%) | 22.2 | 22.2 | 22.2 |
| sand (%) | 59.5 | 59.5 | 59.5 |
| pH | 7.4 | 7.1 | 6.7 |

Radio-labeled glyphosate (P-Methylene-14C) with specific activity 11.4 MBq mg⁻¹, supplied by IZOTOP (Budapest, Hungary), was also used to perform sorption studies under laboratory conditions. Commercial formulations of the herbicides were used for the studies with olive plants under glasshouse conditions: glyphosate (Glialia 36) 360 g of active ingredient L⁻¹, Promar S.L., Spain) and terbuthylazine (CUNNA) 50 g of active ingredient L⁻¹, Sipcam Inagra S.A., Spain).

The top 5 cm of a sandy soil from Southern Spain was sampled, air-dried and sieved to pass a 2 mm mesh. Physicochemical properties are given in Table 1. The organic carbon (OC) content of the soil was determined by dichromate oxidation,²⁹ and the pH was determined in a 1:2.5 (kg L⁻¹) soil/deionized water mixture. Soil texture was determined by sedimentation.

The oil olive-mill waste (OW) used is a residue from olive oil production obtained by a two-phase centrifugation process.^{30,31} The organic matter content of this residue (determined by calculation) is 81%, and the pH is 6.7 (1:2 kg L⁻¹ residue/deionized water mixture).

Herbicide Sorption Studies. Duplicate samples of 5 g of unamended soil and soil amended with OW at 5% and 10% (w/w) were treated separately with 10 mL of terbuthylazine and glyphosate solutions (initial concentrations, C₀, of 1, 5, 10, and 20 μM in 0.01 M CaCl₂). Previously, it was determined that equilibrium was reached in less than 24 h, and that no measurable degradation occurred during this period. The suspensions were centrifuged 10 min at 8000 rpm. In the case of terbuthylazine, the equilibrium concentrations (C_e) in the supernatants were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) under the following conditions: Nova-Pack column, 150 mm length × 3.9 mm i.d.; column packing, C18; flow rate, 1 mL min⁻¹; eluent system: water + acetonitrile (1 + 1 by volume) mixture and detection at 222 nm. In the case of glyphosate, C_e was determined by liquid scintillation counting (LSC). One milliliter aliquots were removed for analysis and mixed with 5 mL of scintillation cocktail. Differences between C₀ and C_e were assumed to be the amount adsorbed (C_a = μmol kg⁻¹). Sorption isotherms were fitted to the Freundlich equation: C_a = K_fC₀^{1/n}, and sorption coefficients K_f and 1/n calculated.

Plant Material and Treatments. *Olea europaea* L. trees (three years old) were grown in plastic pots (26 cm length × 15 cm diameter) filled with the sandy soil and placed in a glasshouse with minimum–maximum temperatures of 21–25 °C, 40–60% relative humidity and natural daylight (minimum and maximum light flux: 200 and 1000 μmol m⁻² s⁻¹). Five different treatments were done in triplicate pots: Pots with the organic residue added to the soil at the rate of 10 Mg ha⁻¹ (OW pots), pots with terbuthylazine added to the soil at the rate of 3 kg ha⁻¹ (T pots), pots with glyphosate added to the soil at the rate of 3 kg ha⁻¹ (G pots) and pots with terbuthylazine and OW (T + OW pots) or glyphosate and OW (G + OW pots). Triplicate pots without herbicide or organic waste were used as controls. Herbicides were applied to the top of the soils 24 h after the application of the OW.

The length of four branches and two leaves/branch of each plant were measured and statistically analyzed, so it was possible to form homogeneous biomass replicates for the different treatments.

Measurement of Chlorophyll Fluorescence. Chlorophyll fluorescence was measured in the olive leaves using a portable modulated fluorimeter (FMS-2, Hansatech Instrument Ltd, England) after 24 h, 15 days and 60 days of treatment in order to know the physiological response in the short and long term. Redondo-Gómez et al.³² reported that fluorescence parameters of olive trees were affected by herbicide treatments from week one, but Redondo-Gómez et al.³³ found that these parameters are not affected until two months of treatment. Light and dark-adapted fluorescence parameters were measured at dawn (between 1 and 7 μmol m⁻² s⁻¹) and midday (1700 μmol m⁻² s⁻¹) in order to determine if herbicide, OW or the combination of both affected the sensitivity of plants to photoinhibition.³⁰ Plants were dark-adapted for 30 min, using leaf-clips designed for this purpose. The minimal fluorescence level in the dark-adapted state (F₀) was measured using a modulated pulse (<0.05 μmol m⁻² s⁻¹ for 1.8 μs) too small to induce significant physiological changes in the plant. Maximal fluorescence in this state (F_m) was measured after applying a saturating actinic light pulse of 15000 μmol m⁻² s⁻¹ for 0.7 s. Values of the variable fluorescence (F_v = F_m - F₀) and maximum quantum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m) were calculated from F₀ and F_m. The same leaf area of each plant was used to measure light-adapted parameters. Steady state fluorescence yield (F_s) was recorded after adapting plants to ambient light conditions for 30 min. A saturating actinic light pulse of 15000 μmol m⁻² s⁻¹ for 0.7 s was then used to produce the maximum fluorescence yield (F_m) by temporarily inhibiting PSII photochemistry.

Using fluorescence parameters determined in both light- and dark-adapted states, the following were calculated: quantum efficiency of PSII (Φ_{PSII} = F_v/F_m - F_v/F_m), and nonphotochemical quenching (NPQ = F_m - F_v/F_m).³²

Chronic (PI_{chl}) and dynamic (PI_{dyn}) photoinhibition was calculated according to Werner et al.³³ as follows: PI_{chl} = [(F_v/F_m)_{dark} - (F_v/F_m)_{light}]/(F_v/F_m)_{light} × 100; PI_{dyn} = [(F_v/F_m)_{mid} - (F_v/F_m)_{dawn}]/(F_v/F_m)_{dawn} × 100, where (F_v/F_m)_{dawn} and (F_v/F_m)_{mid} are dawn and midday F_v/F_m values, respectively. (F_v/F_m)_{dark} is maximum F_v/F_m value, which was calculated as the average of dawn measurements at different times and treatments.

Measurement of Gas Exchange. Gas exchange analysis was made using an open system (LI-6400, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) after 24 h, 15 days and 60 days of treatment. Net photosynthetic rate (A), stomatal conductance to CO₂ (G_s) and intercellular CO₂ concentration (C_i) were determined at an ambient CO₂ concentration of 360 μmol mol⁻¹, temperature of 25/28 °C, 50 ± 5% relative humidity and a photon flux density of 1000 μmol m⁻² s⁻¹. The values for A, G_s and C_i were calculated using standard formulas from Von Caemmerer and Farquhar.³⁴ The photosynthetic area was calculated after painting the surface of each leaf over graph paper.

Statistical Analysis. Statistical analysis was carried out using Statistica v. 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Data was analyzed using one- and two-way analysis of variance (ANOVA; F-test). Significant test results were followed by Tukey test for identification of important contrasts.

RESULTS

Sorption Studies. Terbuthylazine and glyphosate sorption isotherms are shown in Figure 1, and sorption coefficients for each herbicide on original soil (S) and soils amended with OW at 5% and 10% (w/w) (S + 5% and S + 10%) are given in Table 2. Glyphosate adsorbs on soil to a much higher extent than terbuthylazine, the K_f values of which were increased by a factor of 1.43 and 7.96, when soils were amended with 5% and 10% OW,

8

dx.doi.org/10.1021/jf000875a | J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 000-000

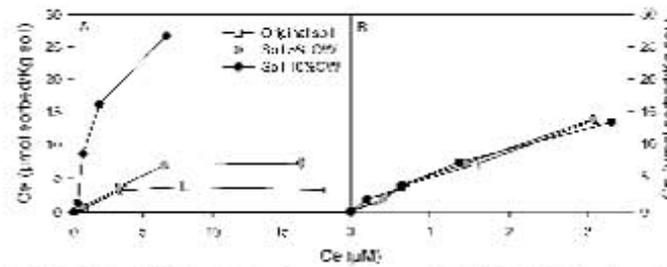


Figure 1. Terbutylazine (A) and glyphosate (B) adsorption isotherms in soil unamended (white, A and B) and amended at 5% (gray, A and B) and 10% with OW (black, A and B).

Table 2. Terbutylazine and Glyphosate Sorption Coefficients of Unamended (S) and Amended Soils at 5% Rate (S + 5% OW) and 10% Rate (S + 10% OW)

| herbicide | soils | K_d ($\text{mg}^{-1}/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) | $1/n$ | R^2 |
|---------------|------------|---|--------------------------|-------|
| terbutylazine | S | 0.964 (1.490 – 0.622) ^a | 0.57 ± 0.23 ^b | 0.85 |
| | S + 5% OW | 1.386 (1.761 – 1.009) | 0.69 ± 0.13 | 0.93 |
| | S + 10% OW | 7.680 (9.680 – 5.344) | 0.86 ± 0.25 | 0.89 |
| glyphosate | S | 5.130 (5.496 – 4.798) | 0.83 ± 0.09 | 0.99 |
| | S + 5% OW | 5.440 (5.640 – 5.288) | 0.81 ± 0.04 | 0.99 |
| | S + 10% OW | 5.411 (5.633 – 5.190) | 0.78 ± 0.05 | 0.99 |

^a Numbers in parentheses are standard errors (SE) about the mean K_d .
^b Numbers are mean $1/n \pm SE$.

respectively. No significant increase in sorption upon amendment was found in the case of glyphosate.

