



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
Profesor 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 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 oxidizador, 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 los conocimientos y las herramientas necesarias para comprender la ecología de la fotosíntesis de olivos.

A los Profesores Titulares Dr. Antonio López Piñeiro y Dr. Ángel Albarrán de la Universidad de Extremadura, por facilitarnos las muestras de suelo y alperujo y orujo que se estudiaron en el Capítulo III, por sus conocimientos y ayuda 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, Nikos, Luci, Tanya, Vicky, Greg, Dorothy, Ashley, Alessandra, Helena y Helen, que acudían al rescate si me veían perdida entre autoclaves.

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

A mis amigos, Cristina, Pili, Bea, Adri, José, Alberto, Víctor, porque siempre están ahí tras el paso de los años, cuando se les necesita.

A mis compañeros de laboratorio en el IRNAS, aunque algunos ya han tomado otros caminos, gracias a Carmen, Gracia, Bea, Miguel, Felipe, Nacho, Isabel Cardo, Manuel, Paqui y 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 buenos conmigo y por su ayuda esencial durante estos años. Sin ustedes no habría conseguido terminar ni con dos becas!

Mil gracias a mis padres, Paco y Graci, siempre apoyándose y sacrificándose para que realice mis sueños. Gracias a mis hermanas, Natalia y Laura, tan importantes en mi vida y en mis decisiones en cada momento. Os quiero.

Gracias a Juanjo, compañero y amigo desde un tiempo, por escucharme tantas veces en los buenos y los malos momentos y no dejarme rendirme en ningún momento.

Y con especial cariño, Gracias a mis abuelos, Enrique, Juana y Lola, que aún sin comprender bien dónde me metía, estuvieron en el comienzo de esta etapa de mi vida pero que no podrán verme completarla.

Mi agradecimiento 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.

RESUMEN

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha estudiado el efecto de la adición de dos 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 estudiado el efecto de la adición de dos residuos orgánicos de almazara sobre el comportamiento de los herbicidas MCPA y S-metolacoloro. Como consecuencia del distinto grado de humificación y compostaje, los residuos mostraron componentes orgánicos solubles de distinta naturaleza. La adición de estos residuos a los suelos no reveló un efecto negativo sobre la población microbiana de los suelos, ya que se incrementó el contenido en carbono orgánico soluble y la respiración de los mismos. Por otro lado, la adición de los residuos al suelo se tradujo en comportamientos diferentes en MCPA y S-metolacoloro: mientras en el caso de S-metolacoloro se produjo un aumento en la retención, y con ello menor lixiviación y degradación, no fue así para MCPA.

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

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

En lo que respecta al efecto de los residuos de almazara sobre la población microbiana del suelo, los resultados obtenidos indican que estos residuos no reducen la población microbiana presente en suelos. Estudios de tolerancia a altas dosis de

herbicidas, mostraron cepas tolerantes a MCPA y *S*-metolacoloro, sin embargo, estas cepas no lograron crecer en presencia de estos herbicidas como única fuente de carbono.

ABSTRACT

In this Doctoral Thesis we present an evaluation of the effect of addition of organic wastes from olive oil extraction to soils on herbicide fate, *Olea europaea* physiology, and microbiota of 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 assays under laboratory conditions with three soils from intensive crops. Due to the different degree of humification and composting state, the residues used showed different composition of dissolved organic components. The addition of these residues to soils did not negatively affect soil microbial population since dissolved organic matter and soil respiration increased. Different effects were found in 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 was found for S-metolachlor.

The effect 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 the soils systems.

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

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

ÍNDICE

Capítulo I	Introducción general.....	33
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.....	79
Capítulo 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, actividad deshidrogenasa.....	151
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.....	193
Capítulo V	Efecto de la adición de alperujo y herbicidas a suelos sobre comunidades microbianas autóctonas del mismo. Estudios independientes y dependientes de cultivo.....	221
Capítulo VI	Conclusiones Generales.....	261
Capítulo VII	Publicaciones.....	269

Capítulo I	I.- Introducción General.....	38
	I.1.-ANTECEDENTES.....	38
	I.2.-DINÁMICA DE PLAGUICIDAS EN SUELOS.....	40
	I.2.1.-Procesos de transferencia o transporte.....	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 la adsorción- desorción.....	48
	I.2.1.2.-Procesos de lixiviación. Factores que afectan a la movilidad del plaguicida en suelo.....	56
	I.2.1.3.-Volatilización.....	60
	I.2.1.4.- Escorrentía.....	60
	I.2.1.5.- Absorción por plantas y organismos.....	60
	I.2.2.- Procesos de degradación o transformación.....	61
	I.2.2.1.- Degradación química.....	61
	I.2.2.2.- Biodegradación.....	61
	I.2.2.3.- Fotodegradación.....	62
	I.3.-IMPORTANCIA DE LA ADICIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS AL SUELO. EL ALPERUJO COMO ENMENDANTE ...	63
	I.4.-BIBLIOGRAFÍA.....	68

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.....	80
	II.1.- INTRODUCCIÓN.....	82
	II.2.- OBJETIVOS.....	84
	II.3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	86
	II.3.1. Herbicidas.....	86
	II.3.1.1.-MCPA.....	86
	II.3.1.2.-S-metolacloro.....	87
	II.3.1.3.- Método de análisis de los herbicidas.....	88
	II.3.2. Alperujos.....	89
	II.3.2.1. Propiedades físico-químicas.....	90
	II.3.2.2. Caracterización de la materia orgánica soluble (MOS)	92
	II.3.3. Suelos.....	93
	II.3.3.1. Análisis elemental.....	93
	II.3.3.2. Mineralogía.....	93
	II.3.3.3. Porosimetría.....	93

II.3.3.4. Determinación capacidad de retención de agua	94
II.3.3.5. Respiración basal.....	95
II.3.4. Estudios con herbicidas en laboratorio.....	96
II.3.4.1.- Estudios de adsorción.....	96
II.3.4.2.- Estudios de desorción.....	97
II.3.4.3.- Estudios de disipación.....	98
II.3.4.4.- Estudios de mineralización.....	100
II.3.4.5.- Estudios de lixiviación.....	101
II.3.4.6.- Bioensayo.....	102
II.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	104
II.4.1.- Caracterización de alperujos.....	104
II.4.1.1. Propiedades físico-químicas.....	104
II.4.1.2. Caracterización MOS.....	106
II.4.2.- Suelos.....	111
II.4.2.1. Análisis elemental. Propiedades Físicoquímicas y superficiales.....	111
II.4.2.1. Respiración basal.....	116
II.4.3.- Estudios con MCPA.....	117
II.4.3.1.- Estudios de adsorción.....	117
II.4.3.2.- Estudios de desorción.....	121
II.4.3.3.- Estudios de disipación.....	122
II.4.4.1.- Estudios de adsorción	125
II.4.4.2.- Estudios de desorción.....	125
II.4.3.6.- Bioensayo.....	129
II.4.4.- Estudios con S-metolacoloro.....	131
II.4.4.1.- Estudios de adsorción.....	131
II.4.4.2.- Estudios de desorción.....	134
II.4.4.3.- Estudios de disipación.....	136
II.4.4.4.- Estudios de lixiviación.....	138
II.4.4.5.- Bioensayo.....	141
II.5. CONCLUSIONES.....	143
II.6. BIBLIOGRAFÍA.....	144

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 y actividad deshidrogenasa.....	150
III.1.- INTRODUCCIÓN.....	152
III.2.- OBJETIVOS.....	154
III.3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	154
III.3.1.- Herbicidas.....	154

III.3.1.1- Bentazona.....	154
III.3.1.2- S-metolacloro.....	155
III.3.1.3. Métodos de análisis de los herbicidas.....	155
III.3.2.- Residuos orgánicos y suelo.....	155
III.3.3.- Análisis de residuos orgánicos y suelo.....	157
III.3.4.- Estudios de laboratorio.....	158
III.3.4.1.- Estudios de adsorción-desorción.....	158
III.3.4.2.- Estudios de disipación-mineralización-Actividad deshidrogenasa.....	158
III.3.4.4.- Estudios de lixiviación.....	159
III.3.4.5.- Análisis estadístico.....	160
III.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	161
III.4.1.- Propiedades fisicoquímicas y superficiales de los suelos sin enmendar y enmendados y de los residuos usados.	161
III.4.2.- Respiración basal.....	166
III.4.3.- Estudios de laboratorio.....	167
III.4.3.1.- Estudios de adsorción.....	167
III.4.3.2.- Estudios de desorción.....	170
III.4.3.3.- Estudios de disipación-mineralización.....	174
III.4.3.5.- Monitorización de actividad deshidrogenasa.....	177
III.4.3.6.- Estudios de lixiviación.....	181
III.5.- CONCLUSIONES.....	185
II.6.- BILIOGRAFÍA.....	191

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.....	195
	IV.1.- INTRODUCCIÓN.....	195
	IV.2.- OBJETIVOS.....	197
	IV.3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	198
	III.3.1. Herbicidas.....	199
	IV.3.2. Tratamiento plantas y del suelo	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>.....	202
	IV.3.6. Medida de intercambio gaseoso.....	203
	IV.3.7. Análisis estadístico.....	205
	IV.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	206
	IV.4.1 Adsorción.....	206
	IV.4.2 Fluorescencia.....	208

	IV.4.3. Intercambio gaseoso.....	212
	IV.5. CONCLUSIONES.....	214
	IV.5. BIBLIOGRAFÍA.....	215
Capítulo V	Efecto de la adición de alperujo y herbicidas a suelos sobre comunidades microbianas autóctonas del mismo. Estudios independientes y dependientes de cultivo.	221
	V.1. INTRODUCCIÓN.....	221
	V.2. OBJETIVOS.....	227
	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.....	228
	V.3.5. Extracción de ARN.....	229
	V.3.6. Caracterización morfológica y recuento de microorganismos bajo técnicas cultivo-dependientes.....	230
	V.3.7. Electroforesis en gel de agarosa.....	231
	V.3.8. Amplificación de ARNr 16S a través de PCR.....	233
	V.3.9. Electroforesis en gel en gradiente desnaturizante (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 colonias o UFC.....	239
	V.4.3. Aislamiento colonias seleccionadas, purificación y secuenciación.....	240
	V.4.4. DGGE.....	250
	V.4.5. Selección de microorganismos resistentes.....	252
	V.5. CONCLUSIONES.....	257
	V.6. BIBLIOGRAFÍA.....	258
Capítulo VI	VI. Conclusiones Generales.....	265
Capítulo VII	VI. Publicaciones.....	269
	VI.1. Cañero, A.I., Cox, L., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Effect of the herbicides terbutylazine and glyphosate on Photosystem II Photochemistry of young olive (<i>Olea europea</i>) plants. <i>J.Agric.</i>	269

Food Chem. 2011, 59, 5528-5534.

VI.2. Cañero, A.I., Becerra, D., Cornejo, J., Hermosín, M.C.
Albarrán, A., López-Piñero, Cox, L. Transformation of
organic wastes in soil: Effect on bentazone behaviour. *Sci.*
Tot. Environ. 2012, 433, 198-205..... 276

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1.	Procesos que determinan el comportamiento de los plaguicidas en suelo.....	36
Tabla II.1.	Límites inferiores de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) por HPLC para MCPA y S-metolacloro.....	85
Tabla II.2.	Propiedades físico-químicas e índice de humificación (HIX) de los dos alperujos utilizados.....	101
Tabla II.3.	Porcentajes para algunos macronutrientes y micronutrientes metálicos y no metálicos contenidos en los dos alperujos Jaén (AJ y Morón (AM) utilizados.....	102
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, T10M).....	108
Tabla II.5.	Porcentajes relativos de filosilicatos presentes en la fracción arcilla de los tres suelos estudiados sin enmendar (S, C y T)	110
Tabla II.6.	Volúmenes de poro ($\text{mm}^3 \text{g}^{-1}$) para distintos rangos de tamaño de poro y volúmenes totales de poro para los suelos usados 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).....	110
Tabla II.7.	Coefficientes 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, T10J) y con AM (S10M, C10M, T10M).....	112
Tabla II.8.	Coefficientes de desorción de Freundlich y 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, T10J) y con AM (S10M, C10M y T10M).....	116
Tabla II.9.	Vida media ($T_{1/2}$) y coeficientes de ajuste a una cinética de primer orden para MCPA en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 10% (p/p) con AJ (S10J, C10J, T10J) y con AM (S10M, C10M, T10M).....	118
Tabla II.10.	Coefficientes 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).....	121
Tabla II.11.	Coefficientes de desorción de Freundlich, el porcentaje de desorción (D), y el coeficiente de histéresis (H) para S-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	129

	con AM (S5M, S10M, C5M C10M, T5M y T10M).....	
Tabla II.12	Vida media ($T_{1/2}$) y coeficientes de ajuste a una cinética de primer orden para S-metolacloro en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S10J, S5J, C10J, C5J, T5J y T10J) y con AM (S10M, S5M, C10M, C5M, T5M y T10M).....	134
Tabla III.1.	Propiedades fisicoquímicas de los suelos 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) y las propiedades fisicoquímicas de los residuos orgánicos (OW y DW).....	163
Tabla III.2.	Coefficientes de adsorción para bentazona y S-metolacloro K_f , n_f , en el suelo sin enmendar y enmendado en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 Y DW10).....	170
Tabla III.3.	Coefficientes de desorción para bentazona y S-metolacloro K_{fdes} y n_{fdes} en el suelo sin enmendar y enmendados en campo con orujo y alperujo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 Y DW10).....	172
Tabla III.4.	Vidas medias para bentazona y S-metolacloro ($T_{1/2}$) en el suelo sin enmendar y enmendado en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10). Porcentaje mineralizado y combustionado de bentazona en el estudio de disipación.....	178
Tabla III.5.	Porcentaje de bentazona lixiviado, extraído, total recuperado del suelo de las columnas empaquetadas a mano.....	180
Tabla IV.1.	Propiedades físico-químicas y textura de del suelo contenido en las macetas, sin enmendar (S) y enmendado al 5% y 10 % (p/p) con AJ (S5AJ y S10AJ, respectivamente).....	183
Tabla IV.2.	Coefficientes de adsorción para terbutilazina (T) y glifosato (G) en el suelo sin enmendar (S) y enmendados al 5% y 10% con alperujo (S5AJ y S10AJ).....	206
Tabla V.1.	Cebadores usados en las distintas reacciones de PCR.....	232
Tabla V.2.	Programa usado en el termociclador para las reacciones de PCR.....	233
Tabla V.3.	Composición de las soluciones desnaturalizantes S0 y S100 a partir de las que se preparan las S20 y S70.....	234
Tabla V.4.	Concentración de ARN obtenido tras la extracción y valor RIN.....	238
Tabla V.4.	Número medio de colonias presentes en las placas inoculadas con	240

	los suelos T, T10J, T10J-MCPA Y T10J-Smetolacoloro.....	
Tabla V.5.	Número de colonias de color blanco y azul en placas con concentraciones crecientes de MCPA.....	240
Tabla V.6.	Presencia (X) o ausencia (-) de las cepas (A1-A24) secuenciadas en los suelos T0, T10J, T10MCPA y T10JS-metolacoloro.....	241
Tabla V.7.	Tolerancia (T) y no tolerancia (NT) al herbicida MCPA a las dosis 2, 3, 5, 7, 10 kg ha ⁻¹	242
Tabla V.8.	Tolerancia (T) y no tolerancia (NT) al herbicida S-metolacoloro a las dosis 2, 3, 5, 7, 10 kg ha ⁻¹	245
Tabla V.9.	Morfología y número de UFC en placas TSA inoculadas con extracto de los alperujos AJ y AM.....	248
Tabla V.10.	Morfología y número de UFC en placas TSA inoculadas con extracto de los alperujos AJ y AM.....	255

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.	Procesos por los que se pueden incorporar los plaguicidas al suelo.....	35
Figura I.2.	Procesos que determinan el comportamiento de los plaguicidas en suelo.....	37
Figura I.3.	Tipos de isotermas de adsorción según Giles <i>et al.</i> (1960).....	41
Figura II.1.	Esquema de los sistemas de centrifugación tradicional, en tres fases y el actualmente más usado, de dos fases. Adaptación de Morillo et al., 2009.	61
Figura II.2.	Estructura tridimensional de la molécula de MCPA.	83
Figura II.3.	Estructura tridimensional de la molécula de MCPS-metolacloro.....	
Figura II.4.	Contador de centelleo (izquierda) y HPLC (derecha).	84
Figura II.5.	Situación de los puntos de muestreo de los suelos S, C y T y procedencia de los alperujos de Jaén y Morón.	86
Figura II.6.	Porosímetro de Intrusión de Mercurio (Quantachrome Poremaster 33 GT) (izquierda) y agregados secos para analizar (derecha).....	89
Figura II.7.	Matraces biométricos usados en los estudios de respiración basal de los suelos.....	91
Figura II.8.	Esquema del proceso de adsorción de los herbicidas.....	92
Figura II.9.	Esquema para el estudio de desorción de los herbicidas.....	93
Figura II.10.	Tarros herméticos usados para el estudio de disipación.....	95
Figura II.11.	Columnas de vidrio empaquetadas a mano con los suelos sin enmendar y enmendados.....	96
Figura II.12.	Espectro de fluorescencia para la MOS de los alperujosJaén (AJ) y Morón (AM) a pH de extracto y a pH=2.	98
Figura II.13.	Espectro de infrarrojos con transformadas de Fourier de la MOS de los alperujos usados.....	104
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 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, T10M). El volumen total de poro se representa por el número sobre la curva relativa.....	113
Figura II.15.	Producción de CO_2 por la microfauna presente en un kilo de los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados con AJ a las dosis de 5% (p/p) (S5J, C5J y T5J) y 10% (p/p) (S10J, C10J y T10J).....	115
Figura II.16.	Isotermas de adsorción de MCPA en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados con AJ a las 10% (p/p) (S10J, C10J, T10J, S10M, C10M y T10M).....	115
Figura II.17.	Isotermas de adsorción-desorción 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).....	118
Figura II.18.	Curvas de disipación de MCPA en los suelos S, C y T sin enmendar y	121

	enmendados con AJ y AM a la dosis del 10% (p/p) (S10J, C10J, T10J, S10M, C10M y T10M).....	
Figura II.19.	Curvas de mineralización de MCPA tras 42 días de incubación 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).....	122
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).....	125
Figura II.21.	Histograma para la biomasa de <i>Lepidum sativum</i> crecida tras 15 días de ensayo en laboratorio para los tratamientos Control, alperujo, MCPA+alperujo y MCPA.....	126
Figura II.22.	Estado de las macetas de <i>Lepidum sativum</i> crecidas tras 15 días de ensayo en laboratorio para los tratamientos Control, alperujo, MCPA+alperujo y MCPA.....	127
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).....	131
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).....	132
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).....	134
Figura II.26.	Curvas de lixiviación relativas y acumuladas 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.27.	Distribución de S-metolacloro retenido en las columnas de suelo tras el estudio de lixiviación 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).....	138
Figura II.28.	Histograma para la biomasa de <i>Ray grass</i> crecida tras X días de ensayo en laboratorio para los tratamientos Control, alperujo, S-metolacloro+alperujo y S-metolacloro.....	139
Figura II.29.	Estado de las macetas de <i>Ray grass</i> crecidas tras X días de ensayo en laboratorio para los tratamientos Control, alperujo, S-metolacloro+alperujo y S-metolacloro.....	139
Figura III.1.	Estructura química tridimensional de la molécula de Bentazona.....	155
Figura III.2.	Estructura química tridimensional de la molécula de S-metolacloro.....	157
Figura III.3.	Distribución de las parcelas en el estudio.....	165
Figura III.4.	Valores relativos (histograma) y acumulados (curva) para los	166