Chlorophyll Fluorescence. Maximum quantum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m), quantum efficiency of PSII (Φ_{PSII}) and nonphotochemical quenching (NPQ) for plants from control, OW, T, G, T + OW and G + OW pots 24 h, 15 days and 60 days after herbicide application are shown in Figure 2. No differences between treatments were observed for F_v/F_m values at midday 24 h or 15 days after herbicide treatment, but 60 days after treatment with terbutylazine plants recorded the lowest F_v/F_m values at midday (0.60 respect 0.80 for the control; ANOVA, $P < 0.0001$; Figure 2A–C). This trend persisted at dawn, as Figure 3 shows (ANOVA, $P < 0.0001$). Data corresponding of F_v/F_m at dawn after 24 and 15 days of treatment are not shown since no significant differences were observed (ANOVA, $P > 0.05$). Pots treated with terbutylazine and glyphosate showed lower Φ_{PSII} values 15 days after herbicide treatment (Figure 2E), although significant differences were not recorded (ANOVA, $P > 0.05$). Nonetheless, Φ_{PSII} for T-treated pots was significantly lower than for the control after 60 days (ANOVA, $P > 0.01$; Figure 2F). A similar trend was recorded for NPQ (Figure 2G–I). Chronic and dynamic damage for the different treatments is shown in Figure 4. T-treated pots showed the highest chronic photoinhibition, but, when terbutylazine was amended with OW (T + OW), chronic damage was markedly lower. In contrast, G and G + OW treatments showed chronic photoinhibition similar to that of the control.

Gas Exchange. Plants from T-treated pots recorded lower values of net photosynthetic rate (A) than the control 15 days after herbicide treatment (ANOVA, $P < 0.05$); and the lowest values after 60 days (ANOVA, $P < 0.0001$) (Figure 5B,C). These

differences were not observed when OW was added. Although stomatal conductance (G_s) of plants from T-treated pots was significantly lower than that of the control 15 days after herbicide treatment, it became similar to that of the control at the end of the experiment. The addition of OW increased G_s values in both cases (Figure 5B,C). Addition of terbutylazine reduced intercellular CO_2 concentration (C_i) after 15 days, while no significant differences were found in the case of T + OW. After 60 days, an increase was observed in both treatments (Figure 5H,J).

For G-treated pots no significant differences were found for A, G_s and C_i values during the experiment, but in G+OW-treated pots a decrease in both G_s and C_i values after 15 days was found, effect which disappeared at the end of the study.

DISCUSSION

The lower values of F_v/F_m for terbutylazine treated plants at midday after 60 days of experiment (Figure 2C) are due to photoinhibition of olive plants at high light flux, which gives rise to a lower proportion of open reaction centers,³⁰ as observed in other studies with herbicides.⁸ This photoinhibition is caused by damage in photosynthetic components, as of chlorophyll molecules of photosystem II, and this effect can be short-term and reversible (dynamic photoinhibition) or long-term and irreversible, persisting at a dawn measurement (chronic photoinhibition).^{19,33} As no recovery was found at dawn in the case of pots treated with terbutylazine (Figure 3), we can conclude that these plants expressed a chronic photoinhibition at long-term (Figure 4), which can be explained by the mode of action of terbutylazine, which inhibits the flux of electrons in PSII in plants.¹⁸ It could be expected that T + OW treatment also demonstrated a negative effect due to the addition of the herbicide, but no lower values in this parameter were found. The addition of OW to soil greatly increases terbutylazine sorption (Table 2; Figure 1A), which has been shown to be influenced by an increase in organic matter.^{24,35–37} This increase in sorption makes terbutylazine less available to be absorbed by plants, reducing or avoiding the phytotoxic effect of the herbicide. Similar results were found by Redondo-Gómez et al.^{15,16} in studies with olive plants and other triazine herbicides. These results suggest that, although terbutylazine addition to soils could affect negatively photochemistry of olive plant, this effect could be reduced by the use of OW as alperujo in soils. The addition of this waste to the soil does not affect herbicide biological activity³⁸ and improves soil physicochemical properties.³⁰ Furthermore, it is easily accessible since it is generated close to olive crops.

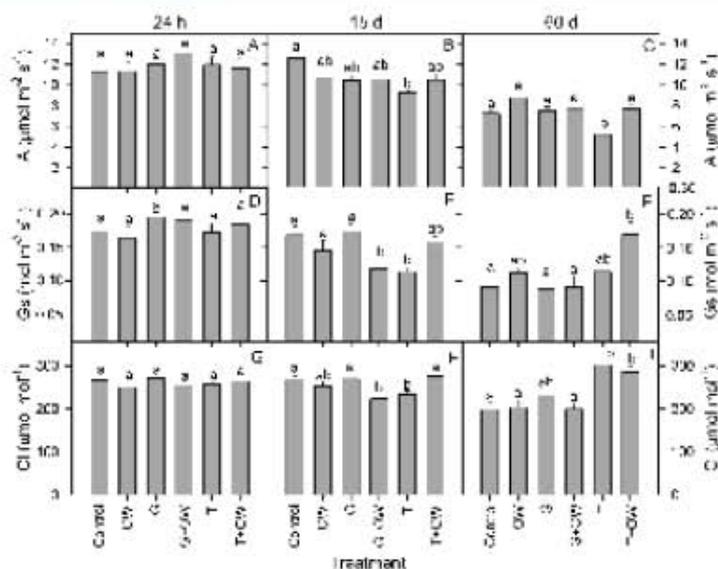


Figure 5. Net photosynthetic rate, A (A–C), stomatal conductance, G_s (D–F), and intercellular CO_2 concentration, C_i (G–I) in *Olea europaea* treated with solid olive-mill organic waste (OW), glyphosate (G), and both of them (G + OW), terbuthylazine (T) and T + OW after 24 h (A, D, G); 15 days (B, E, H); and 60 days (C, F, I). Values represent mean \pm SE, $n = 9$. Different letters indicate means that are significantly different from each other (Tukey test, $P < 0.05$).

decrease.¹⁰ This was not observed in this study for terbuthylazine treated plants 60 days after treatment. This could be a consequence of the chronic damage that plants from this treatment suffered. These results do not agree with previous work with olive plants,^{15,16} while they do agree with the low NPQ values found by Macinnis-Ng and Ralph,⁷ in studies with diuron on the seagrass *Zostera capricorni*.

Young olive trees showed an early expression of phytotoxic effect 15 days after terbuthylazine treatment, which became statistically significant 60 days after treatment. A significant reduction in values of Φ_{PSII} after 60 days of treatment with terbuthylazine was observed in T pots when compared to plants from the control pots (Figure 2E,F). Redondo-Gómez et al.¹⁶ found that F_v/F_m and Φ_{PSII} were affected after one week of treatment of young olive plants with diuron and simazine, while in a similar study with adult trees, this effect was not observed until 2 months after herbicide application (Redondo-Gómez et al.),¹⁵ as occurred in our study. The addition of OW to terbuthylazine treated plants counterbalanced the reduction of F_v/F_m and Φ_{PSII} parameters since, as described above, this OW makes terbuthylazine less available to be absorbed by plants.

In relation to gas exchange parameters, there was a very clear effect in olives treated with terbuthylazine but not in plants treated with glyphosate. The decline of net photosynthetic rate (A) may be attributed to stomatal and/or non-stomatal limitations.⁴¹ If this reduction is produced by non-stomatal limitations, biochemical changes causing inhibition of chlorophyll synthesis would be observed. This cannot be proved in our study since no pigment studies were performed. In the case of stomatal limitations of A by G_s ,

reduction, a decrease in intercellular concentration of CO_2 would be observed, which occurred 15 days after terbuthylazine treatment, but not at the end of the 60 day experiment. Our hypothesis is that stomatal limitations occur shortly after herbicide treatment affecting the synthesis of chlorophyll molecules after longer exposure.⁴² Values for photosynthesis rate confirmed that the addition of OW reduces the negative effect generated by terbuthylazine exposure, due to the increase of sorption, since no significant decrease was found after 60 days in T + OW pots.

The use of safe and effective pesticides for crops, without developing indirect effects, is crucial for agronomists and farmers. In this study, we show that soil application of terbuthylazine is a source of indirect phytotoxicity for olive plants, reducing its photosynthetic efficiency, which was counterbalanced by the addition of OW to soils, increasing greatly the sorption of the herbicide to the soil particles and becoming less available to interact and be absorbed by the plant. Results obtained can be useful in preparing management strategies concerning herbicide use in olive crops.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34-954624711. Fax: +34-954624002. E-mail: lcox@irnase.csic.es.

Funding Sources

This work has been partially financed by the Project AGL 2007-65771 from the Ministry of Science and Innovation of Spain (MINCIN) and Research Group AGR 264 of Junta de Andalucía. A.L.C. acknowledges her FPI fellowship from MINCIN.

■ ABBREVIATIONS USED

A , net photosynthetic rate; C_{eq} , equilibrium concentration; C_0 , initial concentration; C_{CO_2} , intercellular CO_2 concentration; C_s , amount sorbed; F_{50} , minimal fluorescence level in the dark-adapted state; F_m , maximal fluorescence level in the dark-adapted state; F_v/F_m , maximum quantum efficiency of PSII photochemistry; Φ_{PSII} , quantum efficiency of PSII; G_s , stomatal conductance; K_d , sorption coefficient; NPQ, nonphotochemical quenching

■ REFERENCES

- Dalton, R.; Boutin, C. Comparison of the effects of glyphosate and atrazine herbicides on nontarget plants grown singly and in microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010, 29, 2304–2315.
- Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-González, E.; Fernández-Laespada, M. E.; Calvo-Serono, L.; Sánchez-San Román, F. J. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res.* 2003, 37, 928–938.
- Cornejo, J.; Hermosín, M. C.; Cebal, R.; Cox, I. Methods to determine sorption of Pesticides and Other Organic Compounds. In *Soil-Water-Solute process characterization. An integrated approach*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2005; pp 435–463.
- Arias-Estévez, M.; López-Periago, E.; Martínez-Carballa, E.; Simal-Gandara, J.; Mejuto, J. C.; García-Río, L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2008, 123, 247–260.
- Hildebrandt, A.; Guillamón, M.; Lacorte, S.; Tauler, R.; Barceló, D. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res.* 2008, 42, 3315–3326.
- Saladi, G.; Clement, C. Physiological side effects of pesticides on non-target plants. In: *James V. Livingston. Agriculture and soil Pollution: New research*; NOVA Science Publishers Inc.: Hanppange, NY, 2005; pp 53–86.
- Macinnis-Ng, C. M. O.; Ralph, P. J. Short-term response and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure. *Aquat. Bot.* 2003, 76, 1–15.
- Bigot, A.; Fontaine, F.; Clément, C.; Vaillat-gaveau, N. Effect of the herbicide fluroxypyr on photosynthetic performance of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Chemosphere* 2007, 67, 1243–1251.
- Williams, S. L.; Carama, A.; Kurudiman, J.; Datta, S.; Krivla, K. M. Effects of the herbicide diuron on Cordgrass (*Spartina foliosa*) reflectance and photosynthetic parameters. *Estuaries Coast.* 2009, 32, 146–157.
- Maxwell, K.; Johnson, G. L. Review. Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *J. Exp. Bot.* 2000, 51 (345), 659–668.
- Negri, A.; Völhard, C.; Humphrey, H.; Heyward, A.; Jones, R.; Eaglesham, G.; Fabricius, K. Effects of the herbicide diuron on the early life history stages of coral. *Mar. Pollut. Bull.* 2005, 51, 370–383.
- Brack, W.; Frank, H. Chlorophyll a fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Environ. Saf.* 1998, 40, 34–41.
- Haynes, D.; Ralph, P.; Prange, J.; Dennison, B. The impact of the herbicide diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. *Mar. Pollut. Bull.* 2000, 41, 288–293.
- Sayed, O. H. Review: Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* 2003, 41, 321–330.
- Redondo-Gómez, S.; Cox, I.; Cornejo, J.; Figueroa, E. Combined effect of diuron and simazine on photosystem II photochemistry in a sandy soil and soil amended with solid olive-mill waste. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 2007, 42, 249–254.
- Redondo-Gómez, S.; Mateos-Naranjo, E.; Cox, I.; Cornejo, J.; Figueroa, E. Effect of herbicide and soil amendment on growth and photosynthetic responses in olive crops. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 2007, 42, 523–528.
- Goussias, C.; Boussac, A.; Rufesford, A. W. Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: an overview. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* 2002, 357, 1369–1381.
- Liñán, C. *Vademecum of phytosummary and nutritional products*; Liñán, C., Ed.; Agrotécnicas SL: Madrid, Spain, 2009.
- Franz, J. E.; Mao, M. K.; Sikoriki, J. A. *Glyphosate: an unique global herbicide*; ACS Monograph 189; American Chemical Society: Washington, DC, 1997.
- Coupland, D.; Lutman, P. J. W. Investigations into movement of glyphosate from treated to adjacent untreated plants. *Ann. Appl. Biol.* 1982, 101, 315–321.
- Rodríguez, J. J. V.; Worsham, A. D.; Corbin, F. C. Exudation of glyphosate from wheat (*Triticum aestivum*) plants and its effects on interplanted corn (*Zea mays*) and soybeans (*Glycine max*). *Weed Sci.* 1982, 30, 316–320.
- Alister, C.; Kogan, M.; Pino, I. Differential phytotoxicity of glyphosate in maize seedling following applications to roots or shoot. *Weed Res.* 2005, 45, 27–32.
- Laitinen, P.; Ramo, S.; Simes, K. Glyphosate translocation from plants to soil—does this constitute a significant proportion of residues in soil? *Plant Soil* 2007, 300, 51–60.
- Vereecken, H. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Manage. Sci.* 2005, 61, 1139–115.
- Borggaard, O. K.; Gimsing, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manage. Sci.* 2008, 64, 441–456.
- Cabrera, A.; Cox, I.; Velasco, P.; Koskinen, W. C.; Cornejo, J. Fate of diuron and terbutylazine in soils amended with two-phase olive oil mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4828–4834.
- Dolapoglou, C.; Karpozdas, D. G.; Menkissoglou-Spiratodi, U.; Eleftherohorinos, I.; Voudrias, E. A. Influence of different organic amendments on the degradation, metabolism and adsorption of terbutylazine. *J. Environ. Qual.* 2008, 36, 1793–1802.
- Tomlin, C. D. S. *The e-Pesticide Manual. A World Compendium*, Version 4.0, 14th ed.; BPCG: Surrey, U.K., 2006–2007.
- Nelson, D. W.; Sommers, L. E. *Methods of Soil Analysis Part 2*; American Society of Agronomy: Madison, WI, 1982.
- Albuquerque, J. A.; González, J.; Tortosa, G.; Cegarra, J. Evaluation of “alperujo” composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation* 2009, 20, 257–270.
- Lucena-Rodríguez, P.; Hernández, D.; Hernández-Apaolaza, L.; Lucena, J. J. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 1085–1092.
- Redondo-Gómez, S.; Mateos-Naranjo, E.; Cambalillo, J.; Luque, T.; Figueroa, M. E.; Davy, A. J. Carry-over of differential salt tolerance in plants grown from dimorphic seeds of *Suaeda splendens*. *Ann. Bot.* 2008, 102, 103–112.
- Wemex, C.; Correia, O.; Beyschlag, W. Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Funct. Plant Biol.* 2002, 29, 999–1011.
- Von Caemmerer, S.; Farquhar, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 1981, 153, 377–387.
- Celis, R.; Barriso, E.; Hooft, S. Effect of liquid sewage sludge addition on atrazine sorption and desorption by soil. *Chemosphere* 1998, 37, 1091–1107.
- Cabrera, A.; Cox, I.; Fernández-Hernández, A.; García-Otín Civantos, C.; Cornejo, J. Field appraisalment of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2009, 132, 260–266.
- Krawariz, K.; Tsiropoulos, N. G.; Karpozdas, D. G. Degradation and adsorption of terbutylazine and chlorpyrifos in biobed biomixtures from composted cotton crop residues. *Pest Manage. Sci.* 2010, 66, 1122–1128.
- Cañero, A. I.; Cox, I.; Hermosín, M. C.; Cornejo, J. Effect of soil amendment with an organic residue on *s*-metolachlor fate. 14th Ramiran International Conference, Lisboa, Portugal, 2010, C7-0086.
- Laitinen, P.; Ramo, S.; Nilsunen, U.; Jauhainen, L.; Simes, K.; Turtola, E. Glyphosate and phosphorus leaching and residues in boreal sandy soil. *Plant Soil* 2009, 323, 267–283.

(40) Li, J.; Smeda, R. J.; Sellers, B. A.; Johnson, W. G. Influence of formulation and glyphosate salt on absorption and translocation in three annual weeds. *Weed Sci.* 2005, 53, 153-159.

(41) Flexas, J.; Medrano, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann. Bot.* 2002, 89, 183-189.



Transformation of organic wastes in soil: Effect on bentazone behaviour

Ana I. Cañero ^a, David Becerra ^b, Juan Cornejo ^a, María C. Hermosín ^a, Ángel Albarrán ^b, Antonio López-Piñero ^c, Lucía Cox ^{a,*}

^a Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla IRNAS, CSIC, Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Spain

^b Área de Producción Vegetal, Escuela de Ingenieros Agrarios, Universidad de Extremadura, Ctra. de Cáceres, 06071 Badajoz, Spain

^c Área de Edafología y Química Agrícola, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Avda de Elvas s/n 06071 Badajoz, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 May 2012

Received in revised form 19 June 2012

Accepted 19 June 2012

Available online xxx

Keywords:

Bentazone
Olive oil residue
DOC
Sorption
Leaching
Dispersion

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the impact of two organic wastes from olive oil production on the fate of bentazone in soil, and to assess the influence of the transformation of organic matter from these wastes under field conditions. Results on freshly laboratory-amended soils were compared to those with soils amended in the field for nine consecutive years. Two amendments and two doses were studied. Sorption of bentazone increased upon amendment with K_d values from 0.03 to 1.7. The increase was higher for freshly amended soils than for the field amended soils and for the higher dose. Degradation was correlated with sorption in the case of field amended soils, whereas higher persistence in freshly amended soils may be related to the easier microbial availability of DOC molecules than bentazone molecules. The increase in non-conducting pores in amended soils favours sorption and degradation processes reducing leaching. Important differences revealed in herbicide fate between freshly amended soils and aged field amended soils limit further extrapolation of laboratory studies to field studies.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Olive oil extraction, formerly confined to the Mediterranean area, is now gaining an ever increasing economic and social relevance worldwide. Technical improvements in oil extraction systems have favoured an increase not only in oil production but also in the concomitant waste (Rodríguez-Lucena et al., 2010). The most commonly used procedure in olive-oil extraction is a continuous centrifuge two-phase process that generates a liquid phase (olive oil) and organic slurry (two-phase olive mill waste, OW). After drying, the OW is generally subjected to a subsequent extraction with hexane to recover the remaining oil still present, leading to the formation of a solid residue – de-oiled two-phase olive mill waste (DW). The amount produced of both wastes in Spain is greater than 4,000,000 Mg per year and their disposal is a cause of serious technical, financial, and environmental concerns. Because OW and DW contain a major proportion of organic matter, and lack heavy metals and pathogenic organisms, recycling as soil amendment, either raw or composted, may represent a valuable alternative to their disposal (López-Piñero et

al., 2008a, 2008b). Indeed, several studies have found that the application of OW or DW as organic amendments leads to beneficial effects in restoring soils and crop yields, potentially lowering the need for inputs of N, P, and K fertilizer (Brunetti et al., 2005; Burgos et al., 2006; López-Piñero et al., 2006, 2008a, 2008b).