	volúmenes de Hg para los suelos sin enmendar y enmendados en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).....	
Figura III.5	Respiración basal del suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y en laboratorio.....	167
Figura III.6	Isotermas de adsorción para Bentazona y S-metolacloro en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo (OW30, OW60, DW27 and DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 and DW10).	168
Figura III.7.	Isotermas de adsorción-desorción para Bentazona en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo (OW30, OW60, DW27 and DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 and DW10).	173
Figura III.8	Isotermas de adsorción-desorción para S-metolacloro en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo (OW30, OW60, DW27 and DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 and DW10).	174
Figura III.9.	Curvas de disipación para Bentazona y S-metolacloro y en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y laboratorio con OW (arriba) y DW (abajo).....	176
Figura III.10.	Curvas de mineralización para bentazona en el suelo sin enmendar y enmendados con OW (arriba) y DW (abajo).....	177
Figura III.11.	Monitorización de la actividad deshidrogenasa de los suelos representado junto con las curvas de disipación de S-metolacloro, ambos en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y laboratorio con OW (arriba) y DW (abajo).....	180
Figura III.12.	Curvas relativas y acumulada de lixiviación de Bentazona y S-metolacloro en el suelo sin enmendar y enmendado en campo y laboratorio.....	182
Figura IV.1.	Estructura química de las moléculas de terbutilazina y glifosato.....	198
Figura IV.2.	Olivos para el ensayo en el interior del invernadero.....	199
Figura IV.3.	Fluorímetro modulado portátil.....	203
Figura IV.4.	Analizador de gases por infrarrojo (IRGA) usado para las mediciones durante el experimento.....	205
Figura IV.5	Isotermas de adsorción de terbutilazina (arriba) y de glifosato (abajo) en el suelo (S) sin enmendar y enmendados al 5% y 10% con alperujo (S5AJ y S10AJ).....	206
Figura IV.6.	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 (GAJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TAJ) 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	209

	diferentes entre sí (Tukey test, $P < 0.05$).....	
Figura IV.7	Eficiencia fotoquímica potencial del PSII ($F_v F_{m-1}$) (A-C), medida al amanecer en los tratamientos de <i>Olea europaea</i> tratados con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GAJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TAJ) 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, $P < 0.05$).....	210
Figura IV.8.	Daño crónico (barras negras) y daño dinámico (barras grises) fotoinhibición de las hojas de adultos <i>Olea europaea</i> tratados con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GAJ), con terbutilazina (AT) y con terbutilazina y alperujo (TAJ) tras: 24 horas (A, D, G); 15 días (B, E, H); y 60 días (C, F, I). Los valores representan las medias \pm SE, $n = 9$	212
Figura IV.9.	Tasa fotosintética (A) (A-C), conductancia estomática (Gs) (D-F), y concentración intercelular de CO_2 (Ci) (G-I) en <i>Olea europaea</i> tratada con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GAJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TAJ) tras: 24 horas (A, D, G); 15 días (B, E, H); y 60 días (C, F, I). Los valores representan la media \pm SE, $n = 9$	233
Figura V.1.	Fundamento de la desnaturalización en gel de poliacrilamida y gradiente desnaturalizante creciente.....	235
Figura V.2.	Equipo de electroforesis D Gene System-Denaturing Gel Electrophoresis para DGGE (BIO RAD).....	239
Figura V.3.	Placas medio TSA inoculadas con suelo T10J y T10J-MCPA tras 8 días a 30°C y oscuridad.....	248
Figura V.4	Placas con medio TSA inoculado con extractos de los alperujos AJ (izquierda) y AM (derecha).....	248
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 (SCONGELADO, SFRESCO, S10J Y S10M) (izquierda).....	250
Figura V.6.	Perfil DGGE comparando ADN y ADNc de los suelos T10J-MCPA y T10J-S-metolacloro AJ y AM.....	251
Figura V.7	Absorbancia del medio TSA respecto al tiempo de incubación con el herbicida MCPA (arriba) y cinética de degradación del herbicida (abajo).....	253
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).....	254

Capítulo I. Introducción General

CAPITULO 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) y cuyo VAB (Valor Añadido Bruto) agrario, a precios básicos, se situó en tercer lugar entre los países de la UE, después del de Italia y el de Francia, así como también con la contribución más importante de Europa a la Red Natura 2000 (MAGRAMA, 2009). 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, sobre todo **plaguicidas**, para combatir plagas y enfermedades de las plantas, ha conseguido compensar estas pérdidas, haciendo que el uso de plaguicidas sea indispensable en la agricultura e incrementándose su uso en las últimas décadas. Gracias a esto, 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.

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 estas pérdidas es que frecuentemente sólo entre un 1 y un 20% del producto aplicado (plaguicida) alcanza la plaga contra la que se destinaba actuar y, por tanto, más del 80% del producto se dispersa en el ambiente, llegando éstos a estar disponibles para sufrir procesos de degradación, lixiviación o escorrentía. Esto ha conducido al incremento en las dosis de aplicación de plaguicidas en los suelos, hasta lograr obtener beneficios en las cosechas. Este incremento supone un beneficio en el sector agrícola, pero la aplicación de plaguicidas en exceso a lo largo de los años, puede llegar a convertirse en fuente de contaminación puntual y/o difusa de plaguicidas y sus residuos. Esto hacía que los plaguicidas alcanzaran lugares hacia 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.

El suelo como sistema complejo, dinámico y vivo, está constituido por compartimentos de diversa naturaleza, (tierra, agua, aire, organismos vegetales y

animales) y todo en su conjunto posee la capacidad dentro de una medida, de autodepuración de 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 es mayor que la propia capacidad del mismo de amortiguar su efecto negativo, pasando los agroquímicos a ocupar espacios para los que no estaban destinados. Aquí reside el origen del problema del uso abusivo de plaguicidas. Este creciente problema 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 medioambiente.

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).

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

Además de la restricción en el uso de las materias activas aplicadas, el modo adecuado de aplicación de las mismas ha de ser tenido en cuenta, sobre todo 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).

I.2. Dinámica de los plaguicidas en el suelo

Los plaguicidas pueden incorporarse al suelo a través de tres vías principales. En primer lugar está la aplicación directa, típica de tratamientos sobre la superficie del suelos, en segundo lugar está la aplicación sobre las partes aéreas de las plantas, a través de la cual puede posteriormente ser arrastrado al suelo por efecto de la lluvia o por el viento, y en tercer lugar, por medio de restos vegetales desprendidos durante la cosecha o de forma natural, que transportan restos de plaguicidas al suelo.

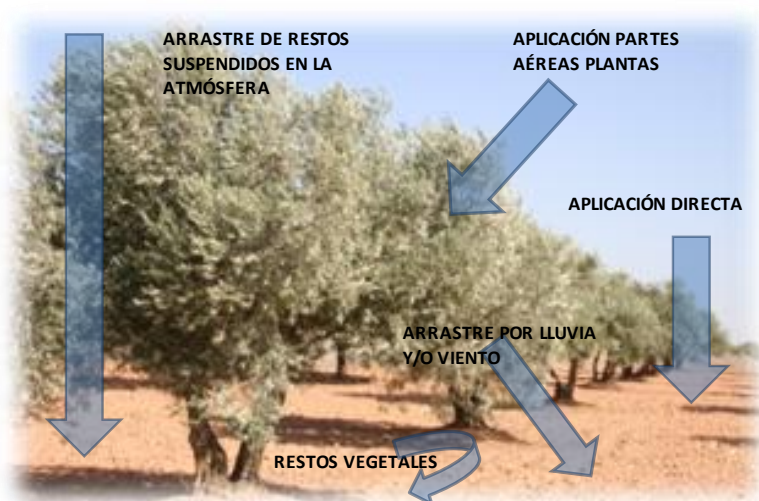


Figura I.1. Procesos por los que se pueden incorporar los plaguicidas al suelo.

Una vez que el plaguicida se ha incorporado al suelo, va a sufrir 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.

Los **procesos de transferencia o transporte** son aquellos por los que el herbicida se ve desplazado de una a otras fases del suelo sin experimentar ningún tipo de transformación química de la molécula. En este grupo se engloban los procesos de adsorción, desorción, volatilización, lixiviación, escorrentía, absorción y exudación por organismos vivos y difusión y arrastre por aire y suelo. Por el contrario, los **procesos de transformación**, implican modificación de las propiedades químicas de los plaguicidas,

transformándose en otros compuestos distintos, que pueden tener la misma, mayor o menor toxicidad. Éstos 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	-Fotodegradación
-Volatilización	-Biodegradación
-Lixiviación	-Degradación química
-Escorrentía	
-Absorción-exudación	
-Difusión-arrastre	

Hay que tener en cuenta que todos los mecanismos que se mencionan se pueden dar simultáneamente en 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 condiciona a cada uno de los demás, ya que modifica la cantidad de plaguicida en disolución y por ello la cantidad que puede lixiviar, volatilizar, perderse por escorrentía o ser absorbida por plantas u otros organismos.

I.2.1. Procesos de transferencia o transporte

I.2.1.1. Procesos de adsorción-desorción

El proceso de adsorción se define como el paso de un soluto desde una fase líquida o gaseosa a la superficie de una fase sólida sin producir cambios en esta misma (Osgerby, 1970). Los procesos de adsorción en el suelo ocurren con mayor frecuencia entre la disolución del suelo y la fase sólida del suelo, ya que ésta se encuentra siempre rodeada de una fina capa de agua y sólo en casos de extrema aridez se produciría la adsorción gas-sólido (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). Los procesos de adsorción son muy importantes en la dinámica del plaguicida en suelo, ya que determinan la cantidad de plaguicida libre en solución y por tanto que puede sufrir transformación o transporte por otros procesos

(Cornejo et al., 2005). Por ejemplo, la volatilización, la lixiviación o la biodisponibilidad, disminuyen 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).



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

Otro proceso que también está implicado en la cantidad de herbicida que está disponible en la solución del suelo, es el proceso inverso a la adsorción: la desorción. Durante éste, las sustancias adsorbidas vuelven a la disolución del suelo 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). La irreversibilidad o histéresis es un fenómeno importante ya que en gran medida, determina la biodisponibilidad del plaguicida en el suelo (Wauchope, 2002).

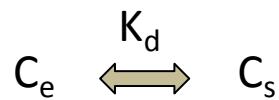
Las fuerzas de atracción responsables de la adsorción pueden ser de diferentes tipos y se clasifican como mecanismos de adsorción. En función de las propiedades de los solutos y de la superficie adsorbente son posibles varios tipos de mecanismos que pueden ocurrir simultáneamente.

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 \(1996\)](#) hay mecanismos favorecidos por cambios de entalpía y otros en los que la adsorción produce cambios de entropía, como son las interacciones hidrofóbicas. Y por otro lado, describen mecanismos relacionados con cambios de entalpía, como son el enlace iónico, el enlace covalente, fuerzas de Van der Waals, puente de Hidrógeno, transferencia de carga y cambio de ligando.

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 (suelos) diferentes y en diversas condiciones ([Beck et al., 1993](#)). La 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:



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:

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

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 en unas 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 hidrofóbicos e insolubles en agua (Wauchope et al., 2002).

No obstante, en la mayoría 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 isothermas de adsorción.

Isothermas de adsorción

Las isothermas 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. 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.

La forma de las isothermas es una característica importante porque proporciona mucha información acerca de los mecanismos de adsorción (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 isothermas de adsorción pueden ser clasificadas en cuatro tipos distintos, dependiendo 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 se ve facilitada a medida que aumenta la concentración del plaguicida. 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

Son las mejores conocidas, y en ellas se observa una alta afinidad relativa entre el soluto y el adsorbente en la fase inicial de la curva. Mientras los sitios específicos de adsorción van siendo ocupados, le resulta más difícil al soluto encontrar un lugar libre para adsorberse. 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 un reparto constante del soluto entre la disolución y el adsorbente. Muestran una partición del adsorbato independiente de la concentración. 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 de soluto, donde todo o prácticamente todo, queda adsorbido en la superficie.

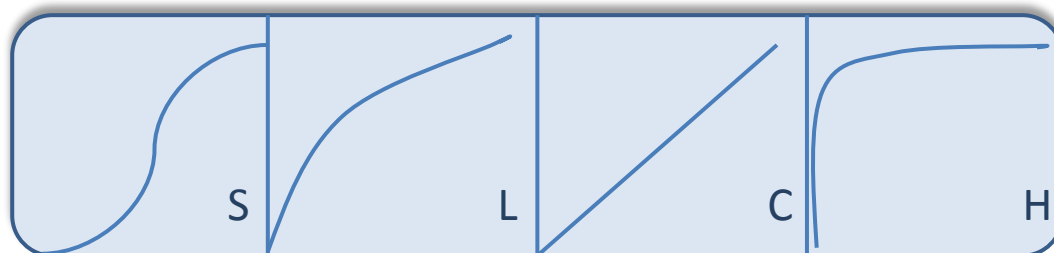


Figura I.3. Tipos de isothermas de adsorción según Giles *et al.* (1960).

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 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. Se expresa como:

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

O su expresión logarítmica:

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

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 $\log C_s$ frente a $\log C_e$.

El valor absoluto de K_f corresponde a la cantidad de plaguicida adsorbido cuando la concentración del plaguicida en el equilibrio es 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 $\log C_s$ frente a $\log C_e$ 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 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 diferentes 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 n 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 en la desorción y en la adsorción indica el grado de histéresis. Los coeficientes de histéresis 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).

$$H = 1/n_{f_d} / 1/n_f$$

Ecuación 1.3

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

El coeficiente H puede oscilar entre 0, para procesos completamente irreversibles, y 1, cuando la isoterma de desorción sigue el mismo camino que el de la adsorción. La existencia de histéresis puede ser atribuible a artefactos experimentales como: no haberse alcanzado 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 generada bien por la deformación de los poros del soluto, lo que origina que el camino de la adsorción difiera del de la desorción (Washington et al., 2003) o bien por la formación de residuos irreversiblemente adsorbidos a las partículas de suelo, donde la desorciones cinéticamente tan lenta que hace que experimentalmente no sea posible observarla (Karickhoff, 1982; Celis et al., 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, sufriendo 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 físico-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.

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 plaguicida y su distribución son factores a tener en cuenta en el proceso de adsorción. Los compuestos que existen en disolución como 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, aunque son atraídos por las superficies de carga positiva como 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; Weber et al., 1986). En algunos casos la carga molecular puede ser débil, produciéndose entonces una simple polaridad de la molécula y la interacción con la

superficie adsorbente puede darse entre 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, las interacciones hidrofóbicas parecen jugar un papel fundamental en la adsorción.

El tamaño de la molécula de 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.

De acuerdo con [Calvet \(1989\)](#), 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. 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 Na-montmorillonita, 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 hay 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 óxidos 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. La fracción coloidal o arcilla del suelo se define como aquella que engloba las partículas de diámetro inferior a 2 μm . 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 está compuesta en su mayoría por minerales de la arcilla o 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 ($< 2\mu\text{m}$) de los suelos (Moore y Reynolds, 1987).

Los minerales de la arcilla están constituidos por láminas de unidades estructurales sobrepuestas, constituyendo los iones una red regular en el que figuran las dos unidades siguientes: octaedro, constituido por un ión metálico (Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) en el centro y en los vértices por iones O^{2-} o OH^- y el tetraedro formado por un ión Si^{4+} que ocupa el centro y los vértices ocupados por iones O^{2-} o excepcionalmente OH^- . 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. Es el caso de la sustitución del ión Si^{4+} por el ión Al^{3+} , del Al^{3+} por Fe^{2+} o Mg^{2+} , que originan un exceso de cargas negativas permanente. Este desequilibrio queda compensado por cationes, hidratados o no. Cuando en la disolución del suelo existen otros cationes se da el cambio de los que existen en la fase interlaminar por los que existen en la solución hasta llegar a un equilibrio, esta propiedad se denomina capacidad de cambio catiónico (CCC).

Como la montmorillonita y la vermiculita tienen mayor superficie específica y CCC, 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 directamente o por medio de moléculas de agua coordinadas a los cationes de cambio) o por interacción con los grupos OH basales de la caolinita y los de los bordes de las láminas de los silicatos (Calvet, 1989). Laird (1996) y Celis et al. (1997a), pusieron de manifiesto la existencia de micrositios 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 Schwarzenbech, 1993).

Los óxidos metálicos coloidales que incluyen hidróxidos, oxohidróxidos y óxidos propiamente dichos son componentes muy importantes de la arcilla, siendo los de aluminio, silicio y sobre todo los de hierro especialmente abundante (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, tienen 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^+ o OH^- dependiendo del pH de la disolución. El pH al cual las cantidades adsorbidas de H^+ y OH^- es la misma se denomina punto de carga cero 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., 1999b, 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 pequeña, 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 mayor que el 2%, la adsorción ocurre fundamentalmente debido a la materia orgánica (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; Cox et al., 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 et al., 1991; Hermosín y Cornejo, 1991; Cox et al., 1993; Cox et al., 1994a; Aguer et al., 2000; Hermosín et al., 2000). En estos casos el compuesto orgánico considerado tenía 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

Aunque la fracción orgánica en el suelo está compuesta por organismos vivos y sus restos no descompuestos, parcialmente descompuestos y completamente descompuestos, el término de materia orgánica en el suelo es usado para referirse más específicamente a los componentes no vivos, siendo una mezcla heterogénea compuesta de un gran número de productos resultantes de las transformaciones químicas y microbianas de desechos orgánicos.

Sustancias no húmicas

Son compuestos pertenecientes a 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. 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):

- a) huminas, fracción de las sustancias húmicas que es insoluble en agua a cualquier pH,
- b) ácidos húmicos, fracción de sustancias húmicas que es insoluble en ácido, pero soluble a pH más elevados,
- c) ácidos fúlvicos, fracción que es soluble en cualquier pH.
- d) 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: (i) ácidos húmicos íntimamente ligados a la fracción mineral que no pueden ser separados, y (ii) materia húmica altamente condensada con un contenido elevado en carbono (>60%) y por eso insoluble en álcalis.

Los grupos funcionales presentes en las sustancias húmicas son muy numerosos y variados. Incluyen grupos carboxilos, carbonilos, hidroxilos, sulfhidrilos, aminos, sulfónicos, etc. Los grupos carboxilos e hidroxilos son los principales responsables de su elevada capacidad de intercambio catiónico (CCC), dependiente del pH, así como de su capacidad para acomplejar metales. Se considera que los grupos hidroxilos y carboxilos están directamente implicados en la interacción con compuestos orgánicos catiónicos y otros componentes como los óxidos metálicos y los minerales de la arcilla (Theng, 1974, Cornejo y Hermosín, 1996).

Por su naturaleza aromática y contenido en grupos funcionales polares, las sustancias húmicas tienen 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 prioritario en los procesos de adsorción. Es frecuente obtener una correlación bastante alta adsorción-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.

Características de la disolución del suelo

Es importante tener en cuenta el efecto del pH y de la fuerza iónica de la disolución. 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 interactuar 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 -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.

La fuerza iónica asume un papel importante 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, 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 la solubilidad varía con el contenido de agua (Bailey y White, 1970). Cuando este contenido es bajo, debido a la baja solubilidad que generalmente presentan la mayor parte de los plaguicidas, tienden a quedar en estado sólido y, por tanto, difícil de adsorberse. El otro mecanismo tiene que ver con la competencia del plaguicida por los lugares de adsorción a diferentes niveles de humedad. El agua está adsorbida muy fuertemente en los lugares de adsorción del coloide por ser un compuesto muy polar. Por ello los contenidos bajos en humedad provocan una fuerte retención del agua, que 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 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 dando lugar a un movimiento vertical a lo largo del perfil del suelo. Esto incide en la efectividad biológica del plaguicida y favorece la contaminación de aguas subterráneas. El riesgo de contaminación de acuíferos por el movimiento vertical de plaguicidas depende fundamentalmente de la velocidad de transporte a través del suelo y de su adsorción y degradación a lo largo del perfil del mismo, ya que ambos procesos disminuyen 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 y microbiológicas del suelo, la estructura del suelo, el clima, la forma y época 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, y ésta está determinada 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). Estas características, como se dijo anteriormente, también influyen en la adsorción de plaguicidas al suelo. 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 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, manteniendo una relación inversamente proporcional (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 (Nelson et al., 1998; Cox et al., 2000^a; 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, es la fracción mineral, arcillas y óxidos metálicos, la que controla los procesos de adsorción-desorción (Beck et al., 1993). También hay que mencionar que la desorción de los plaguicidas vuelve a poner 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 distinto tamaño. Los de mayor tamaño, llamados macroporos son los formados por los conductos 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 sin atravesar la masa del suelo (Beven y Germann, 1981, Larsson et al., 1999). En este caso se habla de transporte hidrodinámico, mientras que el movimiento del plaguicida a través de la masa del suelo ocurre por 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 principio de la aplicación tendrán gran influencia en la cantidad de herbicida lavada (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. 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 en la solución del suelo (Cox et al., 1996; Calderón et al., 1999; Cox et al., 1999a). También se ha encontrado que en laboreo de conservación la materia orgánica en los primeros milímetros del suelo es mayor que en suelos con 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 suelo, modificando la estructura y actividad microbiana del suelo. Por una parte, el aumento en materia orgánica del suelo tras la enmienda podría llevar a un aumento de adsorción de plaguicidas y/o a una mayor degradación dando lugar a una menor lixiviación (Guo et al., 1993; Cox et al., 2000a). Por otra parte, el cambio en la estructura del suelo puede dificultar o favorecer el desplazamiento del plaguicida (Sánchez-Camazano et al., 1996; Cox et al., 1997a). 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; Williams et al., 2002; Worrall et al., 2001)

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, evaporación de una solución acuosa 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 la precipitación o el riego supera 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 las pérdidas por escorrentía son las condiciones climáticas, las características del suelo y del plaguicida y las 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. La gran variedad de plantas y organismos resistentes a determinados plaguicidas, lo son porque los metabolizan a compuestos no tóxicos, lo que constituye una vía natural de descomposición (Schmidt y Fedtke, 1977). Este proceso de absorción está determinado en gran medida por la fijación del plaguicida por los coloides del suelo, ya que esto determina la cantidad de plaguicida en la solución del suelo. El plaguicida en solución es absorbido por el sistema radicular. Los organismos también exudan estos compuestos, volviendo así a estar disponibles en la disolución del suelo.

1.2.2.- Procesos de degradación o transformación

La desaparición de los plaguicidas en el suelo en ocasiones ocurre por procesos que conducen a su transformación a otros residuos generalmente, pero no siempre, de menor toxicidad (Cheng y Lehman, 1985) y que, por tanto, reducen la contaminación de plantas y aguas superficiales y subterráneas.

Los procesos de degradación o transformación se suelen dividir, según su origen, en tres grupos: 1.- degradación química, mediadas por gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos, 2.- degradación microbiana o biodegradación, catalizada exclusivamente por enzimas y 3.- 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.

1.2.2.1.- Degradación química

Los procesos de degradación química más frecuentes son las reacciones de hidrólisis y de sustitución y las reacciones redox, y pueden ocurrir tanto en disolución como catalizadas por la superficie de las partículas del suelo (Cornejo et al., 1983). Todas estas reacciones suelen 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.

1.2.2.2.- Biodegradación

Los procesos de biodegradación 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 transforman para al final producir los productos. Éstos pueden sufrir una total degradación llegándose a transformar en moléculas simples, como es la degradación del plaguicida hasta la obtención de 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. Estos procesos afectan significativamente a las propiedades químicas o toxicológicas del herbicida, generando productos que pueden ser utilizados como sustrato por otros organismos. Esto es lo que se llama cometabolismo, y es frecuente entre poblaciones microbianas del suelo.

La tasa de biodegradación está muy influenciada por el grado de adsorción del herbicida. La adsorción reduce la biodegradación, ya que las moléculas adsorbidas no suelen estar disponibles para los microorganismos. El efecto de la materia orgánica en los procesos de biodegradación es 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 ésta 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., 1999b).

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 sus residuos una vez que son incorporados al suelo. Resultado de muchos estudios, se ha llegado a la conclusión de que una de las más eficaces maneras hasta ahora, de evitar pérdidas de herbicidas por escorrentía o por lixiviación es incorporar al sistema 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 adsorción del plaguicida a las partículas del suelo. También se ha visto que este aumento en la adsorción puede disminuir la degradación de plaguicidas, aumentándose su persistencia y por ello su eficacia en el cultivo.

Han sido muchos los tipos de enmiendas orgánicas que se han usado y que se están estudiando. 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., 1998^a y 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 ([Si et al.,](#)

2006), restos de madera (Menasseri et al., 2004), residuos líquidos de almazara (Cox et al., 1997a y 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 y 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., 2011 y 2012).

En cuanto a los aspectos positivos de la adición de estas enmiendas, se encuentra la incorporación de materia orgánica exógena a los suelos, que como se ha mencionado antes, resulta muy beneficioso en Andalucía, donde la mayoría de los suelos, entre ellos los agrícolas, se caracterizan por tener un bajo contenido en la misma (en torno a 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, la cantidad de N y C extraíble, el P disponible y el 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 (Rodríguez-Lucena et al., 2010).

En lo que respecta a su efecto en el comportamiento de plaguicidas el uso de enmiendas orgánicas no siempre es garantía del control y disminución de la lixiviación de plaguicidas, especialmente de aquellos que son compuestos muy solubles en agua (Worrall et al., 2001) en cuyo comportamiento quizás adquiera más relevancia el contenido en COS del residuo. Celis et al. (1998b) observaron en este caso una disminución la adsorción de atrazina en suelos enmendados con lodos de depuradora, sugiriendo que debido al pequeño peso molecular de la materia orgánica soluble, 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 traducía 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 se vio un aumento en la mineralización de atrazina con las enmiendas de turba, tallos de maíz y estiércol. Esto muestra el doble papel que ejerce de la materia orgánica que la enmienda aporta al suelo sobre la degradación de los plaguicidas: por un lado aumentando su persistencia en suelo al aumentar su adsorción, y por otro, puede favorecer su degradación al aumentar la actividad biológica del suelo.

Como se ha dicho en párrafos anteriores, en 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 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 alperujo, ya que su obtención se basa en el sistema de centrifugación en tres fases, cada vez más en desuso ([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. ([Sostenibilidad de la producción de Olivar en Andalucía](#)). 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. 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 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**, reduce 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 el resto de países mediterráneos está teniendo lugar una incorporación más lenta (Roig et al., 2006).

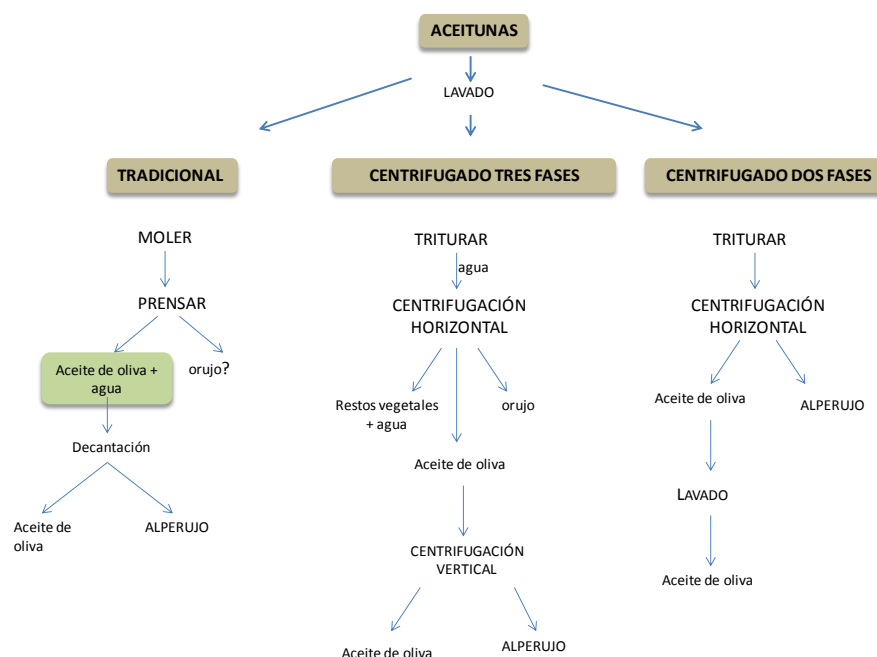


Figura II.1. Esquema de los sistemas de centrifugación tradicional, en tres fases y el actualmente más usado, de dos fases. Adaptación de Morillo et al., 2009.

La nueva tecnología de extracción de aceite de oliva consiste en un proceso de 2 fases que genera una parte líquida (aceite de oliva) y una parte residual sólida, conocida por alperujo (Alburquerque et al., 2004, Alburquerque et al., 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, siendo su eliminación un problema técnico, financiero y medioambiental (Rodríguez-Lucena et al., 2010).

La introducción del uso de sustancias xenobióticas, como son los plaguicidas, ha mejorado la producción de los cultivos, incluido el 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 hacia 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. Además, este problema se agrava ya que el cultivo del olivar comprende en la mayoría de las veces, suelos con bajo contenido orgánico y donde el 74% de la superficie de los cultivos se encuentra inclinada al menos un 7% (Junta de Andalucía, 2003). Esto favorece la desestructuración del suelo y el lavado de nutrientes y por consecuencia, reducen la fertilidad de los suelos en las zonas altas del cultivo y consecuente pérdida de plaguicidas en el sistema suelo, conduciendo a aplicar más cantidad de producto en los campos de cultivo., provocando en ocasiones restricciones en la capacidad de adquirir recursos por parte del cultivo y, por tanto, reduce su productividad (Galmés et al., 2011).

I.4. BIBLIOGRAFÍA

- Aguer, J. P., Cox, L., Richard, C., Herмосín, 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.
- Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, 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., Herмосín, 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., Herмосín, 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.
- 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.
- 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. And 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 and 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. y White, J.L. Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticides in soils. *Residue Rev.* **1970**, 32, 29-92.
- 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.
- Barriuso, E., Laird, D.A., Koskinen, W.C., Dowdy, R.H. Atrazine desorption from smectites. *Soil Sci. Soc. of 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.
- Base de datos del Consejo Internacional del Olivo, **2008**.
- Beck, A. J., Johnston, A. E. J. y Jones, K. C. Movement of nonionic organic chemicals in agricultural soils. *Crit. Reviews in Environ Sci. and 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. II 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. I. Adsorbent concentration effects. *J. Environ. Qual.* **1985**, 14, 265-269.
- Bowman, B.T. Mobility and persistence of the herbicides atrazine metolachlor y terbutylazine 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., Fernández-Hernández, A., García-Ortiz Civantos, C., Cornejo. Field appraisalment of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention. *Agric. Ecosyst. and Environ.* **2009**, 132, 260-266.
- 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., 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.
- Calderón, M. J., Hermosín, M. C., Moreno, F, y 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., 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., 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.* **1999a**, 34, 929-941.

- 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.* **1999b**, 33, 1200-1206.
- Cheng, H. H. y Lehman, R. G. Characterization of herbicide degradation under field conditions. *Weed Sci.* **1985**, 33, 7-10.
- 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., 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., 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.
- Cornejo J., Hermosín, M. C., Celis, R., Cox, L. **2005**. Methods to determine sorption of Pesticidas and Other Organic Compounds. En: *Soil-Water-Solute process characterization. An integrated approach*. Editorial CRC PRESS. 435-463.
- 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., 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.
- Cox, L., Calderón, M. J., Hermosín, M.C., Cornejo, J. **1999**. Leaching of clopyralid and metamitron under conventional and reduced tillage systems. *J. Environ. Qual.* 28, 605-610.
- 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., 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., Celis, R., Hermosín, M.C., Becker, A., Cornejo, J. Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1997a**, 65, 151-161.
- 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. y Cornejo, J. Retention of thiazafurón 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 Thiazafurón as a function of soil properties. *Internat. J. of Environ. Anal. Chem.* **1995**, 58, 305-314.
- Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Leaching of simazine in organic-amended soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **1999b**, 30, 1697-1706.
- Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J. Sorption of metamitron on soils with low organic matter content. *Chemosphere.* **1996**, 32, 1391-1400.
- Cox, L., Koskinen, W.C., Yen, P.Y. Sorption-desorption of imidacloprid and its metabolites in soils. *J. Agric. Food Chem.* **1997b**, 45, 1468-1472.
- 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.
- Crohn, D.M. Planning biosolids land application rates for agricultural systems. *J. of Environ. Eng.* **1996**, 122, 1058-1066.
- 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.

- 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.
- 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 and Environ.* **2011**, 34, 2, 245-260.
- Giles, C.H., MacEwan, S.N., Nakhwa, S.N. y 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.
- 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.
- 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.
- Guo, L., Bicki, T.J., Felsot, A.S. y 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. Contaminant 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.

- Hederlein, 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. **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. 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., Cornejo, J., Cox, L. **2000**. Calculation and validation of K_{clay} as predictor for polar or ionoc pesticide adsorption by soils. Pesticide-soil interactions: Some current research methods. J. Cornejo, P. Jamet (eds.) INRA, Paris, pp 131-139.
- Hildebrandt, A., Guillamón, M., Lacorte, S., Tauler, R., Barceló, D. Impact of pesticides used in agricultura 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.
- 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.

- 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., Fabrega 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.
- Liñan, C. *Vademecum de productos fitosanitarios*. **2006**.
- Rodríguez-Lucena, P., Hernández, D., Hernández-Apaolaza, L., Lucena, J.J. 2010. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer. *J. Agric. Food Chem*. 58, 1085-1092.
- 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.
- Menasserri, 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. 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.
- Osgerber, J.M. Sorption of un-ionized pesticides by soils. En "Sorption and Transport Processes in Soils" SCI Monograph. **1970**, 37, 63-78.

- 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.
- Piotrowska, A., Iamarino, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. Iron oxides. En: *Minerals in Soil Environments*. J. B. Dixon y S. B. Weed (eds.). 2nd Ed., Madison WI, pp. **1989**, 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.

Sostenibilidad de la producción de Olivar en Andalucía.

- 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-
- 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.
- 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., 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. Contaminant Hydrology*. **2001**, 49, 241-262.
- 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.
- 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 d 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; Morillo et al., 2009). Constituidos principalmente por hemicelulosa y lignina (Alburquerque et al., 2004; Serramiá et al., 2011), incrementan la materia orgánica, mejoran la estructura y enriquecen 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 que genera la gestión de esa gran cantidad de alperujo producida, su utilización como enmendante en suelo supone un modo ecológico, eficaz y barato de mejorar las propiedades de los suelos andaluces, además de controlar la posible contaminación del medio por parte de los plaguicidas, jugando un papel importante en el mantenimiento de los ecosistemas naturales (Roig et al., 2006). Es importante considerar, aún de todas las ventajas que su adición a los suelos proporcionan, que la aplicación directa de estos residuos en ocasiones tiene por consecuencia efectos tóxicos sobre los organismos vegetales del suelo, causa de un 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 son pobres en general en P, Ca, y Mg e incrementa el contenido en sales y la acidez de los suelos (Alburquerque et al., 2004).

Tal y como se ha dicho en el Capítulo I, la adición al suelo de enmiendas no siempre es garantía del control y disminución de la lixiviación de plaguicidas, especialmente de aquellos que son compuestos muy solubles en agua, sin embargo otros estudios han revelado que la adición de un alperujo y un alperujo extractado a un suelo arenoso, produce un aumento en la adsorción y persistencia

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:

- 1.- Evaluar el efecto que la adición de los alperujos producen sobre las propiedades fisicoquímicas y superficiales de los suelos.
- 2.- Caracterizar la materia orgánica soluble de los alperujos por espectroscopia de fluorescencia y espectroscopia infrarroja.
- 3.- 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.

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 $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Su solubilidad en agua es 0.395 g l^{-1} a pH 1 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 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 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Tomlin, 2006).

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 adquirido a Sigma Aldrich GmbH (Seelze, Alemania) con una pureza de 98.8% . Para los estudios de mineralización se usó el producto MCPA- $[\text{U}^{14}\text{-C-ring}]$ marcado radiactivamente con actividad específica de 5.55 MBq mg^{-1} y proporcionado por IZOTOP (Budapest, Hungría).

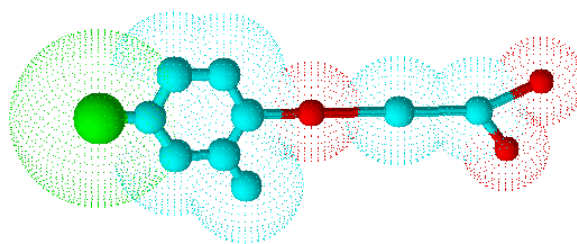


Figura II.2. Estructura tridimensional de la molécula de MCPA.

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 y coeficiente de partición octanol agua $\log P= 3.05$ (20 °C y pH 7). Su solubilidad en agua es de 480 mg l⁻¹ a 25 °C y es totalmente miscible en solventes orgánicos (Tomlin, 2006).

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) encontró en un estudio con 10 malas hierbas distintas, que los *S*-isómeros poseen al menos 20 veces más actividad biológica en preemergencia que los *R*-isómeros.

El producto analítico 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.

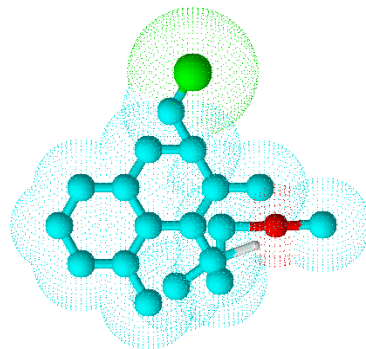


Figura II.3. Estructura tridimensional de la molécula de S-metolacloro.