One positive side effect of organic amendments is that they can also favour pesticide sorption. The impact on pesticide sorption, transport, and distribution in soil depends on the type of organic material, its dosage, and its effect on microbial activity, as well as on the pesticide's molecular configuration, polarity, and size (Si et al., 2006; Barriuso et al., 2011). Moreover, the evolution and transformation of the organic matter in amended soils due to environmental conditions may play a major role in determining the soil's characteristics after a period of ageing, modifying further interactions with any pesticides present (Cox et al., 2004; Barriuso et al., 2011). Although Mediterranean agricultural soils would appear to be well-suited to OW and DW applications (López-Piñero et al., 2006, 2008a, 2008b), few studies have investigated its effect on pesticide behaviour (Andreu and Picó, 2004; Albarrán et al., 2004; Cabrera et al., 2008, 2010), and even fewer have been carried out with the wastes aged under field conditions (Cabrera et al., 2009).

Bentazone (3-isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one 2,2-dioxide) is one of the most widely used herbicides in farming worldwide for controlling sedges and broad-leaf weeds in corn fields, rice paddies, and other intensive crops (Li et al., 2003). Due to its very low sorption by soil and relatively high mobility, it is frequently detected in ground and surface waters at concentrations above the European threshold for

Abbreviations: OW, organic two-phase olive mill waste; DW, de-oiled two-phase olive mill waste; C_0 , Amount sorbed of herbicide; C_i , initial concentration of herbicide; C_e , equilibrium; K_d , partition coefficient of herbicide; K_f , sorption coefficient; n_f , Freundlich coefficient and linearity parameter; DOC, dissolved organic carbon; TOC, total organic carbon; CHA, carbon humic acids; CFA, carbon fulvic acid; EC, electrical conductivity; PG, polymerization grade; CEC, cation exchange capacity.

* Corresponding author. Tel.: +34 954624711; fax: +34 954624002.

E-mail address: lc Cox@irnas.csic.es (L. Cox).

drinking water. Loos et al. (2010) found that bentazone was one of the most important contaminants in terms of frequency of detection and maximum concentrations in groundwaters from 23 European countries.

The aim of the present study was to evaluate the impact of OW and DW amendments on the sorption, degradation, and leaching of bentazone applied to a Luvisol – a soil type that is widely distributed in Mediterranean regions and frequently dedicated to intensive cropping. In order to study the influence of the transformation of OW and DW organic matter under field conditions on bentazone's behaviour, measurements made on unamended and fresh laboratory-amended soils were compared with those with these wastes transformed in the soil after nine consecutive yearly applications in the field and sampled twenty months after last application.

2. Materials and methods

2.1. Organic amendments and soils

Two organic amendments (OW and DW) were used in this study. The OW was obtained from Olidal, a two-phase continuous olive oil industry located in Portalegre (Portugal), with centrifugal separation in two stages: oil and solid waste (olive mill wastewater was not produced since water was not required in the centrifugal process). The DW was obtained from the UCASUL oil industry located in Beja (Portugal) which employs chemical (hexane) to obtain a second-extraction olive-oil. Once this operation was carried out, the oil from the mixture with hexane was separated through distillation.

The soil samples used in the present study were collected (0–30 cm depth) from a long-term field experiment that was established in 1999 at the experimental farm of the INIAP (National Institute of Agrarian and Fisheries Research) in Elvas, Portugal (38°53' N; 7°9' W; 290 m above sea level) (López-Piñero et al., 2008a). The soil is classified as Cutanic Luvisol (ISSS-ISRIC-FAO, 1994). The climate is semi-arid Mediterranean with an average annual rainfall of 500 mm occurring mostly in autumn and spring, and a mean annual temperature of 16.7 °C. This soil had yearly received addition of OW and DW for nine years at the rates of 30 and 60 Mg OW ha⁻¹ (equivalent to 0.62 and 1.24X, respectively) and 27 and 54 Mg DW ha⁻¹ (equivalent to 0.56 and 1.12X, respectively), both wastes as dry weight equivalents. To evaluate the transformation effect of OW and DW organic matter under field conditions on bentazone's behaviour, unamended and amended soil samples were collected 20 months after the last OW (OW30 and OW60) and DW (DW27 and DW54) treatment. The collected soil samples were air dried, and the fraction that passed through a 2-mm sieve was stored at 4 °C until used. Unamended soil was also amended in the laboratory with fresh OW (OW5 and OW10) and DW (DW5 and DW10) at 5 and 10% (w/w) doses, sieved and treated as the soils amended in the field. The total amount of the wastes received in the field-amended soils is similar to those received in the laboratory-amended soils.

2.2. Herbicide

In order to avoid interferences with adjuvants or other compounds in the commercial bentazone, the technical compound (purity 98%) obtained from BASF (Limburgerhof, Germany), was used for adsorption, dissipation, mineralisation and leaching studies. Its water solubility was 570 mg L⁻¹, and pKa = 3.2 (Romero et al., 1996; Boivin et al., 2004). Mineralisation studies were performed using both ¹⁴C-bentazone and ¹⁴C-bentazone (specific activity 6.8 MBq mg⁻¹) purchased from IZOTOP Budapest, Hungary.

2.3. Analysis of soils, OW, and DW

Soil texture (20% clay, 20% silt, and 60% sand) was determined by sedimentation using the pipette method. Total organic carbon content (TOC) was determined by dichromate oxidation (Nelson and

Sommers, 1996). Dissolved organic carbon (DOC) was extracted with de-ionised water at 3:1 (water/soil) and 100:1 (water/OW and water/DW) ratios and extracts measured with a Shimadzu TOC-V sch. Humic (CHA) and fulvic acids (CFA) were extracted by a solution of 0.1 M Na₄P₂O₇ + 0.1 M NaOH using a ratio of 10:1 (extractant/sample). To precipitate humic acid the supernatant was acidified to pH 2 with 1 M H₂SO₄. The DOC and the TOC associated with each fraction of CHA and CFA were determined by dichromate oxidation and measurement of the absorbance at 590 nm (Sims and Haby, 1971). The polymerization grade (PG) was calculated as the relation between CHA/CFA. Electrical conductivity (EC) was measured in a saturation extract for soil (US Salinity Laboratory Staff, 1954) and 1:10 (w/v) DW or OW water mixtures and the pH in 1:1 (w/v) soil/water and 1:5 (w/v) DW or OW water mixtures using a combination electrode. Lignine content was determined using the acid and neutral fibre detergent method (Goering and Van Soest, 1970). Physicochemical properties of the wastes are given in Table 1, and of the unamended soil (US), soils amended in the field (OW30, OW60, DW27 and DW54) and soils amended in the laboratory (OW5, OW10, DW5 and DW10) in Table 2.

2.4. Porosity measurement

Following the leaching experiment, duplicate undisturbed soil cores (1 g) were sampled from the bottom 5-cm soil ring of the columns, dried at 80 °C for 24 h, and pore size distribution (from 1 × 10⁵ to 1 nm) was determined by mercury intrusion porosimetry using a Quantachrome Poremaster 33GT mercury intrusion porosimeter. A value for the surface tension of mercury of $\gamma = 0.48 \text{ N m}^{-2}$ and a mercury solid contact angle of $\theta = 140^\circ$ were assumed to calculate the pore size distributions using the Washburn equation (Washburn, 1921). This porosity does not correspond to the real in undisturbed field but it corresponds to the soil matrix used to study the soil processes in lab experiments that follow.

2.5. Adsorption studies

Sorption isotherms were determined using a batch equilibration method. Triplicate soil samples (5 g) were equilibrated with 10 mL of initial bentazone solutions (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 and 1.5 mM in water) by shaking mechanically at 20 ± 2 °C for 24 h. Equilibrium concentrations in the supernatants were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) (conditions described below). The amount of bentazone sorbed (C_s) was calculated from the difference between the initial (C_i) and equilibrium (C_e) solution concentrations.

Sorption results were fitted to the Freundlich model, $C_s = KfC_e^{1/n}$, where C_s (mM kg⁻¹) is the amount of herbicide sorbed at the equilibrium concentration C_e (mM L⁻¹), and Kf (mM^{1-1/n} kg⁻¹ L^{1/n}) and n are Freundlich coefficient and linearity parameter, respectively. The Kd values (partition coefficient) were calculated at 1 mM initial bentazone concentration ($C_s = KdC_e$).