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. En primer lugar para la determinación de los herbicidas MCPA y *S*-metolacloro sin marcar con C^{14} se usó la técnica analítica de 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 la 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
<i>S</i> -metolacloro	0.01	0.03

Para el análisis de MCPA marcado con C^{14} se utilizó el conteo por centelleo líquido. 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 de la cromatografía líquida de alta resolución, que presenta límites inferiores de detección y cuantificación específicos para cada molécula 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 con el líquido de centelleo usado en particular, se encontraba dentro del rango 18 y 22 dpm (desintegraciones por minuto).



Figura II.4. Contador de centelleo (izquierda) y HPLC (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 Jaén (AJ) y otro procedente de una almazara de Morón (AM). Para reducir su alto contenido en humedad se dejó secar al aire libre mediante volteo con pala mecánica. El alperujo de Jaén procedía de la finca experimental del IFAPA en Menjíbar mientras que el de Morón fue proporcionado por la empresa Hijos de Espuny Osuna S.L.

II.3.2.1. Propiedades físico-químicas

Propiedades físico-químicas (como contenido en COT, contenido en nitrógeno, pH, CE...) 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, entre ellos algunos metales pesados, de estos residuos por ICP-OES. 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 CaCl (0.01 M) ([Zsolnay y Görlitz, 1994](#)).

Las técnicas utilizadas para la caracterización de la MOS han sido la espectroscopia FTIR y la espectroscopia de fluorescencia, técnicas ampliamente empleadas para la caracterización de la MOS ([Cox et al., 2000b; 2004; Ohno et al., 2007](#)). El contenido en CO de los extractos de MOS también fue determinado.

Determinación del carbono orgánico soluble total

Triplicados de 1 g de AJ y AM se pusieron a interaccionar 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 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 AJ y AM se extrajeron con 20 ml de una solución CaCl₂ (0.01 M) (proporción 1:20). 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 de 0.45 µm.

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 et al., 1994](#)). Por otro lado se acidificaron las

muestras añadiendo HCL 2N 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. \(1999\)](#):

$$\text{HIX} = \frac{\sum \lambda_{W480-435}}{\sum \lambda_{W345-300}} \quad (\text{Ecuación II.1})$$

Donde λ es la longitud de onda en nanómetros y I_λ 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 CaCl_2 (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} .obteniéndose los espectros de infrarrojos para la MOS de los residuos.

II.3.3.- Suelos

Se seleccionaron tres suelos (S, C y T) en base a sus distintas características físico-químicas, contenido en CO y a su uso procedentes de cultivos intensivos de la Vega del río Guadalquivir. El suelo S, de textura arenosa, procede de la finca experimental “La Hampa” perteneciente al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS) en la localidad de Coria del Río (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). 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 con los suelos sin enmendar y los suelos enmendados con los alperujos de Jaén Y Morón a las dosis de 5 y 10% (p/p) (S, S5J, S10J, T, T5J, T10J, C, C5J y C10J).



Figura II.5. Situación de los puntos de muestreo de los suelos S, C y T y procedencia de los alperujos de Jaén y Morón.

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 en materia orgánica (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 con relación 1:2 (p/p). 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 CaCl_2 (0.01 M), las suspensiones se agitaron durante 24 horas 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 poro. Se hicieron diluciones a la relación 1:25 (v/v) y se analizaron en un Medidor de Carbono Total, Shimadzu 5020 Total Carbon Analyser 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 $< 2\mu\text{m}$) 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 Mg^{2+} 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 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 1×10^5 hasta 1 nm) presentes en las muestras por Porosimetría de Intrusión de Mercurio usando un Quantachrome Poremaster 33 GT, 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).

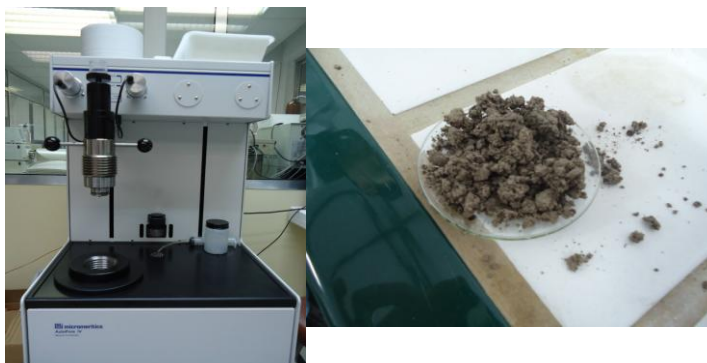


Figura II.6. Porosímetro de Intrusión de Mercurio (Quantachrome Poremaster 33 GT) (Izquierda) y agregados secos para analizar (derecha).

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 para cada suelo sin enmendar y enmendado con los alperujos al 5% y 10% (p/p) (S, S5J, S10J, T, T5J, T10J, C, C5J y C10J, S5M, S10M, T, T5M, T10M, C, C5M y C10M) 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 nos indicó la cantidad máxima de retención de agua del suelo y a partir de esto se calculó el 40% de la capacidad de retención, que fue aplicada al inicio y mantenida 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, T, T5J, T10J, C, C5J y C10J, S5M, S10M, T, T5M, T10M, C, C5M y C10M). Se añadió agua destilada al suelo hasta ajustar su contenido 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 agua 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 MILLI Q en una 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 suelosII.3.4.-

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% 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 (Zsolnay, 1996), 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, 1996). Las muestras de suelo se pesaron en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml de capacidad, se agitaron mecánicamente durante 24 horas a temperatura ambiente, ya que previamente se había comprobado que era tiempo suficiente para que se alcanzara el equilibrio entre la solución y las partículas del suelo y se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se filtraron con filtros de fibra de vidrio de 0.45 μm y se analizaron por HPLC, obteniéndose los valores de concentración de MCPA y S-metolacloro en el equilibrio (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.

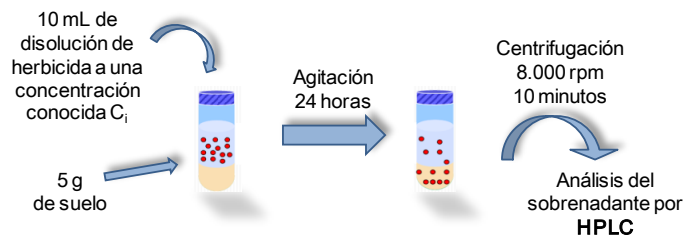


Figura II.8. Esquema del proceso de adsorción de MCPA en los suelos..

Las isothermas de adsorción se obtuvieron representando las cantidades de los herbicidas adsorbidos (C_s (mg kg^{-1})) frente a las concentraciones de equilibrio (C_e) 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.

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

Siendo C_s la cantidad de plaguicida adsorbido por kilogramo de suelo, C_e , la concentración de plaguicida en el equilibrio, 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 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 $\log C_e$.

$$\log C_s = K_f + 1/n_f \log C_e \quad \text{Ecuación II.4}$$

II.3.4.2.- Estudios de desorción

Tras la adsorción se realizaron tres desorciones sucesivas a partir de la disolución de mayor concentración (50 μ M). 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 la cantidad adsorbida a las concentraciones de 50 μ M, para MCPA y S-metolacoloro 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 desorción (1ªD), segunda desorción (2ªD) y tercera desorción (3ªD).

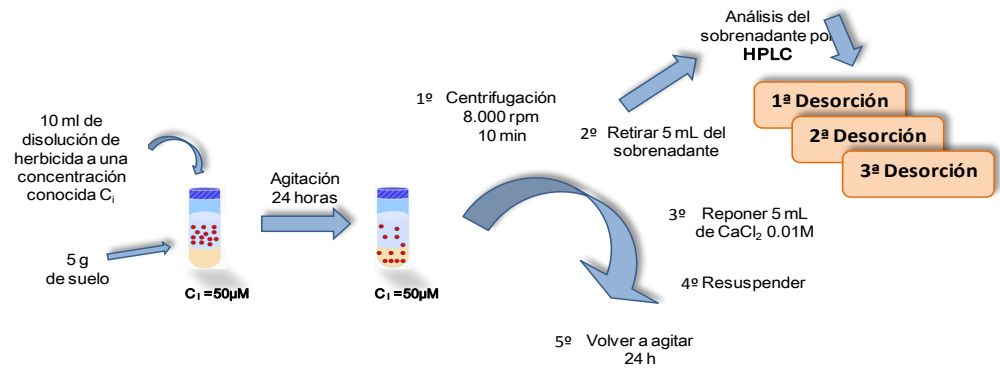


Figura II.9. Esquema del proceso de desorción de MCPA a partir de suelos con una solución de MCPA 50 μM .

Al igual que en los estudios de adsorción, la cantidad de herbicida en los sobrenadantes en los ciclos de desorción (C_{ed}) 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 (Barriuso et al., 1994) expresados en porcentaje, se calcularon según la ecuación:

$$\%H = \frac{1/n_{f\text{des}}}{1/n_{f\text{ads}}} \times 100 \quad \text{Ecuación II.5}$$

El porcentaje de desorción se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%D = \frac{C_{S\text{Ads}} 50 - C_{S\text{Des}3^a} 50}{C_{S\text{Ads}} 50} \times 100 \quad \text{Ecuación II.6}$$

II.3.4.3.- Estudios de disipación

El estudio de disipación de los herbicidas se llevó a cabo en tarros de vidrio herméticos que contenían 500 g por duplicado de cada suelo sin enmendar y enmendados con los residuos y se añadió herbicida a las dosis de 1.5 kg ha⁻¹ de MCPA y 1kg ha⁻¹ para S-

metolacloro en una solución de etanol, que produce menor efecto tóxico sobre los organismos presentes en el suelo. 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 y con el fin de distribuir homogéneamente el herbicida en las muestras de suelo. Los suelos se pasaron a los envases con cierres herméticos y se guardaron en oscuridad a 25 ± 1 °C durante todo el experimento. Para controlar que la humedad del suelo a lo largo del estudio no variaba, se controló el peso semanalmente de los tarros durante todo el experimento y en caso de pérdida de humedad se reponía con agua destilada.



Figura II.10. 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 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. Una vez puesto a interactuar el suelo con los extractantes 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 utilizando filtros vidrio de $0.45 \mu\text{m}$ 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 ($t_{1/2}$) (tiempo al cual la cantidad de herbicida inicialmente aplicado se reduce a la mitad del inicial) 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:

$$C = C_0 e^{-kt} \quad \text{Ecuación II.7}$$

La expresión logarítmica de la ecuación es:

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad \text{Ecuación II.8}$$

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

La vida media se calculó utilizando la ecuación:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Ecuación II.9}$$

II.3.4.4.- Estudios de mineralización

Los estudios de mineralización se llevaron a cabo sólo con el herbicida. Se usó C^{14} -MCPA (marcado uniformemente en el anillo bencénico), con actividad específica de 5.55 MBq mg^{-1} . Se determinó su mineralización en el suelo arenoso (S) y los arcillosos T y C, sin enmendar y enmendados con alperujo de Jaén al 5 y 10 %. Para ello se colocaron 25 g por duplicado, en matraces biométricos de 250 ml a los que se añadió la disolución de herbicida marcado con C^{14} para conseguir una radiactividad de $0.05 \mu\text{Ci}$ en 25 g de suelo (unas 4000 dpm g^{-1} de suelo aproximadamente) y también se aplicó el herbicida sin marcar hasta alcanzar una concentración de 1.5 kg ha^{-1} . Una vez esto, se añadió agua destilada al suelo 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 tapó un tapón de goma. El matraz biométrico se pesaba semanalmente para controlar que la humedad permaneciera constante. También semanalmente se retiraba el mililitro de NaOH (1 N), que era reemplazado por uno nuevo mientras que el retirado se mezclaba con 5 ml de líquido de centelleo (LSC), se dejaba durante 24 horas bajo condiciones de oscuridad y por conteo de

centelleo se registraba la radiactividad contenida, correspondiente con la cantidad de herbicida mineralizado.

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. 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. Además, con esta arena de mar también se reducían pérdidas por evaporación de dichas disoluciones.



Figura II.11. Columnas de vidrio empaquetadas a mano con los suelos usados.

Antes de aplicar el herbicida al suelo de las columnas se procedió a determinar el volumen de poro de los suelos originales y enmendados en las columnas de vidrio, es decir, la cantidad de agua que es capaz de retener el suelo bajo 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-metolacoloro. Después de 24 h de la aplicación del herbicida se procedió a aplicar diariamente 10 ml de CaCl_2 0.01 M durante 30 días para MCPA y 50 para S-metolacoloro. El volumen del lixiviado era medido y guardado en una cámara frigorífica (4 °C) hasta el momento de ser analizados por HPLC. Para su análisis por HPLC se filtraron con filtros de vidrio de $0.45 \mu\text{m}$.

Las concentraciones de herbicidas medidas en los lixiviados se representaron frente al volumen aplicado 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 aplicado.

Al final del estudio, se determinó la cantidad de los herbicidas retenidos en el suelo contenido en las columnas. Para ello se extrajo el suelo contenido en las columnas con N_2 y se dividió en 4 fragmentos de 5 cm, correspondiendo con 4 profundidades distintas: 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 en proporción (40:60) (v/v) para MCPA y solución únicamente de metanol para S-metolacoloro. Una vez puesto a interaccionar el suelo con el extractante en un tubo de centrífuga, se dejó agitando durante 24 h y, posteriormente se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 min. El extracto se filtró utilizando vidrio de $0.45 \mu\text{m}$ y se analizó por HPLC la cantidad de herbicida extraído. Esta cantidad constituía el % de herbicida retenido por el suelo de las columnas durante el estudio de lixiviación.

II.3.4.6.- Bioensayo

Para comprobar que la efectividad de los herbicidas MCPA y S-metolacoloro no se veía afectada por la adición de alperujo al suelo y al mismo tiempo comprobar que este residuo no tiene efecto fitotóxico, se llevó a cabo un bioensayo con semillas de *Lepidum sativum* (para MCPA) y *Ray grass* (para S-metolacoloro) en macetas con suelo enmendado y sin enmendar.

Se usaron macetas de 50 cm² y en el fondo se dispusieron 30 g de arena de mar lavada y lana de vidrio para facilitar el drenaje de agua. Una vez se hubieron rellenado las macetas con suelo C, se saturaron con agua y dejaron drenar durante 24 h. Tras eso se colocaron 15 semillas en la superficie del suelo de la maceta para después semienterrarlas con 5 g de suelo. Las macetas se dispusieron en un lugar idóneo para la germinación y se regaron diariamente con agua.

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 (OW) al suelo al 10% (p/p), y macetas con herbicida junto con el alperujo y macetas sin herbicida ni residuo orgánico como controles (C).

II.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.4.1.- Caracterización de Alperujos

II.4.1.1.- Propiedades físico-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 los 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.

	pH	MOT (%) (540 °C)	COS (g l ⁻¹)	N Kjeldahl (%)	CE (mS cm ⁻¹)	H	C	LC	HIX
Alperujo Jaén (AJ)	6.7	81	2.2	1.5	3.1	12.4 ±1.33*	16.5 ±0.66	10.5 ±0.61	9.5
Alperujo Morón (AM)	4.8	91	4.1	1.1	9.1	15.9 ±0.34	23.8 ±0.27	23.5 ±0.31	1.3

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, siendo la cantidad de materia orgánica ligeramente más baja en este último. Este diferente pH de los alperujos 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. Los valores de COS de AM fueron dos veces mayores que para AJ (4.1 frente a 2.2 g l⁻¹). Tanto el contenido en materia orgánica del alperujo, como el contenido en N (ligeramente menor 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 11 alperujos procedentes de distintas localidades de España. Los contenidos en hemicelulosa, celulosa y la lignina, productos finales de la humificación, fueron más altos en el caso del alperujo de Morón, que en el de Jaén. Esto es indicativo

del menor grado de madurez de este alperujo, ya que con el compostaje disminuyen los niveles de lignina y celulosa (Komilis y Ham, 2003; Albuquerque et al., 2009).

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 las aguas del lavado del residuo procedente de Morón 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 en la extracción del aceite de oliva o incluso el agua de riego del cultivo, en el caso de AJ. Los valores de micronutrientes y macronutrientes fueron similares a los encontrados en otros estudios (Albuquerque 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), esto puede ser debido a los tratamientos con sulfato de Cobre que se aplican en ocasiones al cultivo del olivar con el fin de reducir infecciones fúngicas (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 en el proceso de extracción de aceite de oliva (Albuquerque 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.

	Al	Co	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Pb
	(%)							
AJ	213	0.07	3.39	197	0.32	6.00	1.66	5.89
AM	217	<0.1	2.16	57	0.22	2.03	0.682	3.09

	As	Ca	Cd	K	Na	P	S	Zn
	(%)							
AJ	<0.1	3.95	<0.2	1.7	0.032	0.39	0.45	3.00
AM	<0.1	1.06	<0.2	2	0.77	0.37	0.37	2.51

II.4.1.2.- Caracterización MOS

Estudios por espectroscopia de fluorescencia

La caracterización 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 (300-480 nm) a pH del extracto y acidificado a pH2.

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 muestra dos máximos de emisión bien definidos, uno en la región de absorbanza de los 300-360 nm y otra a longitudes de onda mayores de 400 nm, mientras que AJ muestra un único máximo a longitudes de onda mayores a 400 nm. Las diferencias entre los espectros de fluorescencia de los alperujos indica que, aunque los dos residuos contengan similares cantidades de materia orgánica (AJ: 81% y AM: 91%), la MOS, la cual es indicativa de la materia orgánica total (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](#)), mientras que a longitudes de ondas superiores a 400 nm, lo hacen moléculas mayores y más complejas, probablemente aromáticas, típicas del material humificado ([Zsolnay et al., 1999](#); [Cox et al., 2000b](#); [Senesi et al., 1991](#);). Esto es lo que ocurre en el caso del alperujo Jaén y nos sugiere que su MOS se encuentra en un estado de humificación más avanzado que la del alperujo Morón.

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. Estos valores indican que la materia orgánica soluble de AJ, indicativa de la MOT, está más humificada que la de AM. Los valores son, en el caso del alperujo de Jaén, superiores a los HIX de suelos de la zona de las marismas del Guadalquivir y en el caso del alperujo de Morón, inferiores (Cox et al., 2004).

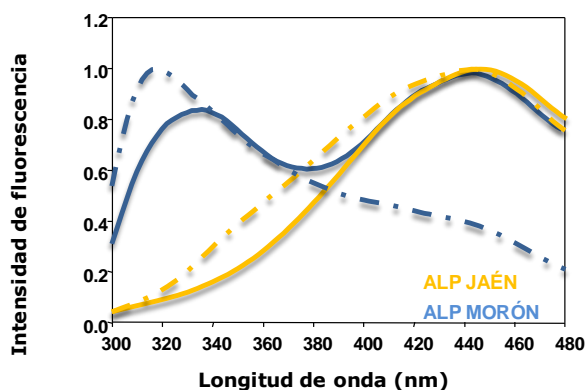


Figura II.12. Espectro de fluorescencia para la MOS de los alperujos de Jaén y Morón a pH de extracto y a pH=2.

De acuerdo con la bibliografía actual (Ewald et al., 1988; Spark y Swift, 1994) se sabe que la fluorescencia de las moléculas está en 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 debido a la repulsión entre cargas negativas, dando lugar a una mayor fluorescencia. Por este motivo hemos acidificado los extractos a pH 2 para eliminar las diferencias debidas al diferente 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 haciendo que las moléculas de MO se “encojan”, produciendo así una menor fluorescencia (Wit et al., 1993; Murphy et al., 1994). En la Figura II.12. Se observa que acidificar los extractos a pH = 2 altera especialmente el espectro de fluorescencia de la MOS de AM (línea punteada), de menor pH (Tabla II.2.). Y además, se observa que el pico a longitudes de onda superiores a 400 nm, desaparece. El diferente comportamiento de la

MOS de los alperujos frente a la acidificación, indica 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. 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. La asignación de bandas a los distintos grupos funcionales se llevó a cabo según [Bellamy \(1975\)](#). Los espectros FT-IR se muestran en la [Figura II.13](#). 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 (COOH) y la banda a 1596 cm^{-1} que corresponde con los grupos carbonilo del ión carboxilato (COO^-) ([Bellamy 1975](#)). Para la enmienda AM, de pH más ácido (Tabla II.2.), el medio contiene más cantidad de protones (H^+) en suspensión, 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 ([Alburquerque et al., 2006](#)).

La humificación constituye un proceso de estabilización y maduración de los compuestos poco transformados que constituyen la materia orgánica de los suelos. Es decir, una conversión de la MO fácilmente degradable, en sustancias húmicas. 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 considera esencial para su eficacia agronómica, medioambiental y valor económico (Senesi y Plaza., 2007). Básicamente, el compostaje no es más que el mismo proceso de degradación y maduración que ocurre en la naturaleza, pero a mayor velocidad, manteniéndose la relación de que cuánto más tiempo de compostaje: 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.

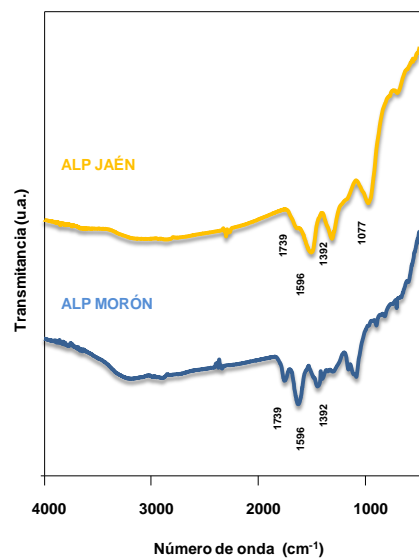


Figura II.13. Espectro de infrarrojos con transformadas de Fourier de la MOS de los alperujos usados.

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 materia orgánica, 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 en sustancias fitotóxicas, como los fenoles, puede tener como efecto negativo la reducción de la vitalidad o productividad de cultivos o contaminar aguas. Por ello, previa aplicación de alperujos u otros residuos

orgánicos, se somete a éstos a tratamientos de compostaje, vermicompostaje y digestiones anaeróbicas o aeróbicas.

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 (S, S5J, S10, C5J, C10J, T5J y T10J), y Morón (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M, 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 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, T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M, C10M, T5M, T10M).

Suelo	Cultivo	Arcilla	Limo (%)	Arena	Fe (%)	pH (1:2) (agua)	CO (%)	COS (mg l ⁻¹)	N Kjeldahl (%)	CE (mS cm ⁻¹)
S	Trigo*	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	Algodón* girasol** remolacha* *	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	0.244
C10M						7.22	3.89	31.1	0.338	1.39
T	Cítricos*	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 al recolectarse el suelo; **cultivos años previos a la recolección del suelo; ^error estándar

Los valores iniciales de pH de los tres suelos (S, C, T) de naturaleza ligeramente alcalina, fueron similares entre sí (8.3, 8.15 and 8.4), produciéndose un descenso del pH tras enmendar con los alperujos, (Tabla II.4.). Este descenso de pH es debido al menor pH ácido de las enmiendas y corrobora previos estudios de adición de residuos de almazara al suelo donde se reducía el pH al enmendar (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 de Jaén, así como con el alperujo de Morón. 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 contenido en CO, fue similar entre sí y superior que para S, de menor CO (Tabla II.4). El COS se vio incrementado al enmendar en los tres suelos estudiados debido al alto contenido en COS de las enmiendas (Tabla II.2.). Cabe destacar el aumento del contenido en N de los suelos, siendo el incremento más significativo para el suelo arenoso, que inicialmente contenía muy poco N (0.049%), mientras que el valor más alto se halló para el suelo C10J (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 proporciona al mismo tiempo ventajas e inconvenientes. Entre las ventajas se encuentran el aumento de nutrientes como K, N y contenido en CO (Alburquerque et al., 2004; 2009). En estos estudios también se ha mostrado que en ocasiones, la adición de alperujo puede tener como inconveniente el incremento del contenido en sales, y con ello, la conductividad eléctrica (CE) de los suelos (Alburquerque et al., 2004). Esto está de acuerdo con nuestros resultados, que mostraron un aumento más intenso en el suelo arenoso (Tabla II.4.).

El estudio mineralógico de los suelos reveló predominancia de la presencia de arcillas Ilíticas, respecto a la Motmorillonita y la Caolita (Tabla II.5.). Llama la atención la diferente mineralogía de los suelos arcillosos C y T, el primero con casi un 30 % de arcillas expansivas mientras que T tiene prácticamente un 90 % de ilita.

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		
	Montmorillonita-Ilita-Caolita		
S	34	46	20
C	27	56	17
T	0	88	12

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). De entre las técnicas que determinan la superficie de poro de los suelos, la Porosimetría de mercurio se considera generalmente como el mejor método existente 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 de los suelos sin enmendar y enmendados con los dos alperujos se muestran en la Figura II.4. y en la Tabla II.6.

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 usados 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, T10M).

Rango (μm)	S	S5J	S10J	S5M	S10M	C	C5J	C10J	C5M	C10M	T	T5J	T10J	T5M	T10M
>100	45.5	62.1	50.5	60.1	67.2	68.8	66	52.3	71.9	48.6	30.5	42.8	49.6	42.9	44.3
100-1	119	165	151	156	127	47.8	91.8	72.3	84.9	65.2	79.9	126	85.7	117	141
10-1	36.6	32.4	51.7	30.3	45.2	18.5	48.6	25.4	31.7	34.9	50.1	60.9	56	60.1	56.8
1-0.1	8.13	9.42	11.9	9.4	196	8.40	17.7	7.93	11.6	9.34	21.6	25.5	26.9	23.1	23.1
< 0.1	0.407	0.781	1.12	0.84	0.833	49.7	38.7	46.4	46.7	60.1	33.5	31.7	32.6	30.4	32.3
VT	210	270	266	257	250	193	263	204	240	204	215	287	251	274	298

El suelo S, de alto contenido en arena (76%), mostró una distribución de tamaño de poro (Figura II.4., diagrama de barras verticales) con un máximo relativo de volumen de poro entre 1-100 μm , 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.4.). Por el contrario, los suelos arcillosos C y T (con un contenido en arcilla de 58% y 48%, respectivamente) mostraron además de

alto volumen de poro en la zona de macroporos, un máximo alrededor de $0.01 \mu\text{m}$, poros de menor tamaño, más frecuentes en suelos arcillosos. Tras enmendar los tres suelos con los alperujos, se observó un aumento en el volumen de poro total (Línea continua en [Figura II.4.](#) y [Tabla II.6.](#)). Este aumento es debido a un incremento del volumen de poro en el rango comprendido entre 10 y $100 \mu\text{m}$, 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 $1-10\mu\text{m}$ ([Tabla II.6.](#)). Estas diferencias en porosidad entre los selos arcillosos puede 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 alperujo, provocaba un aumento en el volumen de poros con un radio aproximado de $10\mu\text{m}$. 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 ($10-100\mu\text{m}$). Dicho aumento se atribuyó a una menor interacción con las partículas de suelo que con otro tipo de enmienda también estudiadas, 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 total del volumen de poro 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 and Oades, 1982](#)). Este hecho ha sido observado con anterioridad en suelos que se regaron durante tres años consecutivos con alpechín, un residuo líquido de la producción del aceite de oliva, con un alto contenido en COS ([Cox et al., 1997](#)).

Además de la porosidad se ha visto, que otros parámetros físicos del suelo pueden ser modificados al enmendarse con residuos de almazara. [Kavdir and Killi. \(2008\)](#) encontraron que la adición de un residuo sólido de almazara al 8% a suelos agrícolas modificó la estabilidad de los agregados del suelo, la cual aumentó tras dos meses de incubación en presencia de la enmienda.

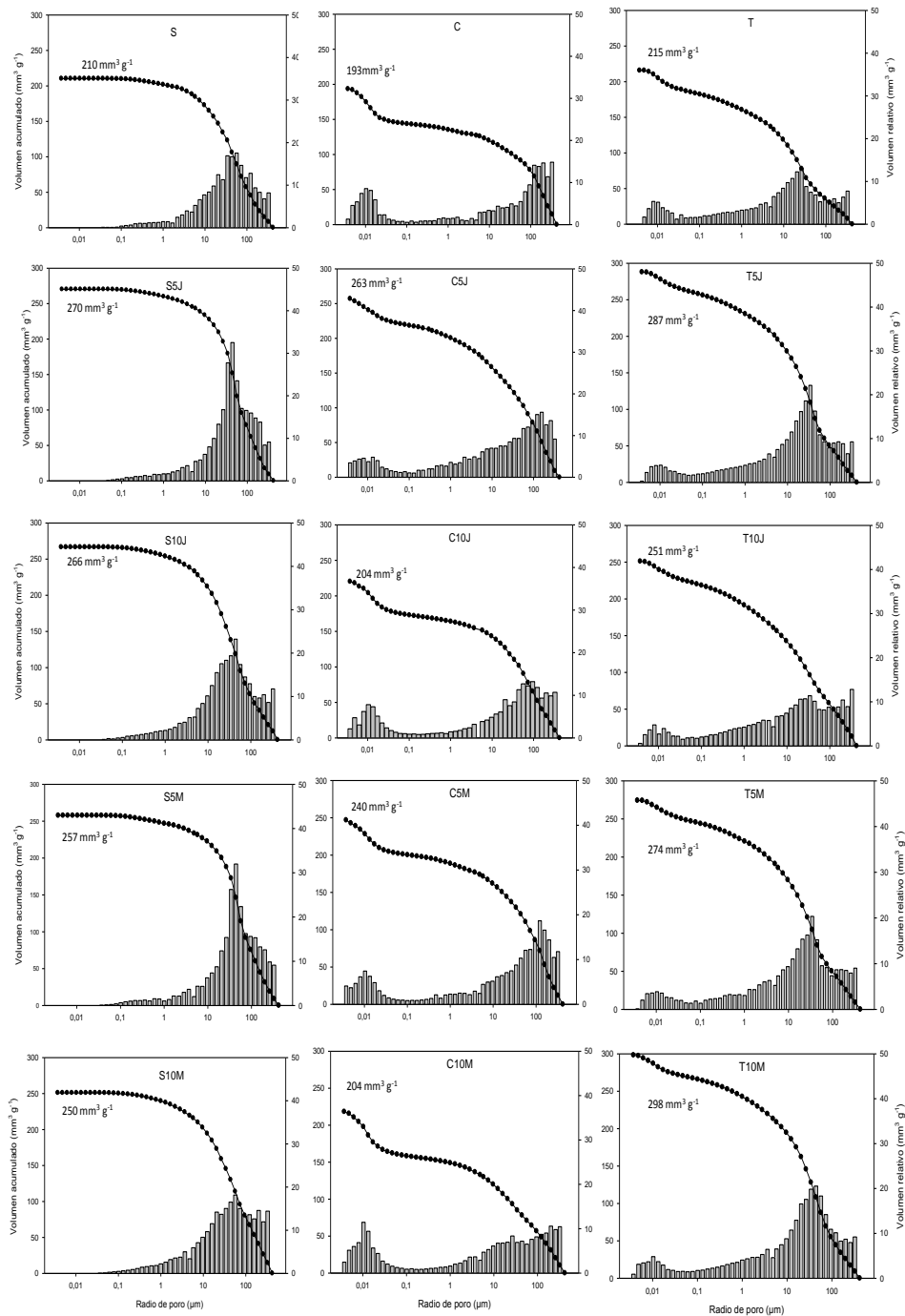


Figura II.14. Distribución del tamaño de poro obtenido por Intrusión de mercurio de los suelos S, C y T, sin enmendar y enmendados al 5 y 10% con AM y AM.

II.4.2.1.- Respiración basal

La producción de CO₂ está directamente relacionada con la fracción viva y activa de los suelos (Badaluco et al., (2010), ya que es resultado de la respiración de estos los organismos vivos. Para los estudios de respiración basal se seleccionaron los suelos C y T, de mayor contenido en MO, sin enmendar y enmendados al 5% y 10% con el alperujo de Jaén (AJ). En la Figura II.15 se muestran los mg de CO₂ producidos por los microorganismos presentes en los suelos durante 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 (Figura II.15.). Por el contrario, la cantidad de CO₂ producida es mayor.

La materia orgánica soluble 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 CO, que constituye la fuente de C más fácilmente disponible para los organismos del suelo (Qualls et al., 2005). La adición de alperujo al suelo aumentó el contenido de COS y por tanto de carbono lábil para los microorganismos del suelo, explicando la mayor respiración en éstos.

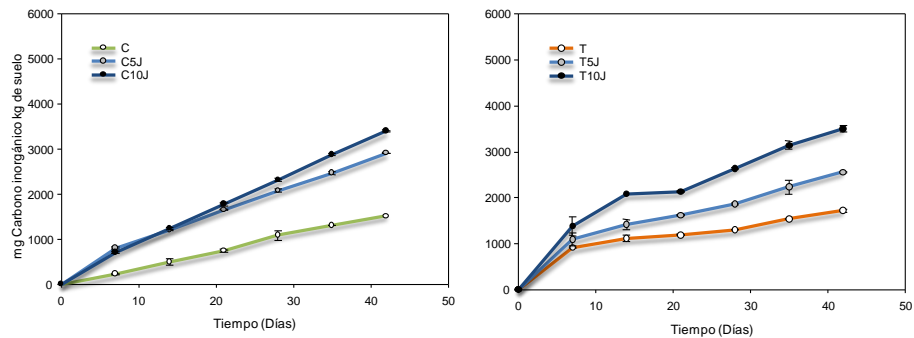


Figura II.15. Producción de CO₂ por los microorganismos presentes en un kg de suelo C y T sin enmendar y enmendados con AJ a las dosis de 5% (p/p) (S5J, C5J y T5J) y 10% (p/p) (S10J, C10J y T10J).

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 alperujo y no se obtuvieron diferencias significativas en la adsorción de MCPA respecto al suelo sin enmendar, por lo que los ensayos realizados con este herbicida se realizaron sólo con 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 de Jaén y de Morón (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, la cual 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.4](#)), 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) ($R^2=0.097$) Los coeficientes K_f nos 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.

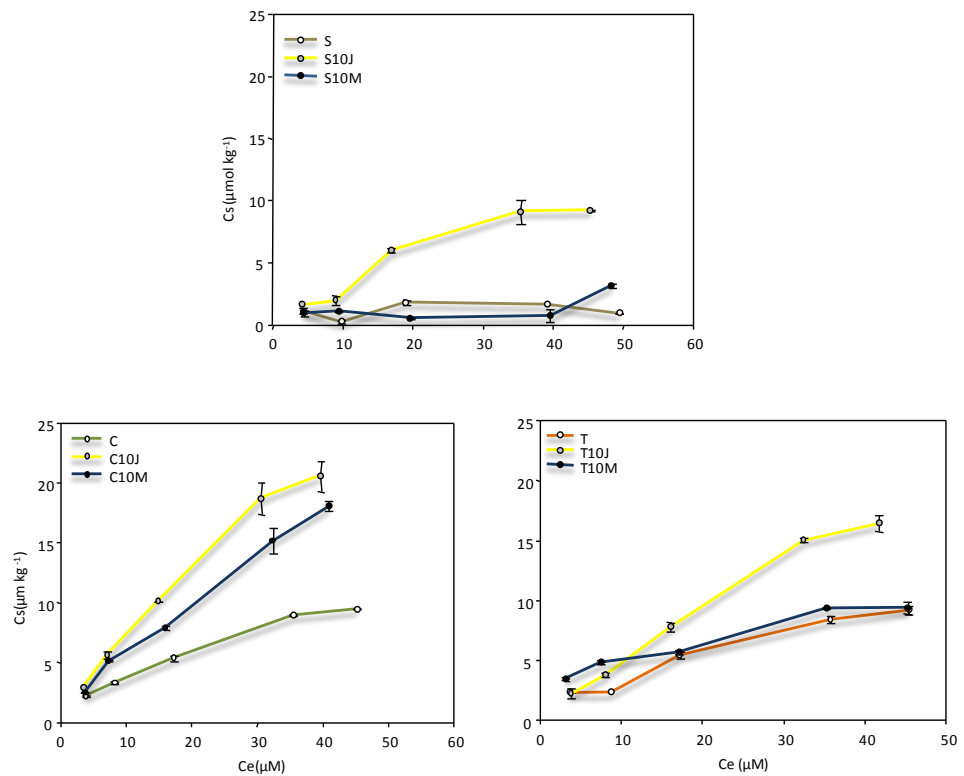


Figura II.16. Isothermas de adsorción de MCPA en los suelos S (arriba), C y T (abajo) sin enmendar y enmendados con AJ o AM al 10% (p/p) (S, S10J, S10M, C, C10J, C10M, T, T10J, T10M).

Los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados muestran poca adsorción de MCPA, presentando valores de $K_{f_{ads}}$ entre 0.440 y 1.12. Esto coincide con los resultados obtenidos por [Hiller, \(2009\)](#) en un estudio de adsorción de MCPA 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 MCPA, la cual se veía aumentada en los casos de menores pH y elevado contenido en CO.

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, T10J) y con AM (S10M, C10M, T10M).

	R^2_{ads}	Kf_{ads}	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 3.07 (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 (Hamarker y Thompson, 1972, Hiller et al., 2008; Paszko, 2009). El comportamiento en suelos de los ácidos fenoxiacéticos, como MCPA, está gobernado por su estructura química. El grupo carboxilo (COOH) es el principalmente responsable de su relativa actividad química y de las interacciones con las superficies minerales. A pH habituales en 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 3 suelos. Por otro lado, el hecho de que los suelos estudiados 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 la adsorción de MCPA, excepto para el suelo S enmendado con AJ, que mostró más del doble de adsorción respecto al suelo sin enmendar (1.12 frente a 0.440). En el caso del suelo T, no se observan diferencias significativas (T10J y T10M) en los suelos enmendados

respecto al original (Tabla II.7.). [Haberhauer et al. \(2001\)](#) revelaron que un aumento en el contenido en carbono del suelo no implicaba necesariamente un aumento en la adsorción de MCPA y que el número de sitios de adsorción para este herbicida y el contenido en materia orgánica del suelo 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 ([REF tomlin?](#)), cuando en la mayoría de los suelos agrícolas mediterráneos, con valores de MO entre 1 y 5%, MCPA, los valores de K_d están entre $0.6\text{-}1 \text{ l g}^{-1}$, coincidiendo con nuestros resultados.