2.6. Dissipation and mineralisation studies

Duplicate Erlenmeyer flasks with 25 g of unamended (US) and amended (OW30, OW60, DW27, DW54, OW5, OW10, DW5 and DW10) soils were incubated throughout 42 days to assess dissipation and mineralisation processes of the herbicide bentazone. Distilled water was added to the soils to obtain moisture content equivalent to 40% of the water-holding capacity. Soils to be sampled at 0, 4, and 42 days of experiment were spiked with 2.2 kg ha⁻¹ of unlabelled bentazone, whereas biometric flasks containing soil to be sampled at 7, 14 and 28 days, were spiked with unlabelled bentazone (2.2 kg ha⁻¹) and ¹⁴C-bentazone at 9.25 Bq g⁻¹. One millilitre of NaOH 1N was placed in the arm of these flasks in order to trap ¹⁴CO₂ resulting from mineralisation of ¹⁴C-labelled bentazone. The

Table 1

Physicochemical properties of unamended (US) and amended soils in field with OW at 30 and 60 Mg DW ha⁻¹ (OW30 and OW60), at 27 and 54 Mg DW ha⁻¹ (DW27 and DW54), and soils amended in laboratory with OW and DW at 5K and 10K doses (w/w) (OW5, OW10, DW5 and DW10). Physicochemical properties of organic residues (OW and DW).

| | US | OW30 | OW60 | DW27 | DW54 | OW5 | OW10 | DW5 | DW10 | OW | DW |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| TOC (g kg ⁻¹) | 14.6 | 30.7 | 37.6 | 46.1 | 63.5 | 37.8 | 54.8 | 34.2 | 54.6 | 535 | 536 |
| DOC (g kg ⁻¹) | 0.127 | 0.542 | 0.712 | 0.760 | 1.508 | 3.288 | 5.248 | 5.536 | 8.419 | 43 | 74 |
| CHA (g kg ⁻¹) | 0.965 | 2.072 | 2.784 | 2.942 | 4.142 | 3.278 | 5.159 | 1.846 | 3.205 | 52 | 31 |
| CFA (g kg ⁻¹) | 1.137 | 1.937 | 2.005 | 1.774 | 2.291 | 2.588 | 4.404 | 3.680 | 8.425 | 35 | 62 |
| pH (H ₂ O) | 7.95 | 7.83 | 7.74 | 7.81 | 7.59 | 6.81 | 6.46 | 6.56 | 6.07 | 5.7 | 5.3 |
| EC (dS m ⁻¹) | 0.704 | 1.209 | 1.580 | 1.110 | 1.874 | 3.105 | 4.945 | 7.08 | 12.30 | 2.56 | 6.40 |
| PG | 0.849 | 1.069 | 1.389 | 1.658 | 1.808 | 1.264 | 1.172 | 0.501 | 0.38 | - | - |
| Total N (g kg ⁻¹) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 16 | 24 |
| Lignin (g kg ⁻¹) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 19.6 | 23.7 |
| hemicellulose (g kg ⁻¹) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 19.1 | 16.7 |
| cellulose (g kg ⁻¹) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 22.8 | 21.5 |

TOC: Total organic carbon, DOC: Dissolved organic carbon, CHA: carbon humic acids, CFA: carbon fulvic acids, PG: polymerization grade, EC: electrical conductivity.

soils were incubated at 25 ± 1 °C and moisture was kept constant during the experiment by adding distilled water as necessary. The 1 mL-NaOH solution was replaced weekly, mixed with 4 mL of Ready Safe Beckman Scintillation cocktail and kept in the dark overnight prior measurement in a BECKMAN LD 500 TD Scintillation counter (LSC). Spiked soils were combusted by using a Harvey OX-500 oxidizer. The ¹⁴C released was trapped in a carbon trapper Harvey's ¹⁴C cocktail and immediately analysed by LSC.

2.7. Column leaching tests

Leaching experiments were carried out using PVC soil columns (30 cm length × 5 cm i.d.). To minimize losses of soil during the experiment, the top 5 cm of the columns was filled with sea sand and the bottom 5 cm with sea sand plus glass wool. The remaining 20 cm was hand-packed with unamended or amended air-dried soil. The experiment was performed with triplicates of the field and laboratory amended soil samples. The soil columns were saturated with water, allowed to drain for 24 h, and then the amount of bentazone corresponding to an application rate of 2.2 kg ha⁻¹ dissolved in water was applied to the top of the columns. Each day the columns were leached with de-ionised water at a rate of 50 mL day⁻¹ until no herbicide was detected in the leachates (the total amount of water added was 900 mL). Leachates containing the herbicide were collected daily, filtered, and assayed by HPLC. At the end of the leaching experiment, the columns were sectioned into 5-cm deep portions. Soil samples

(5 g) from different depths were extracted once with 10 mL of 40:60 v/v acetonitrile/water (pH = 2.8 adjusted with H₃PO₄) by shaking mechanically at 20 ± 2 °C for 24 h. The suspensions were centrifuged, filtered, and assayed by HPLC (conditions described below) in order to determine the residual amount of bentazone at the different depths of the soil column.

2.8. Herbicide analysis

Bentazone was analysed by HPLC using a Waters 600E chromatograph coupled to a Waters 996 diode-array detector. The following conditions were used: Nova-Pack C18 column (150 mm length × 3.9 mm i.d.), 40:60 acetonitrile/water (pH = 2.0 adjusted with H₃PO₄) eluent mixture at a flow rate of 1 mL min⁻¹ under isocratic conditions, 25 µL injection volume, and UV detection at 213 nm.

2.9. Statistical analyses

All Statistical analyses were carried out using the SPSS package (11.5) for Windows. The data obtained were subjected to a one-way ANOVA. Pairwise multiple comparisons were performed using the Duncan test. Differences between results were considered statistically significant at a p < 0.05 level of probability.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical and surface properties of amended soils

Addition of OW and DW modified the original properties of the soil (Table 1). Total organic carbon (TOC) increased in both OW and DW amended soils. Although the contents of organic carbon of the wastes were similar (535 g kg⁻¹ for OW and 516 g kg⁻¹ for DW), differences between the two treatments were found in TOC of soils amended in the field: DW amended soils had higher TOC than OW amended soils, which can be attributed to larger accumulation of organic matter in DW amended soils due its higher stability. This waste had a higher content in lignin than OW (Table 1) which is known to limit degradation (Komilis and Ham, 2003; Albuquerque et al., 2004). The addition of OW and DW increased DOC and this increase was much higher in the case of freshly amended soils. This difference between field and laboratory amended soils could be explained by the loss of DOC in the field soils as a consequence of leaching and

Table 2

Bentazone sorption coefficients K_d and K_{oc} at the C_e = 1 mM, in unamended (US) and soils amended in the field (OW30 and OW60 and DW27 and DW54) and in the laboratory (OW5, OW10, DW5 and DW10).

| Soils | K _d ads | K _{oc} ads | R ² |
|-------|----------------------------------|----------------------------|----------------|
| US | 0.032 (0.011–0.057) ^a | 1.29 ± 0.187 ^{ab} | 0.922 |
| OW30 | 0.201 (0.128–0.314) | 1.05 ± 0.076 | 0.979 |
| OW60 | 0.265 (0.169–0.413) | 1.10 ± 0.076 | 0.977 |
| DW27 | 0.198 (0.128–0.315) | 1.09 ± 0.075 | 0.981 |
| DW54 | 0.249 (0.159–0.322) | 1.098 ± 0.080 | 0.994 |
| OW5 | 0.416 (0.287–0.603) | 1.00 ± 0.064 | 0.983 |
| OW10 | 0.782 (0.590–1.39) | 0.980 ± 0.039 | 0.993 |
| DW5 | 1.36 (0.588–0.925) | 0.964 ± 0.039 | 0.993 |
| DW10 | 1.70 (1.54–1.88) | 0.873 ± 0.017 | 0.998 |

^a Numbers in parenthesis are standard error about the mean.
^{ab} Standard errors about the mean.