Debido a que los coeficientes n_f de las isothermas no son iguales, 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_{d25}) (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.

Los valores de K_{d25} revelaron mayor adsorción de MCPA en los suelos C y T sin enmendar. Estos suelos presentaban mayor contenido en CO, arcilla, componentes coloidales del suelo, con gran 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 materia orgánica de estos residuos y no a su cantidad. Como se ha visto en el apartado 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 materia orgánica de AJ está más humificada, y por tanto posee mayor capacidad de adsorción, que la de AM ([Bolan et al, 2011](#)).

II.4.3.2.- Estudios de desorción

En la [Figura II.7](#) se han representado las isothermas 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](#). Esta tabla muestra 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 inferiores a $R^2=0.6$.

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 10% (p/p) con AJ (S10J, C10J, T10J) y con AM (S10M, C10M, T10M).

	R^2_{des}	Kf_{des}	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(2.77/0.461)	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 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, que también 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 teniendo en cuenta el coeficiente de ajuste tan bajo, 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 con alperujo aumenta la adsorción de MCPA, ésta es más reversible ([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.

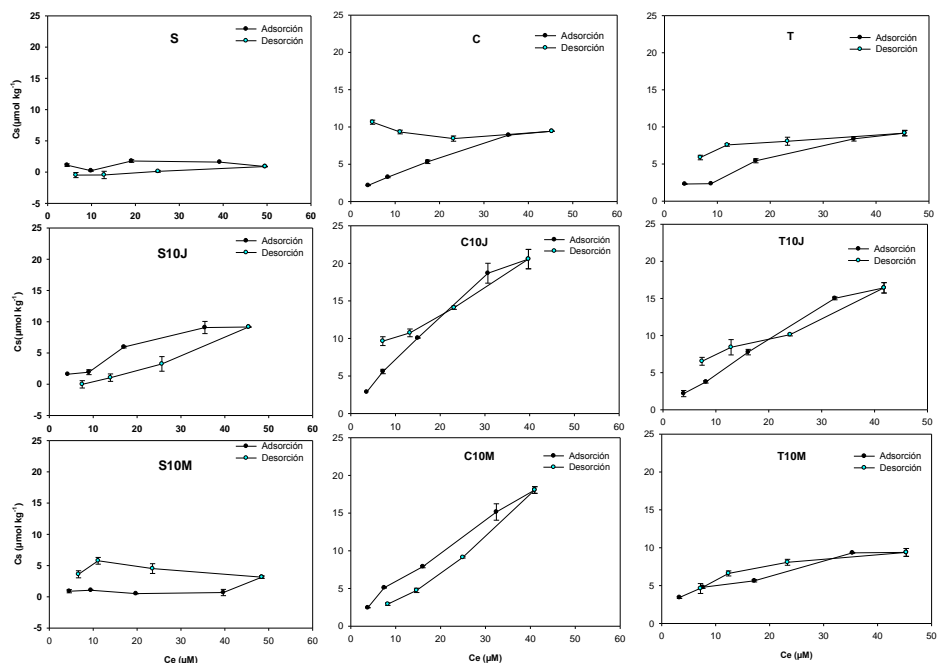


Figura II.17. Isothermas de adsorción-desorción (puntos negros y azules, respectivamente) de MCPA en los suelos S (columna figuras izquierda), C (columna del centro) y T (columna derecha) sin enmendar y enmendados con AJ o AM al 10% (p/p) (S, S10J, S10M, C, C10J, C10M, T, T10J, T10M)

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 y/o degradación microbiológica en la solución del suelo. Aunque se sabe que los herbicidas fenoxiácidos como 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 UV ([Crespín., 2001](#)).

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.10, según descrito en el apartado II.3.4.3. en materiales y métodos.

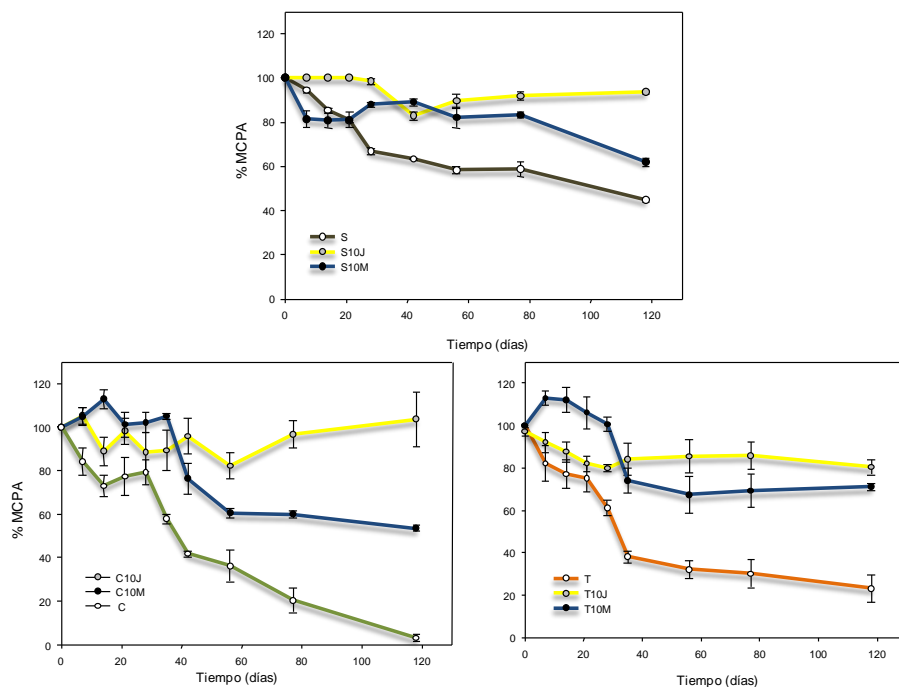


Figura II.18. Curvas de disipación de MCPA en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados con AJ y AM a la dosis del 10% (p/p) (S10J, C10J, T10J, S10M, C10M y T10M).

Cuando se comparan los tres suelos sin enmendar, Las vidas medias de los suelos fueron menores en los suelos con mayor contenido en CO (C y T) (**Tabla II.7.**), que se explica por una mayor actividad biológica en estos suelos, consecuencia de un mayor CO, que favorece la degradación del herbicida mediante procesos bióticos. Esto se ha observado en numerosos estudios con diversos plaguicidas ([Walker y Welch., 1989](#); [Nair y Schnoor., 1994](#), [Cox et al., 1999](#) *meter alguna referencia más reciente*) y corrobora los resultados obtenidos por [Juhler et al. \(2008\)](#), los cuales indican que la degradación de MCPA sobre todo en los horizontes superficiales, está directamente relacionada con la

microbiología del suelo y el contenido en CO. Este mayor contenido en CO de los suelos sin enmendar parece tener más importancia en la degradación de MCPA que el efecto protector debido a la mayor adsorción del herbicida en estos suelos (Tabla II.5.).

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

SUELO S	S	S10J	S10M	T	T10J	T10M	C	C10J	C10M
$T_{1/2}$	105 (121/93.6)	-	274 (410/205)	31 (25/40)	-	149 (209/116)	23.3 (26.9/20.6)	-	110 (153/85.8)
R^2	0.901	0.24 9	0.564	0.788	0.32 6	0.631	0.935	0.05 6	0.758

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

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

Por el contrario, la adición de los alperujos, a pesar de aumentar el CO del suelo, aumentó la persistencia de MCPA en los suelos enmendados. Las curvas de disipación no se ajustan 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 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., 2000b), pero también puede ser debido a que los microorganismos del suelo prefieran utilizar esta materia orgánica (alperujo) como fuente de carbono, en lugar de degradar el herbicida presente en la disolución del suelo, aumentando su persistencia. La MOS del alperujo parec ser una fuente de C más fácilmente accesible a los microorganismos del suelo.

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% se presentan en la [Figura II.19](#). 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 menor mineralización de MCPA pudo ser debido a que la enmienda aporta carbono orgánico que resulta más fácilmente accesible para los organismos del suelo que la fuente de carbono que constituye el herbicida, lo que reduce la mineralización del mismo. Esto coincide con los resultados de [Albarrán et al., \(2003\)](#) y [Cabrera et al., \(2008\)](#), en sus estudios de mineralización de herbicidas del grupo de las triazinas en suelos enmendados con alperujo.

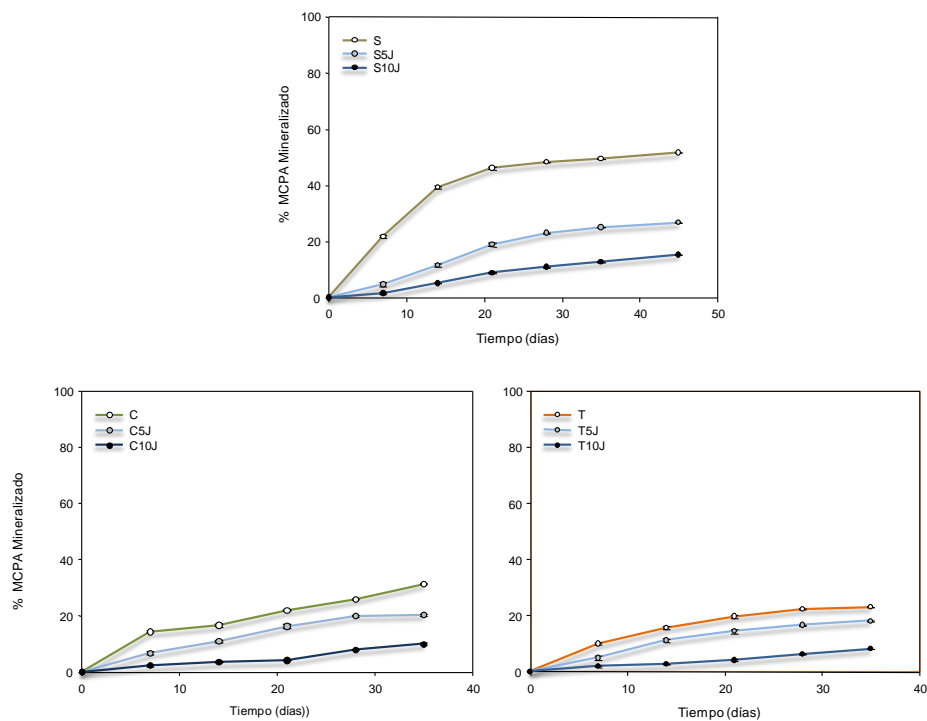


Figura II.19. Curvas de mineralización de MCPA en suelos.

II.4.3.5.- Estudios de lixiviación

Las curvas de elución relativas y acumuladas de MCPA en los suelos sin enmendar y enmendados al 10% (p/p) con AJ y AM, se presentan en la [Figura II.20](#). Los

porcentajes totales de herbicida se muestran en la [Figura II.20](#), junto a las curvas acumuladas.

La posición del máximo relativo de las curvas se encuentra cerca de la unidad de volumen de poro ([Figura II.20.](#)), lo que era característico de sistemas de baja adsorción y compuestos altamente móviles ([Beck et al., 1993](#)). Y 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 los suelos enmendados ([Figura II.20](#)), reflejando que la adición de AJ y AM retienen MCPA al aumentar adsorción y retrasar con ello la lixiviación en el sistema dinámico que constituye el perfil de la columna del suelo. La asimetría de las curvas de elución, especialmente en los suelos enmendados, se debe a que no se alcanza el equilibrio en la adsorción 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 y retrasando el proceso de lixiviación.

Las cantidades máximas lixiviadas de los suelos sin enmendar como enmendados fueron menores en el suelo C, suelo que mostró los mayores $K_{f_{ads}}$, a pesar de que su contenido en CO era menor que el de T. Este suelo tiene un alto contenido en arcilla (58 %) y un alto contenido en montmorillonita, a diferencia del otro suelo arcilloso (T) ([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 ([Pignatello y Xing, 1996](#)).

Salvo en el suelo T, los porcentajes de MCPA eluidos (curvas de elución acumuladas, [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, como han puesto de manifiesto los estudios de disipación. En el suelo T, si bien MCPA empieza a lixiviar antes en el suelo sin enmendar y el máximo tiene lugar a menor volumen de poro ([Figura II.10](#)), las cantidades lixiviadas son similares en el suelo enmendado con AM a las del suelo sin

enmendar y mucho menores en el suelo enmendado con AJ, a pesar de la mayor persistencia de MCPA en ambos suelos enmendados. Por el contrario, están de acuerdo con la mayor adsorción de MCPA en suelos enmendados, especialmente en el suelo enmendado con AJ. En este caso, hay un predominio de los procesos de adsorción frente a los de degradación. En el suelo arcilloso C, debido a su mayor contenido en montmorillonita, existe un mayor tiempo de contacto 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 obtenidos 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 restante en el suelo de las columnas empaquetadas a mano según la metodología descrita en el apartado II.3.4.3. La columna de suelo extraída se dividió en 4 fragmentos correspondiendo a 4 profundidades de suelo (0-5,5-10,10-15 y 15-20 cm). No se detectó MCPA en ninguno de los fragmentos de ningún suelo, 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. Se sabe que el COS constituye la fracción de Carbono lábil, que actúa como sustrato fácilmente metabolizado por los microorganismos, así como reservorio a corto plazo de nutrientes para plantas [Romero, 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.

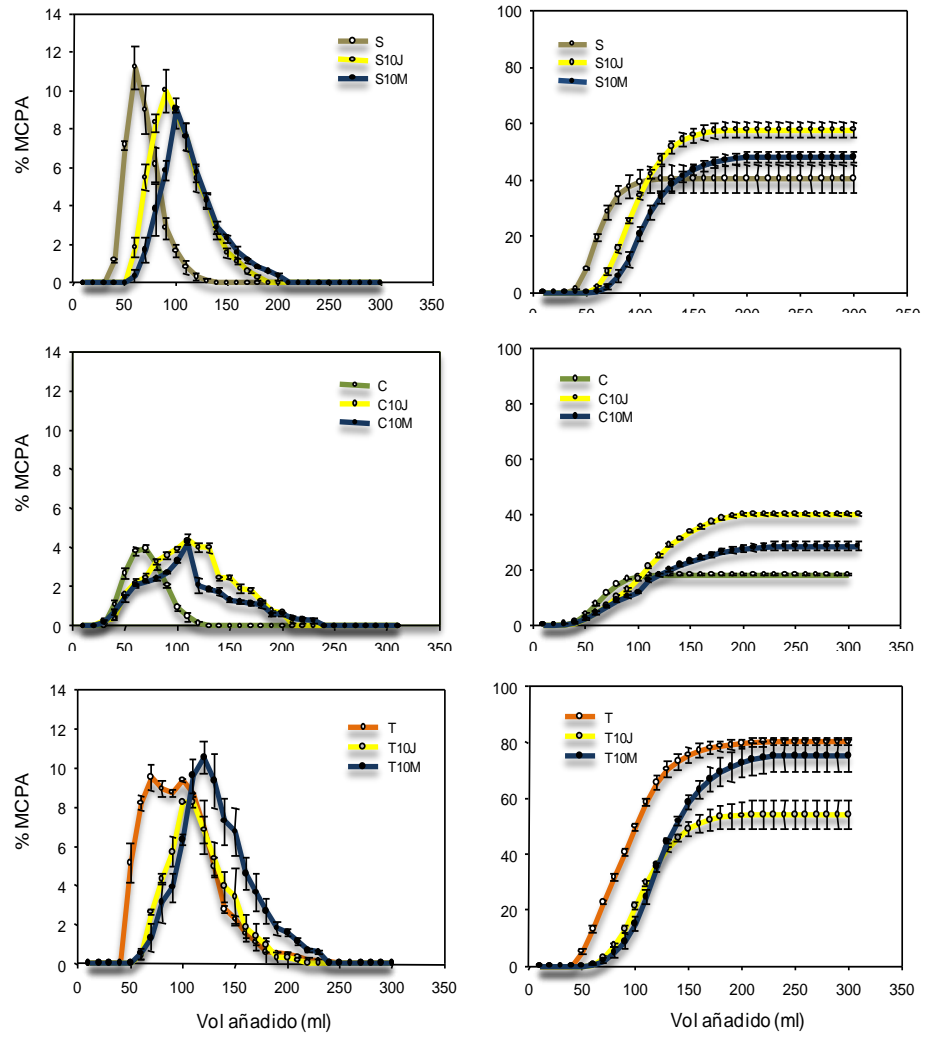


Figura II.20. Curvas de elución relativa (izquierda) y acumulada (derecha) de MCPA en los suelos sin enmendar y enmendados con AJ y AM al 10% (p/p).

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 *Lepidum sativum* L., una planta sensible a la acción de MCPA.

En la Figura II.21. se muestra la biomasa recogida de la planta al finalizar el experimento y en la Figura II.22. se muestra el estado de crecimiento *Lepidum sativum* L. 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), tras 20 días de experimento. El suelo que se seleccionó para estos estudios fue el suelo C y el alperujo AJ, ya que los mayores coeficientes de adsorción se encontraron para C10J (Tabla II.7.).

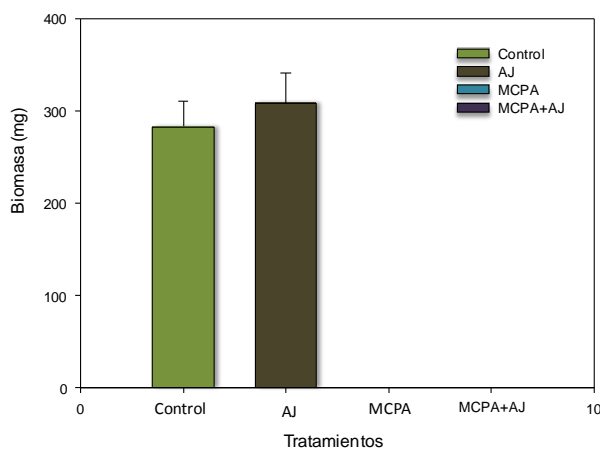


Figura II.21. Histograma de biomasa recolectada tras el estudio de bioensayo con las macetas de *Lepidum sativum* tratadas con alperujo, con MCPA, por separado y en combinación y en macetas sin tratar (control).

En las macetas de tratamiento MCPA, no se encontró germinación de las semillas tras 20 días de estudio, confirmando la eficiencia de MCPA hacia ésta especie (Figuras II.21 y II.22). La mayor adsorción de MCPA en los suelos enmendados con AJ indica que el herbicida se encuentra más retenido por las partículas del suelo, sin embargo, como se puede ver en la Figura II.22, ésta mayor adsorción no afecta a su capacidad de actuar sobre la germinación de *Lepidum sativum* L., cuyas semillas no germinan en las macetas que fueron tratadas MCPA y AJ (MCPA +AJ). 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 estructura, contenido de CO y actividad microbiológica.



Figura II.22. Resultados del bioensayo con *Lepidum sativum* L. Efecto de la adición de alperujo sobre la fitotoxicidad de MCPA.

II.4.4.- Estudios con S-metolacoloro

Los estudios de adsorción-desorción, lixiviación y disipación con S-metolacoloro se realizaron, tal y como la metodología 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) como se hizo con MCPA, y además al 5% (p/p) de enmienda.

II.4.4.1.- Estudios de adsorción

Las isotermas de adsorción de S-metolacoloro en los suelos estudiados se muestran en la [Figura II.23](#), donde se representa gráficamente la cantidad de S-metolacoloro adsorbida (C_s , $\mu\text{mol kg}^{-1}$) frente a las distintas concentraciones de equilibrio (C_e , μM). Los correspondientes parámetros de adsorción se reflejan en la [Tabla II.10](#), tras ajustar las isotermas a la ecuación de Freundlich (Ecuación II.4.). 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-metolacoloro en las isotermas de adsorción (5, 10, 20, 40 y $50\mu\text{M}$).

A diferencia de MCPA, la mayoría de las isotermas son tipo C ($n_f \sim 1$). Esto indica que, en el rango de concentraciones estudiadas, la adsorción no se ve afectada por la concentración del herbicida. Los suelos sin enmendar mostraron baja capacidad de adsorción de S-metolacoloro, aunque mayor que para MCPA ([Tablas II.7 y II.10](#)). No se encontraron diferencias significativas en la adsorción entre los suelos S y C, mientras que el suelo T mostró ligeramente una mayor adsorción. Los valores de K_{d10} para S-metolacoloro no mostraron diferencias significativas en estos suelos sin enmendar ([Tabla II.10](#)).

Los suelos enmendados mostraron un aumento claro en la adsorción de S-metolacoloro a diferencia de lo encontrado con MCPA. S-metolacoloro es un herbicida cuya capacidad de adsorción a los suelos se afecta en general, por la presencia 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 metolacoloro y con S-metolacoloro ([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, T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M C10M, T5M, T10M).

	R^2_{ads}	Kf_{ads}	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±1.3
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±2.2
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(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

Este aumento es más intenso a dosis más altas de alperujo, revelando que en estos suelos el componente orgánico es más importante para la adsorción de S-metolacloro en este proceso, que el componente inorgánico. El estudio de [Weber et al. \(2003\)](#), donde se compara la adsorción y movilidad del producto racémico metolacloro en 5 suelos procedentes del sur de Inglaterra, revela más alta correlación de estos componentes orgánicos del suelo con la adsorción de metolacloro respecto a los componentes inorgánicos.

La valores más altos de adsorción se dan al enmendar con AJ, alperujo de mayor índice de humificación, al 10% (p/p) en el suelo arenoso, mientras que fue la adición del alperujo de Morón la que más aumentó la adsorción en C y T ([Tabla II.10.](#)). Sin embargo, 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 y 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., 2000b), también puede influir en las diferencias en la adsorción.

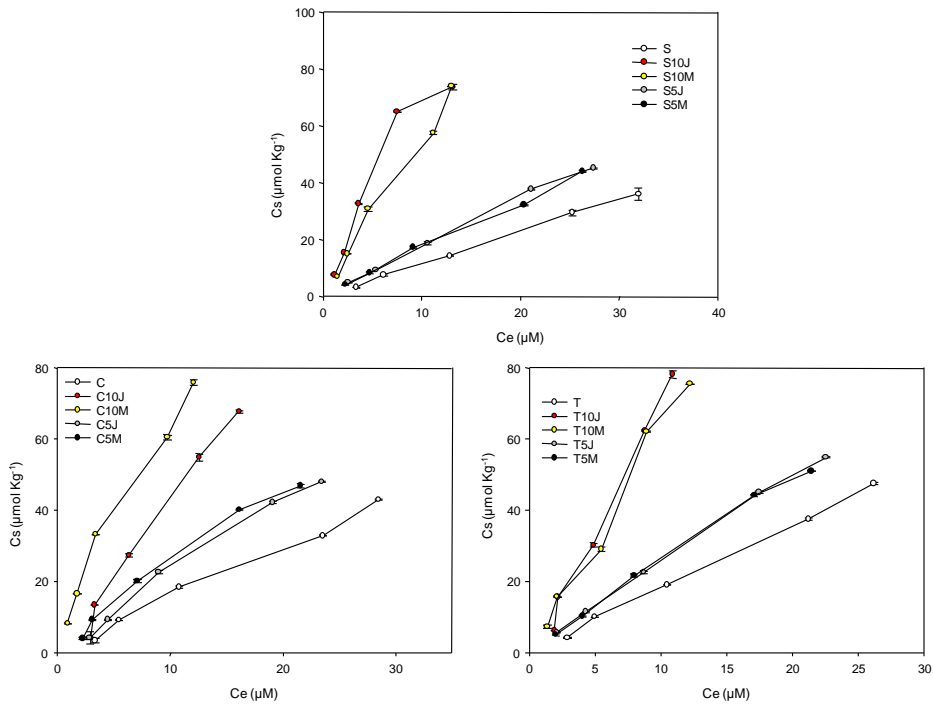


Figura II.23. Isothermas de adsorción de S-metolachloro en los suelos S (arriba), C y T (abajo) sin enmendar y enmendados con AJ o AM al 5% y 10% (p/p) (S, S5J, S10J, S5M, S10M, C, C5J, C10J, C5M, C10M, T, T5J, T10J, T5M, T10M).

II.4.4.2.- Estudios de desorción

En la [Figura II.24.](#) se han representado las isoterms de adsorción-desorción de S-metolaclopro 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.](#)

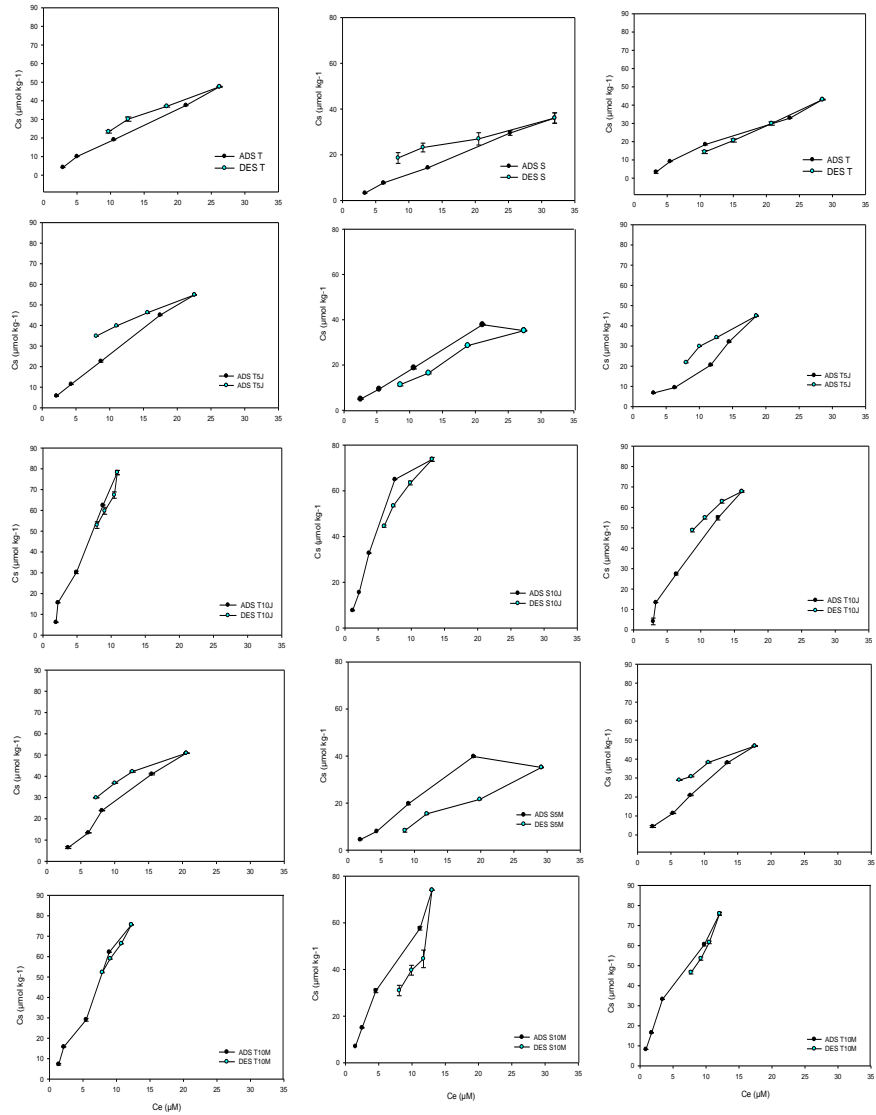


Figura II.24. Isotherms de adsorción y desorción de S-metolaclopro en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados al 5% y 10% con AJ y AM.

Esta tabla muestra que en general, el ajuste de la ecuación de Freundlich es mejor que el obtenido para el herbicida MCPA (Tabla II.6.). La desorción de S-metolacloro de los suelos no es reversible para los suelos S y T, que mostraron coeficientes de adsorción n_{fads} mayores que los n_{fdes} lo cual es indicativo de fenómenos de histéresis (Seybold y Merseil, 1996), mostrando coeficientes de histéresis mayores en los suelos enmendados respecto a los sin enmendar. 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 valores de 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 a los suelos no favorece la desorción de S-metolacloro hacia la solución del suelo.

Tabla II.11. Coeficientes de desorción de Freundlich, el porcentaje de desorción (D), y el coeficiente de histéresis (H) para S-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, T10J) y con AM (S5M, S10M, C5M C10M, T5M, T10M)

	R^2_{des}	Kf_{des}	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
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

II.4.4.3.- Estudios de disipación

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

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 MCPA, S-metolacloro mostró menor persistencia en los tres suelos estudiados sin enmendar, ([Fig.II.15](#)). La baja capacidad de adsorción de estos suelos sin enmendar favorece que el herbicida en solución se encuentre más disponible para los procesos de degradación. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la vida media del herbicida entre los 3 suelos sin enmendar. Los tres suelos mostraron vidas medias similares a las encontradas en los estudios de [O'Connell et al. \(1998\)](#) y 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 No fue posible calcular las vidas medias de S-metolacloro en los suelos S10M, T10M, C10J y C10M, ya que su disipación no se ajustaba a la cinética de primer orden ([Tabla II.12](#)). Por el contrario a MCPA, no se observan diferencias significativas en la persistencia de s-metolacloro entre los dos tipos de enmienda.

Tabla II.12. Vida media ($T_{1/2}$) y coeficientes de ajuste a una cinética de primer orden para S-metolaclo en los tres suelos estudiados, sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S10J, S5J, C10J, C5J T10J) y con AM (S10M, S5M, C10M, C5M, T10M).

	S	S5J	S10J	S5M	S10M	T	T5J	T10J	T5M	T10M	C	C5J	C10J	C5M	C10M
T_1	31	67	149	71	-	19	39	47	158	-	21	41	-	58	-
$T_{1/2}$	(24/ 39)	(59/ 76)	(128/ 162)	(62/ 89)	-	(11/ 29)	(29/ 46)	(38/ 59)	(112/ 187)	-	(16/ 32)	(36/ 48)	-	(42/ 71)	-
R^2	0.988	0.979	0.797	0.911	0.799	0.948	0.978	0.968	0.766	0.568	0.986	0.991	0.679	0.989	0.599

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

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

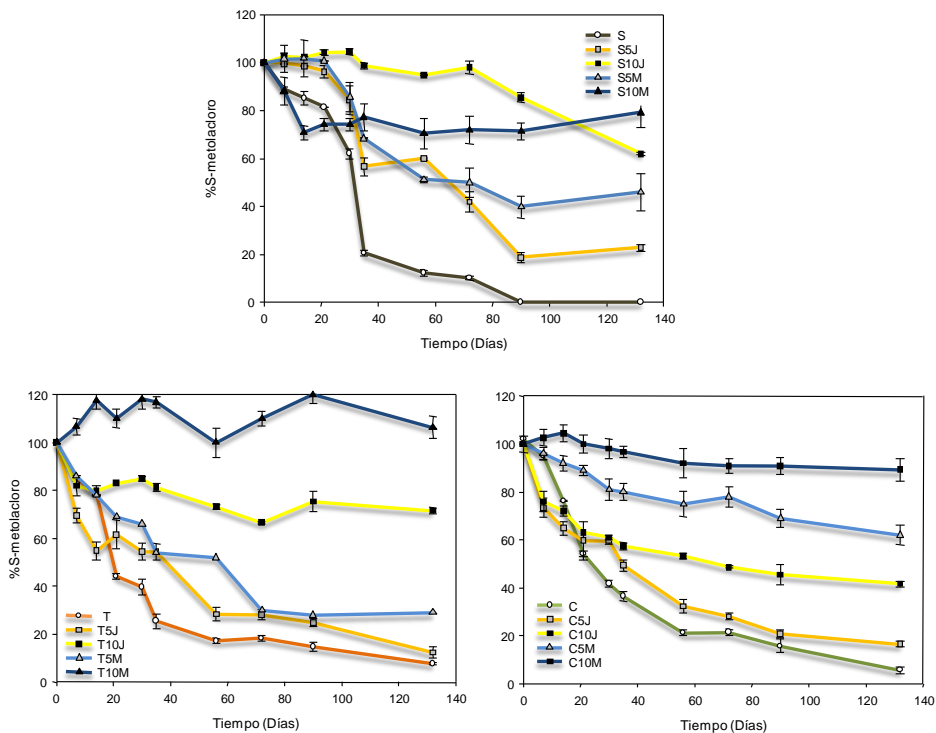


Figura II.25. Curvas de disipación de S-metolaclo en los suelos S, C y T sin enmendar y enmendados con AJ y AM a la dosis del 5% y 10% (p/p) AJ (S10J, S5J, C10J, C5J T10J) y con AM (S10M, S5M, C10M, C5M, T10M).

II.4.4.4.- Estudios de lixiviación

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

Las curvas de lixiviación relativas para S-metolaclo-ro corroboran que la retención del mismo por los suelos es más intensa que la encontrada para el herbicida aniónico MCPA, tanto en los suelos sin enmendar, como en los enmendados (Figuras II.10 y II.26.). En caso de los suelos sin enmendar, las diferencias entre el suelo S y los suelos C y T son mucho mayores que para MCPA. Esto es debido al mayor contenido en materia orgánica y arcilla. componentes determinante en la adsorción de este herbicida en suelos (Shaner et al., 2006). La incorporación de la MO de la enmienda potenció esta retención, como revelan las curvas de elución de los suelos emendados (Figura II.26).

La curva de elución de S-metolaclo-ro en el suelo arenoso (S) es más simétrica que la de los suelos C y T, mostrando un máximo relativo mucho mayor (Figura II.26). Esto se puede explicar por la menor capacidad de adsorción de S-metolaclo-ro que se encontró en este suelo, por tanto menor retención del herbicida, respecto a los otros dos suelos (Figura II.26).

La adición de alperujo a los suelos retrasó de la lixiviación de S-metolaclo-ro respecto a los suelos originales, siendo el efecto mucho más intenso para los suelos C y T, que mostraron muy reducidos máximos relativos y similares entre sí, Sin embargo T5J que no mostró diferencias significativas en los valores de Kfads con el suelo T5M, mostró, lixiviación aunque reducida, revelando la diferente capacidad de interaccionar con el herbicida de la MO de los dos alperujos (Figura II.26).

Al contrario de lo encontrado para MCPA en los suelos S y C, con menores porcentajes acumulados en los lixiviados de los suelos sin enmendar, respecto a los enmendados, lo que se atribuyó a la menor adsorción del herbicida en estos sistemas y por ello, una mayor exposición a fenómenos de disipación, (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 S.

Los procesos de lixiviación se pueden ver afectados por diversos factores, entre ellos la naturaleza del herbicida, la presencia y calidad del CO o del COS y la porosidad del

suelo, como factores más determinantes. Los resultados del estudio de lixiviación con S-metolacloro revelan que el factor más determinante en la retención y lixiviación de este herbicida lo constituyó el contenido en CO, y no la porosidad del suelo, ya que el aumento de volumen de poro obtenido al enmendar los suelos (Tabla II.5 y Figura II.4) no se tradujo en un aumento en la lixiviación, sino que al contrario, S-metolacloro se retenía fuertemente reduciendo la lixiviación e incluso a veces, impidiéndola por completo, como ocurre en los suelos C10M, T5M y T10M.

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

Por el contrario de lo observado con MCPA, S-metolacloro sí se encontró herbicida retenido en las columnas de suelo (Figura II.27). La alta capacidad de adsorción de S-metolacloro por los suelos, sobre todo, los enmendados y se tradujo en una gran presencia del herbicida en los extractos de estos suelos, que no fue degradado durante los 50 días de estudio. En el suelo con menor capacidad de retención y menor persistencia (S), no se extrajo herbicida (Figura II.27.). Los suelos S enmendados retuvieron más herbicida cuanto más capacidad de adsorción presentaban, es decir, más en los suelos enmendados al 10% con AJ y AM (Figura y Tabla II.12). Del suelo C10M tampoco se extrajo herbicida (Figura II.27.) lo que se puede atribuir a su alta adsorción. Sin embargo, al enmendar al 5%, que la adsorción es menos intensa (Tabla II.12), se recuperó un 8 y 20% de herbicida en los suelos enmendados con AJ y AM, respectivamente.

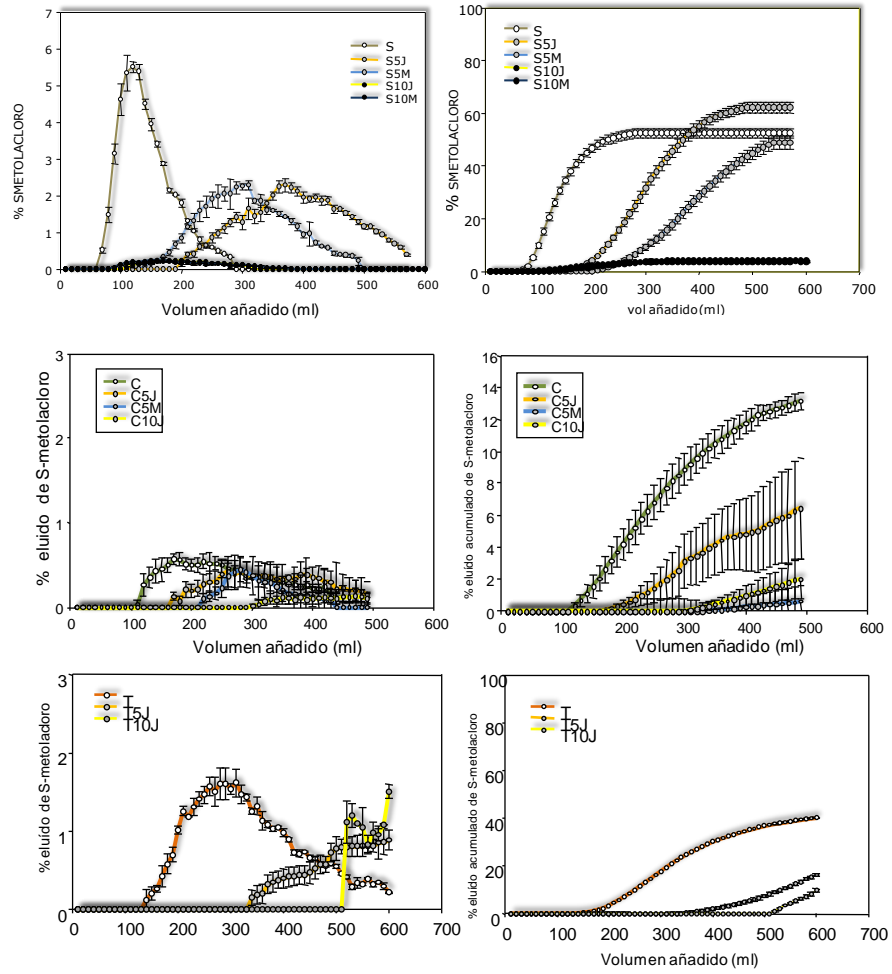


Figura II.26. Curvas relativas de lixiviación (izquierda) y acumuladas (derecha) para S-metolachloro en los suelos sin enmendar (S, C y T) y enmendados al 5% y 10% (p/p) con AJ (S10J, S5J, C10J, C5J T10J) y con AM (S10M, S5M, C10M, C5M, T10M).