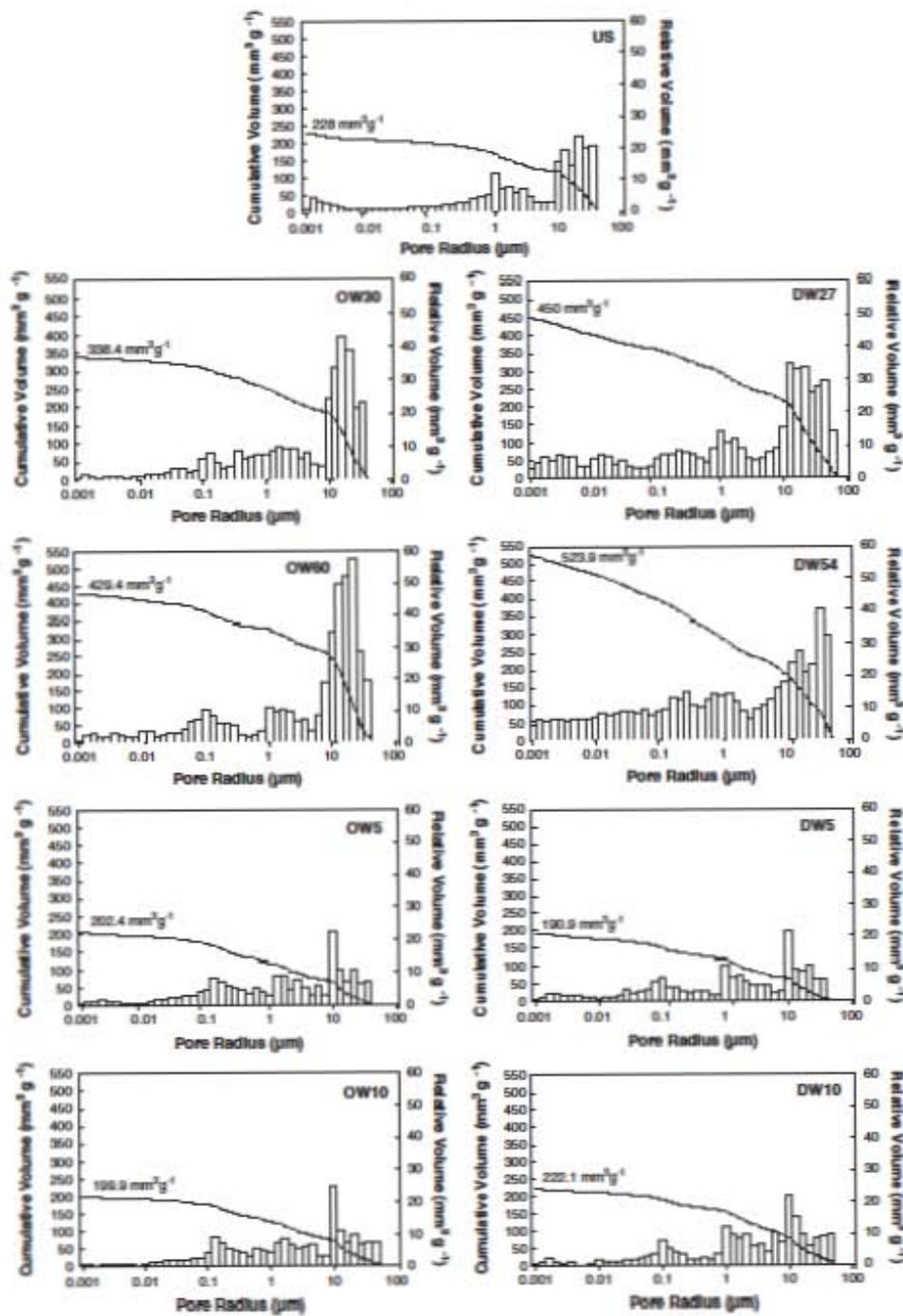


Fig. 1. Relative (histogram) and cumulative (curve) Hy pore volumes for US and various soils (OW30, OW90, DW27 and DW54, and in the laboratory (OW5, OW10, DW5 and DW10).

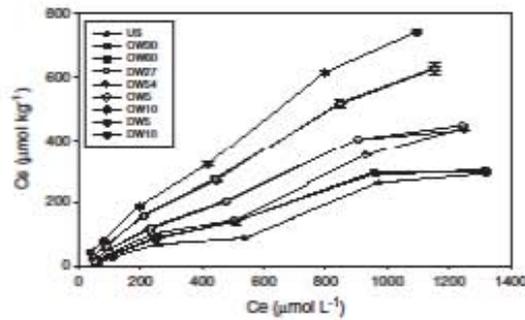


Fig. 2. Benzotriazole adsorption isotherms in US and soils amended in the field (OW5Q, OW8Q, DW27 and DW54), and in the laboratory (OW5, OW10, DW5 and DW10).

runoff processes, and also as a consequence of degradation processes, since DOC comprises the easiest available source of energy for soil microorganisms.

CHA and CFA also increased upon amendment. However, it was found that the amount of CHA was higher than or similar to that of CFA in all amended soils except in soils amended in the laboratory with DW (DW5 and DW10), of higher content in CFA than CHA (Table 1), which also have the largest content in DOC. This was not observed in aged amended soils (DW27 and DW54) and could be attributed to the higher degradability of FA when compared to HA (Qualls, 2005). Consequently, polymerization grade (PG) increases upon amendment in all soils except in DW5 and DW10.

The pH and electric conductivity (EC) of soils was also affected by amendment with OW and DW. Soils amended in the field had similar pH values than US, whereas lower pH was found in soils amended in the laboratory. The EC of amended soils was higher than that of US, and this increase was very large in the case of soils amended in the laboratory (Table 2). Differences in the effect of soil amendment with OW and DW, of acidic pH and high EC (Table 1), between field and freshly lab amended soils on these soil properties can be also attributed to losses of soluble compounds through transport processes in the 9-year period of transformation of the amendments in the field and to degradation processes.

Total cumulative soil pore volume (Fig. 1) increased upon amendment in field amended soils, and this increase was higher in DW amended soils. This increase in soil porosity was due to the increase in the higher pore size (10–100 μm), but also to the increase in smaller sized pores (<1 μm) Kavdir and Kili (2008) also found that olive oil solid waste application to soils at 8% rate also affected physical properties such as aggregate stability which increased after two months of incubation. On the contrary, similar or slightly reduced values were observed in the case of soils amended in the laboratory. In this case, the decrease in the highest size pores studied (10–100 μm) rendered lower total porosity. However, all amended soils experienced an increase in pores of <1 μm size. The higher content in DOC and the high EC of the laboratory amended soils (Table 1) could be the reason for this, since DOC and salts aggregate together soil particles blocking large sized pores (Tisdall and Oades, 1982). This fact has been previously observed and reported in a field study with soils irrigated for three consecutive years with olive oil mill waste water, which has a high content in DOC (Cox et al., 1997).

3.2 Sorption-desorption studies

Adsorption isotherms of benzotriazole in the studied soil were shown in Fig. 2, and sorption coefficients after fitting isotherms to Freundlich equation in Table 2. Benzotriazole is a weak acid (pK_a=3.2) and thus it

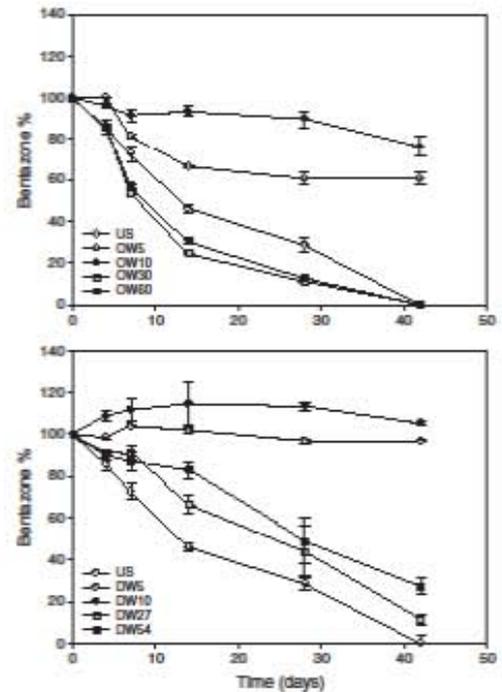


Fig. 3. Desorption curves for benzotriazole in US and soils amended with OW (top of the figure) and DW (bottom of the figure).

is weakly sorbed by the soil-OW-DW mixtures, showing Freundlich coefficient (*K_f*) values between 0.032 and 1.70 (Table 2). Some of the isotherms were non-linear, and in order to compare sorption capacity of the different soils, a distribution coefficient *K_d* was calculated at *C_e* = 1 mM, since *K_f* values were not comparable when isotherms present different slopes (n_f). The largest value was obtained for freshly amendment soil, *K_d* = 1.36 for OW and *K_d* = 1.70 for DW at the higher dose applied.

When unamended soil is not considered, there is a high negative relation between *n_f* and *K_d* (*r*² = 0.84), which suggests more specific interactions in the more sorptive systems (Calvet, 1989). Addition of both OW and DW increased benzotriazole sorption in soils when compared to US, and this increase was higher in the case of soils amended in the laboratory (OW5, OW10, DW5 and DW10). The higher levels of aliphatic components in fresh than in mature organic matter should contribute to this (Chefetz and Xing, 2009). However, no significant correlation was observed between *K_d* and TOC (*r*² = 0.38), which was in agreement with a 13-agricultural soil study from Boivin et al. (2005) and with Romero et al. (1996), which reported little or no effect of soil organic matter on sorption of this weakly acidic herbicide due to repulsion of negative charges between the chemical and soil organic matter. However, Li et al. (2003) found that the distribution coefficient of benzotriazole in five different soils was a function of soil organic matter content and Carrizosa et al. (2000) showed a large increase of benzotriazole sorption by smectite upon modification with organic cations (organoclays). The high content in illite of this soil does not suggest an important contribution of clay minerals to benzotriazole sorption. Our results showed a high positive correlation between *K_d* and DOC (*r*² = 0.96) and a high negative correlation between *K_d* and pH (*r*² = 0.89), both (DOC and pH) inversely correlated

($r^2 = 0.96$). The last agreed with previous studies on bentazone soil sorption (Li et al., 2003; Boivin et al., 2005) and indicated that sorption occurred through non-specific-hydrophobic interactions between the molecular form of bentazone and soil surface sites. The effect of DOC on soil herbicide sorption depends on the nature of the DOC, the nature of the chemical and the physicochemical properties of the soil (Cox et al., 2001, 2007). While in some cases sorption reactions of DOC on soil surfaces enhanced the sorption capacity of the soil for pesticide molecules (Said-Pullicino et al., 2004), in other cases soil sorption was reduced due to competition between DOC and herbicide molecules for sorption sites and/or to DOC-herbicide interactions in solution (Nelson et al., 1998; Celis et al., 1998; Cox et al., 2001, 2007). DOC from compost have been also shown to favour desorption processes when sorption is low (Barriuso et al., 2011).

3.3. Degradation studies

Dissipation of bentazone was monitored in US, in freshly amended soil with OW and DW and in soils amended in the field. Dissipation curves are shown in Fig. 3 and bentazone half-lives after fitting curves to first order kinetics in Table 3. In the case of laboratory-amended soils with DW, it was not possible to calculate half-lives because the data did not fit first order kinetics due to the absence of dissipation during the 42-day incubation period.

In the soils amended in the field with OW, bentazone half-life was similar to that of US. On the contrary, bentazone half-lives in DW amended soils increased by a factor of 2 (DW27) and by a factor of 3 (DW54). These results indicated a clear correlation between sorption and dissipation in field amended soils, since the limited bioavailability of the molecule protected herbicide from transformation (Piutti et al., 2002). Half-lives highly increased in soils amended in the lab, especially in the case of OW10 amended soils. In this case, the high increase in half-life could not be attributed to the increase in sorption, which was not larger than two-fold and suggest a major role of DOC in limiting bentazone dissipation in soil. Although bentazone metabolites were not followed up in this study, it has been reported that the first step in microbial degradation of bentazone is hydroxylation at the 6- or 8-position of the phenyl ring, which are further metabolised rapidly (Krauber et al., 2000; Boivin et al., 2004).

The percentages of bentazone mineralised at the end of the incubation study with radiolabelled bentazone (Fig. 4 and Table 3) are in accordance with the results from the bentazone dissipation studies. The amount of bentazone mineralised was similar to that reported by Piutti et al. (2002) in the US soil and slightly lower in soils amended in the field with OW. In the rest of the amended soils, the amounts mineralised were very low. The high content in DOC of the soils amended in the lab (Table 1), responsible for the low pH of the soils, may have affected degradation negatively. A positive correlation between pH and bentazone persistence observed by Rodríguez-Cruz et al. (2008) suggested that the high persistence of bentazone in

Table 3
Bentazone half life ($T_{1/2}$) in unamended soil (US) and soils amended in the field (OW60 and OW90 and DW27 and DW54) and in the laboratory (OW5, OW10, DW5 and DW10). Percentage mineralized and combusted in mineralization study.

| Soils | $T_{1/2}$ (days) | R^2 | Mineralized (%) | Combusted (%) |
|-------|-------------------------------|-------|----------------------------|---------------|
| US | 6.97 (5.78–8.78) ^a | 0.854 | 15.5 ± 0.221 ^{ab} | 80.8 ± 0.308 |
| OW90 | 6.58 (6.02–7.38) | 0.945 | 11 ± 0.608 | 92.7 ± 0.801 |
| OW60 | 6.61 (5.9–7.40) | 0.956 | 11.1 ± 0.267 | 99.9 ± 1.02 |
| DW27 | 13.9 (12.2–16.4) | 0.919 | 5.79 ± 0.834 | 90.5 ± 1.63 |
| DW54 | 22.7 (20.6–25.3) | 0.961 | 2.09 ± 0.417 | 105 ± 0.461 |
| OW5 | 54.1 (40.5–74.5) | 0.789 | 1.82 ± 0.228 | 66.4 ± 1.13 |
| OW10 | 127 (105–158) | 0.864 | 0.985 ± 0.469 | 54.8 ± 2.94 |
| DW5 | – | 0.386 | 0.513 ± 0.055 | 67.0 ± 0.95 |
| DW10 | – | 0.021 | 0.413 ± 0.235 | 80.2 ± 2.2 |

^a Numbers in parenthesis are standard error about the mean.
^{ab} Standard errors about the mean.

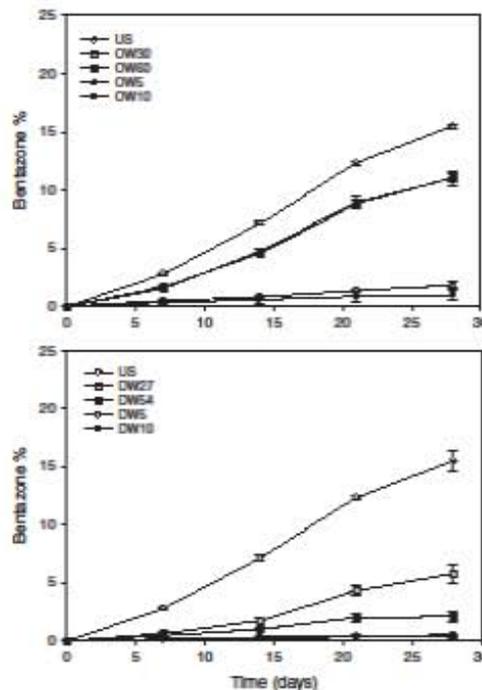


Fig. 4. Mineralization curves for bentazone in US and soils amended with OW (top of the figure) and DW (bottom of the figure).

these soils was due to soil microorganisms first using DOC from OW or DW as more readily available source of N as compared to the herbicide-derived N. This was previously observed with triazine herbicides in studies with triazine-degrading bacteria (Albarrán et al., 2003; Cabrera et al., 2008). Unlike bentazone, these herbicides were of basic character and have low water solubilities.

3.4. Leaching studies

Fig. 5 shows the breakthrough curves (BTCs) of bentazone in US and soils amended in the field and in the laboratory with OW and DW. The total bentazone leached, the percentage extracted from the hand packed columns, and the total recovered (leached + extracted) are presented in Table 4.

The position of the maximum of all the BTCs was close to one pore volume (Fig. 4), which was typical of low sorptive systems and highly mobile compounds (Beck et al., 1993), and shifts of BTC to the right of one pore volume are observed in the more sorptive systems (OW10, DW5 and DW10, Table 3). A tailing effect was observed in some amended soils which may be due to non-equilibrium sorption, which agreed with a study by Boivin et al. (2004) on the effect of time on bentazone sorption.

Both, soil pore system and sorption are responsible for the residence time of an herbicide in the soil during leaching, which, together with degradation processes, will determine the total herbicide leached. For all amended soils, the addition of both wastes reduced the amount of bentazone leached and the total amount recovered (leached + soil extract) (Table 4). Despite degradation results, the increase in sorption and the decrease in larger size pores (Fig. 1), could explain these results in the case of soils amended in the lab with OW

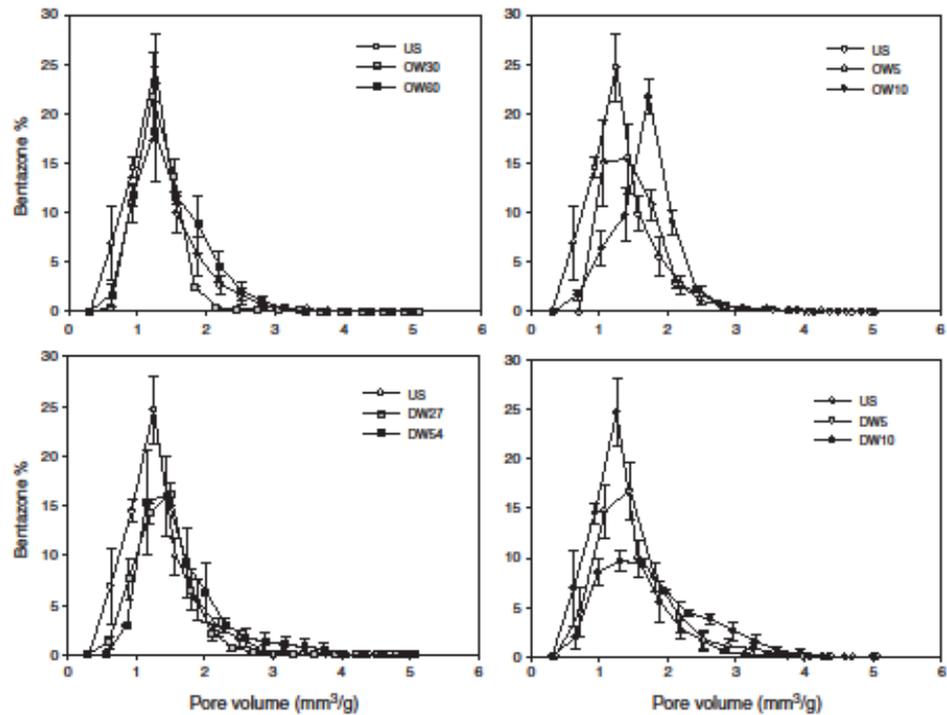


Fig. 5. Breakthrough curves for bentazone in unamended (US) and soils amended in the field and laboratory.

and DW, but not the results obtained for soils amended in the field, whose porosity increased in the larger range studied. However, as shown in this Figure, pore volume in the lower range studied (<1 μm) was also increased in these soils. This corresponds to micropores or non-conducting pores where slow diffusion processes of molecules predominate (Pignatello and Xing, 1996). Diffusion processes into stagnant pores enhance sorption, physical entrapment and hence allow time for degradation processes to take place, since these pores are accessible to bacteria (Pignatello and Xing, 1996), and this could be the reason for the low recoveries. These results obtained in leaching experiments showed the very different herbicide behaviour in laboratory static (batch and soil incubations) and dynamic (soil column) systems and should be considered when extrapolating results from the laboratory to the field. The transformation of

the exogenous OM added to soils revealed important differences mainly due to the DOC content and different porosity development.

Acknowledgements

The authors thank the financing support of Junta de Andalucía through the Grupo PAIDI AGR-264 and the Spanish MICINN project AGL2010-21421 both cofinanced by European Structural and Social Funds (FEDER-FSE PO2007-13). A.I. Cañero thanks the MEC/FECYT for a FPI fellowship. D. Becerra thanks the Junta de Extremadura for his FPI fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.066>.

References

Albarrán A, Celis R, Hermosín MC, López-Pfleiderer A, Ortega-Cabeo JJ, Cornejo J. Effect of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use Manage* 2003; 19:150–6.
 Albarrán A, Celis R, Hermosín MC, López-Pfleiderer A, Cornejo J. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere* 2004; 54:717–24.
 Albuquerque JA, González J, García D, Gargra J. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technol* 2004; 92: 195–200.
 Andreu V, Ríos Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trends Anal Chem* 2004; 23:772–80.

Table 4
 Percentage of bentazone leached, extracted and totally recovered from handpacked soil columns.

| Soils | Leached (%) | Extracted (%) | Total recovered (%) |
|-------|--------------------------|---------------|---------------------|
| US | 66.9 ± 2.39 ^a | 15.3 ± 1.89 | 82.2 |
| OW30 | 50.5 ± 5.56 | 6.25 ± 1.29 | 56.7 |
| OW60 | 60.1 ± 3.11 | 3.37 ± 0.070 | 63.5 |
| DW27 | 40.3 ± 4.45 | 4.04 ± 0.226 | 53.3 |
| DW54 | 58.4 ± 5.37 | 3.82 ± 1.21 | 62.2 |
| OW5 | 46.4 ± 2.28 | 14.2 ± 1.75 | 61.3 |
| OW10 | 52.2 ± 0.980 | 11.8 ± 1.57 | 64.0 |
| DW5 | 52.1 ± 1.67 | 6.28 ± 1.86 | 58.4 |
| DW10 | 53.6 ± 2.62 | 2.94 ± 0.494 | 56.5 |

^a Standard errors about the mean.

- Barriuso E, Andrade MS, Benic P, Hout S. Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from compost: experimental data and modeling approach. *Biogeochemistry* 2011;105:17–33.
- Beck AJ, Johnston AE, Jones KC. Movement of nontoxic organic chemical in agricultural soils. *Critical reviews. Environ Sci Technol* 1993;23:239–48.
- Bokvin A, Chemier R, Ferrin-Ganier C, Schiavon M. Time effect on bentazone sorption and degradation in soil. *Pest Manag Sci* 2004;60:809–14.
- Bokvin A, Chemier R, Schiavon M. Bentazone adsorption and desorption on agricultural soils. *Agron Sustainable Dev* 2005;25:309–15.
- Brauer G, Plaza C, Senesi N. Olive pomace amendment in Mediterranean conditions: effect on soil and humic acid properties and wheat (*Triticum turgidum* L.) yield. *J Agric Food Chem* 2005;53:6730–5.
- Bugan P, Madejón E, Cabrera F. Nitrogen mineralization and nitrate leaching of a sandy soil amended with different organic wastes. *Waste Manage Res* 2006;24:175–82.
- Cabrera A, Cox I, Kookkon WC, Sawowsky MJ. Availability of triazine herbicides in aged soils amended with olive oil mill waste. *J Agric Food Chem* 2008;56:4112–9.
- Cabrera A, Cox I, Fernández-Hernández A, García-Ore C, Ovares C, Cornejo J. Field appraisal of olive mill solid waste application in olive crops: effect on herbicide retention. *Agric Ecosyst Environ* 2009;132:360–6.
- Cabrera A, López-Piñero A, Albarido A, Peña D. Direct and residual effects on diuron behaviour and persistence following two-phase olive mill waste addition to soil: field and laboratory experiments. *Geoderma* 2010;157:133–41.
- Calver R. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ Health Perspect* 1989;83:145–77.
- Carrión M, Calderín MJ, Hermosín MC, Cornejo J. Organosolvents as sorbent and carrier for the herbicide bentazone. *Sci Total Environ* 2000;247:285–93.
- Celis R, Barriuso E, Hout S. Sorption and desorption of a triazine by sludge amended soils: dissolved organic matter effects. *J Environ Qual* 1998;27:1348–56.
- Chelutz B, Xing B. Relative role of aliphatic and aromatic moieties as sorption domains for organic compounds: a review. *Environ Sci Technol* 2009;43:1680–8.
- Cox I, Celis R, Hermosín MC, Becker A, Cornejo J. Positivity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agric Ecosyst Environ* 1997;65:151–61.
- Cox I, Cacchi A, Celis R, Hermosín MC, Kookkon WC, Cornejo J. Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils: dissolved organic matter effect. *Environ Sci Technol* 2001;35:1688–95.
- Cox I, Remantes MC, Zolnay A, Hermosín MC, Cornejo J. Changes in dissolved organic carbon of soil amendments with aging: effect on pesticide adsorption behavior. *J Agric Food Chem* 2004;52:5635–42.
- Cox I, Velasco P, Cabrera A, Hermosín MC, Cornejo J. Dissolved organic carbon interactions with sorption and leaching of diuron in organic-amended soils. *Eur J Soil Sci* 2007;58:714–21.
- Goeding HK, Van Soest PJ. Forage fiber analysis: apparatus, reagents, procedures, and some applications. *Agric. Handbook* 379. USDA-ARS. Washington, DC: U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE; 1970.
- Kawiriy Y, Kibi D. Influence of olive oil solid waste applications on soil pH, electrical conductivity, soil nitrogen transformations, carbon content and aggregate stability. *Bioresour Technol* 2008;99:2326–32.
- Knauber WR, Kozicki AJ, Schink B. Microbial metabolism and further fate of bentazone in soil. *Environ Sci Technol* 2000;34:598–603.
- Kumilo DP, Ham KK. The effect of lignin and sugar to the aerobic decomposition of solid wastes. *Waste Manag* 2003;23:419–23.
- Li KB, Liu WP, Xu DM, Lee S. Influence of organic matter and pH on bentazone sorption in soils. *J Agric Food Chem* 2003;51:5362–6.
- Loak R, Locoro G, Comero S, Cortisi S, Schwedig D, Werner F, et al. Pan-European Survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in groundwater. *Water Res* 2010;44:4115–26.
- López-Piñero A, Fernández J, Razo Nunes JM, García A. Response of soil and wheat crop to the application of two-phase olive mill waste in Mediterranean agricultural soils. *Soil Sci* 2006;171:728–36.
- López-Piñero A, Albarido A, Naves JMR, Barrio C. Short and medium-term effects of two-phase olive mill waste application on olive grove production and soil properties under semiarid Mediterranean conditions. *Bioresour Technol* 2008a;99:7983–7.
- López-Piñero A, Fernández J, Albarido A, Razo Nunes JM, Barrio C. Effects of de-oiled two-phase olive mill waste on Mediterranean soils and the wheat crop. *Soil Sci Soc Am J* 2008b;72:424–30.
- Nelson DW, Sommers LE. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Sparks DL, editor. *Methods of soil analysis*. Madison: Soil Science Society of America (SSA); 1996. p. 961–1010.
- Nelson SD, Lacey J, Farmer WJ, Williams CF, Res-Har M. Facilitated transport of napropamide by dissolved organic matter in sewage sludge-amended soil. *J Environ Qual* 1998;27:1194–200.
- Pignatelli B, Xing BS. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ Sci Technol* 1996;30(1):1–11.
- Piardi S, Marchand AL, Lagacherie B, Martin-Laurent F, Soulas G. Effect of cropping cycles and repeated herbicide applications on the degradation of dichloromethyl, bentazone, diuron, isoproturon and pendimethalin in soil. *Pest Manag Sci* 2002;58:303–12.
- Qualls RC. Biodegradability of fractions of dissolved organic carbon leached from decomposing leaf litter. *Environ Sci Technol* 2005;39:1616–22.
- Rodríguez-Cruz MS, Jones JF, Bending GD. Study of the spatial variation of the biodegradation rate of the herbicide bentazone with soil depth using contrasting incubation methods. *Chemosphere* 2008;73:1211–5.
- Rodríguez-Luoma P, Hernández D, Hernández-Apaolaza L, Luoma J. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer. *J Agric Food Chem* 2010;58:1085–92.
- Romero E, Sánchez-Ramón F, Peña A, de la Cillina C, Díez G. Bentazone leaching in Spanish soils. *Pest Sci* 1996;47:7–15.
- Seko-Pattinson D, Oghiliv G, Vella AJ. Environmental fate of uracilfluron in soils amended with municipal waste compost. *J Environ Qual* 2004;33:1743–51.
- Si Y, Zhang J, Wang SQ, Zhang LG, Zhou D. Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethametsulfuronmethyl in acidic soils in China. *Geoderma* 2006;130:66–7.
- Sims JR, Haly VA. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil Sci* 1971;112:137–41.
- SSS-IBRC-FAO. World reference base for soil resources. Wageningen, Rome: Draft; 1984.
- Tiedall JM, Oades JM. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J Soil Sci* 1982;33:141–63.
- United State Salinity Laboratory Staff. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. US Department of Agriculture, Handbook #60. Washington DC: LA, Richards (Ed.); 1954.
- Washburn EW. The dynamics of capillary flow. *Phys Rev* 1921;17:273–83.