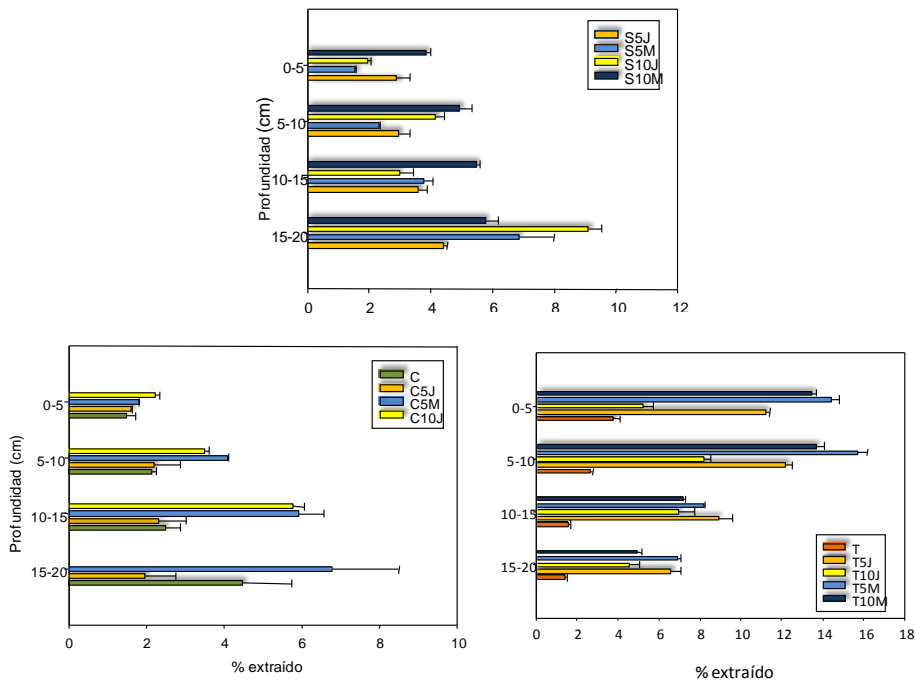


Figura II.27. Porcentajes de S-metolachlor extraído de las porciones de suelo a distintas profundidades de las columnas de suelo empaquetadas a mano.

II.4.4.5.- Bioensayo

Se realizó un bioensayo para comprobar si la eficacia del herbicida S-metolachloro sobre la mala hierba *Ray grass* se veía afectada negativamente por la presencia de alperujo y de herbicida en el suelo.

Al igual que ocurre para MCPA, la eficacia de S-metolachloro frente a la hierba, no se reduce en el suelo enmendado C10J. A diferencia de MCPA que no mostró una alta adsorción al suelo, y por ello la posible reducción de su eficacia frente a la mala hierba era baja, S-metolachloro 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 con suelo C10J, lo que revela no existe un efecto negativo sobre la actividad 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 similares entre el tratamiento Control y AJ (Figuras II.28 y II.19).

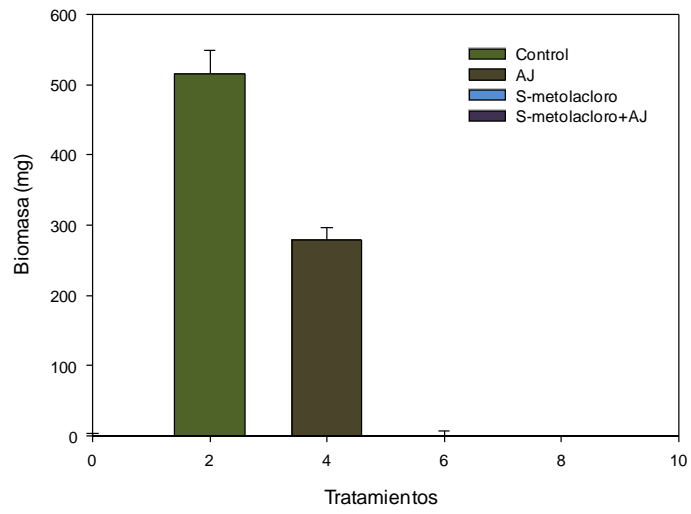


Figura II.28. Histograma para la biomasa de *Ray grass* crecida tras 20 días de ensayo en laboratorio para los tratamientos Control, alperujo, S-metolaclo+alperujo y S-metolaclo



Figura II.29. Estado de las macetas de *Ray grass* crecidas tras X días de ensayo en laboratorio para los tratamientos Control, alperujo, S-metolaclo+alperujo y S-metolaclo

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, reduciendo la lixiviación, disipación e incrementando la adsorción en general a los suelos para el segundo, pero no para MCPA.

II.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.
- 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., García, D., Cegarra, J. Composting of a solid olive-mill by product ("alperujo") and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under comercial conditions. *Waste Manage.* **2006**, 26, 620-626.
- 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.
- 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., Laird, D.A., Koskinen, W.C., Dowdy, R.H. Atrazine desorption from smectites. *Soil Sci. Soc. of Amer. J.* **1994**, 58, 1632-1638.
- Beck, A. J., Johnston, A. E. J. y 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. "Dissolved Organic Matter: Biogeochemistry, Dynamics, and Environmental significance in

soils". Chapter one. En *Advances in Agronomy*, vol 110. 2011. Primera edición **2011**. Elsevier, Printed in USA.

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.

Camacho-Muñoz, D., Martín, J., Snatos, .L. Aparicio, I., Alonson, 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, X Wang, F Liu, E Zhao L Han. Dissipation and Residue of S-metolachlor in Maize and soil. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* **2008**, 80:391-394.

Celis 1997

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., 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., 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., 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., 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.

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.
- 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.
- Gee, G., Bauder, J.W. **1982**. Particle-size analysis. En : *Methods of soil analysis: Part 1, Physical and mineralogical methods*, 2nd edn (edn A. Klute), pp. 383-441. Agronomy monograph nº 9, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Goering, H. K., 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**.
- 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.

- 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., Brown, D. Adsorption of ionisable pesticides in soils. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2007**, *188*, 149-217.
- 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., 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. **1998**. Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica.* *42*, 135-146.
- 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, in *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. In: A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (eds.). *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Biological Methods*, American Society of Agronomy and Soil Science of America, Madison, WI. 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. 2010. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer. *J. Agric. Food Chem.* 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. **2005**. Suitability of wastes from olive-oil industry for initial reclamation of a Pb/Zn mine tailing. *Water Air Soil Pollut.* 165, 153-165.
- Senesi, N.; Miano, T. M.; Provenzano, M.R. y 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.
- Seybold, C.A. y Mersie, W. **1996**. Adsorption and desorption of atrazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine, hydroxyatrazine, and metolachlor in two soils from Virginia. *J. Environ. Qual.* 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.
- 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.
- Tisdall, J.M. and 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. (**2007-2008**). 2006 es el que se nombra en el texto
- Torrents, A., S. Jayasundera, W.J. Schmidt. 1997. Influence of the polarity of organic matter on the sorption of acetamide pesticides. *J. Agric. Food Chem.* 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.
- 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.
- Zsolnay, A.; 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. Dissolved humic in soil waters. Pico A. **1996**. (ed) Humic substances in terrestrial ecosystems. Elsevier, New York.

Zsolnay, A; Baigar, E.; Jiménez, M.; Steinweg, B; Saccomandi, F. Differentiating with fluorescent 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-metolaclo. Estudios de adsorción-desorción, disipación, mineralización, lixiviación, actividad deshidrogenasa

III.1.-INTRODUCCIÓN

La materia orgánica del suelo constituye un complejo y dinámico sistema sometido a cambios temporales y espaciales, que se ve afectado por factores bióticos y abióticos. La naturaleza físico-química de la materia orgánica del suelo depende por ello de la entrada de biomasa al sistema, de la historia agrícola del suelo (Alleto et al., 2010; Schnitzner y Monreal., 2011), 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 habitan el suelo (Pignatello, 2012).

La evolución y transformación de la materia orgánica (MO) en los suelos enmendados, debido fundamentalmente a las condiciones climáticas, juega un papel muy importante en la determinación de su capacidad de interactuar con compuestos orgánicos (Cox et al., 2004; Barriuso et al., 2011). Algunos estudios han investigado el comportamiento de plaguicidas en suelos enmendados con alperujo y/o orujo (López-Piñeiro et al., 2006 y 2008a y b; Albarrán et al., 2004; Cabrera et al., 2008 y 2010), pero existen pocos 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).

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

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, su alta movilidad en ellos, presenta alto riesgo de lixiviación hacia aguas subterráneas (Lagana et al., 2002; Dousset et al., 2004) es frecuentemente detectado en aguas superficiales y subterráneas a

concentraciones superiores a las establecidas por la UE. [Loos et al. \(2010\)](#) encontraron que bentazona constituía un serio problema de contaminación en términos de frecuencia de detección y concentraciones máximas en aguas subterráneas en 23 países europeos estudiados. En Alemania en particular, 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 importantes en muchas regiones de España sometidas a prácticas de manejo agrícola intensivas.

III.2.-OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio ha sido evaluar el impacto que la adición de dos residuos de almazara (alperujo y orujo) transformados tras 9 años de aplicaciones sucesivas y de residuos no transformados (frescos), tienen sobre las propiedades físico-químicas de suelo de olivar y sobre los procesos que regulan el comportamiento de los herbicidas bentazona y S-metolacloro.

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 570 mg 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 a derivados de antranílico.

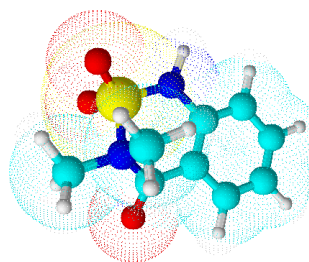


Figura III.1. Estructura química tridimensional de la molécula de bentazona.

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 C¹²-bentazona y S-metolacloro se analizaron usando HPLC y 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 Acetonitrilo y agua Mili-Q en una proporción 55:45 (v/v), respectivamente. Las muestras de bentazona C¹⁴ se analizaron por LSC, como en el caso de MCPA en el apartado II.3.1.3.

III.3.2.-Residuos orgánicos y suelo

Se usaron dos residuos orgánicos subproductos obtenidos del proceso de centrifugación en dos fases de 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 que fue suministrado por UCASUL, empresa localizada en Beja (Portugal).

Se seleccionó un suelo procedente de una granja experimental de la INIAP (Instituto Nacional de Investigación Agraria y Pesquera) en Elvas, Portugal (38°53' N; 7°9'W; 290 msnm). Para este estudio se seleccionaron 15 parcelas de un olivar de 14x15m de superficie distribuidas al azar (Figura III.2.) 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) (equivalente a 0.62 y 1.24%, respectivamente), e igualmente otras seis parcelas con orujo a las dosis de 24 y 54 Mg ha⁻¹ y año (DW27 y DW54) (equivalente a 0.56 y 1.12%, respectivamente). Tres parcelas permanecieron sin enmendar y constituyeron las parcelas control a lo largo del estudio (S). Los residuos fueron aplicados manualmente cada 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 homogeneizarlo sobre la superficie del suelo. Tras el tratamiento, se recogieron muestras

de los primeros 25 cm de profundidad en cada parcela tras 20 meses de la última aplicación de los residuos.

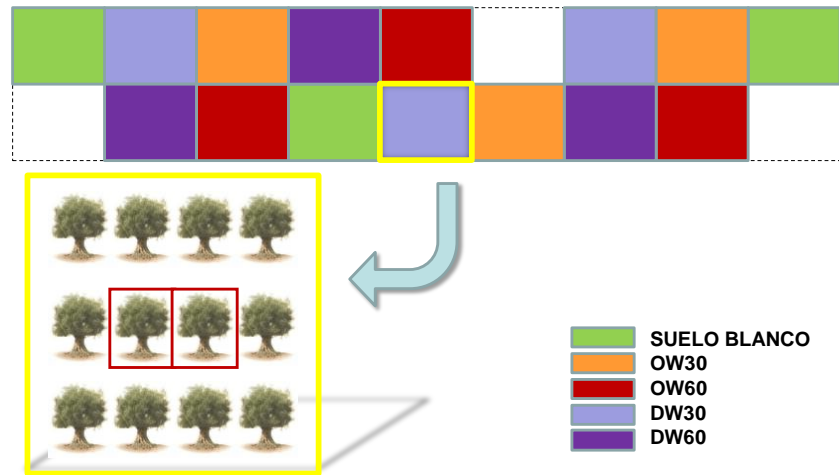


Figura III.2. Distribución al azar de las parcelas experimentales de la granja de INIAP. Abajo a la izquierda se muestra una parcela experimental individual, que se encuentra dividida en diferentes subparcelas de 3 x 4 olivos, de entre los cuales se seleccionan como puntos de muestreo los dos árboles que quedan en el centro de la misma (en rojo), previniendo de este modo el posible efecto borde o deriva que pudiera ocasionarse en el muestreo.

Con el objeto de comparar el comportamiento de los herbicidas bentazona y S-metolacoloro en estos suelos en presencia de residuos orgánicos transformados (suelos enmendados bajo condiciones de campo durante 9 años) y de residuos orgánicos frescos, se recolectaron muestras de suelo sin enmendar (S) que se secaron a temperatura ambiente, y la 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 uso. La cantidad total de residuo añadida al campo tras los 9 años de tratamiento es similar a aquella recibida por los suelos enmendados en laboratorio.

III.3.3.-Análisis de residuos orgánicos y 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 carbono orgánico total (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 carbono orgánico soluble (COS) de los suelos y los residuos fue determinado en una solución con agua destilada a la relación 3:1 (agua/suelo) y 100:1 (agua/OW y agua/DW) y los extractos fueron medidos con un espectrofotómetro de absorbancia Shimadzu TOC-Vsch. Los ácidos húmicos y fúlvicos (AH y AF, respectivamente) fueron extraídos de los suelos y residuos con una solución 0.1 M de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ + NaOH usando una relación 10:1 (extractante/muestra suelo o residuo). Para precipitar los ácidos húmicos el sobrenadante se acidificó hasta pH 2 con H_2SO_4 1M. 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 los suelos 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 de los suelos siguiendo la metodología descrita en el apartado II.3.3.2.

Las propiedades físico-químicas del suelo sin enmendar (S) y los suelos enmendados con alperujo y orujo bajo condiciones de campo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y bajo condiciones de laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10) y para los residuos (OW y DW) se muestran en la Tabla III.1.

Se separó la fracción arcilla del suelo (fracción de tamaño de partícula $< 2\mu\text{m}$) 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+} y K^+ tratados con etilenglicol y calcinadas a 500°C, respectivamente (Brown, 1961).

Se monitorizó la respiración basal (la producción de CO₂ 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 and DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 and 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-metolaclo (5, 10, 20, 40, 50 μM). Las muestras se trataron y se analizaron siguiendo las metodologías descritas en los apartados II.3.4.1. y II.3.1.2. del Capítulo II.

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

Los estudios de disipación se realizaron para ambos herbicidas, pero la mineralización sólo se determinó para C¹⁴-bentazona, ya que no se disponía de producto marcado S-metolaclo. 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 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 tiempo 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 extraídos en los tiempos 7, 14 y 28 días, fueron tratados, además, con C¹⁴-bentazona hasta alcanzar una concentración de 92.5 Bqg⁻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 de acetonitrilo/0.25% H₃PO₄ (pH= 2.8) (v/v) en la proporción 40:60,

agitando mecánicamente a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Las suspensiones se trataron y se analizaron como en los apartados II.3.4.1. y II.3.1.2. 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 CO_2 producido en la mineralización. Al igual que en el apartado II.3.4.4 el mililitro de NaOH se recogía y reemplazaba semanalmente por una nueva disolución de NaOH y se analizaba por contador de centelleo (LSC).

Tras la extracción de bentazona de los suelos de los matraces con C^{14} -bentazona, se dejó secar y molió el suelo contenido en los tubos de centrífuga, en un mortero de Ágata. Un gramo de este suelo se sometió a combustión a 900°C usando un oxidizador Harvey OX-500. El C^{14} liberado tras la combustión fue atrapado por un líquido Harvey's C^{14} cocktail, que actúa como trampa de carbono y fue analizado por contador de centelleo (LSC).

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 0.2ml del sustrato 2-*p*-iodofenil-3-*p*-nitrofenil-5 cloruro de tetrazolio (INT) (0.4%). El producto formado: formazán iodonitrotetazolio (IF) se extrajo con 10 ml de metanol y se midió la absorbancia de la solución 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 en el campo y en el laboratorio (S, OW30, OW60, DW27, DW54, OW5, OW10, DW5 y DW10). Con el fin de minimizar las 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, se pusieron 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 bentazona y S-metolacloro a la dosis de 2.2 y 1 kg ha^{-1} , respectivamente en la parte superior. 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 usando una solución 40:60 v/v acetonitrilo/H₃PO₄ al 0.25% (pH= 2.8) para extraer 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 un 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 fisicoquímicas y superficiales de los suelos y propiedades fisicoquímicas de los residuos usados

Las propiedades fisicoquímicas estudiadas para el suelo procedente de la granja experimental en la 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 Tabla 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 carbono orgánico total (COT) aumentó en los suelos enmendados con OW y con DW. Aunque éste era similar en los residuos (535 g kg⁻¹ para el OW y 516 g kg⁻¹ para el DW), se encontraron mayores valores en los enmendados en el campo con DW que con OW, lo que se puede atribuir a una mayor estabilidad de la materia orgánica de DW que presentó mayor contenido en lignina que OW ([Tabla III.1](#)), polímero que 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 carbono orgánico soluble (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 degradación por parte de los microorganismos presentes en el suelo, ya que el COS constituye la fuente de carbono fácilmente ([Schitzner et al., 2010](#)).

Tabla II.1. Propiedades fisicoquímicas de los suelos 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) y las propiedades fisicoquímicas de los residuos orgánicos (OW y DW).

	S	OW30	OW60	DW27	DW54	OW5	OW10	DW5	DW10	OW	DW
COT (g kg⁻¹)	14.6 ^a	30.7 ^b	37.6 ^c	46.1 ^d	63.5 ^f	37.8 ^c	54.8 ^e	34.2 ^{bc}	54.6 ^e	535	516
COS (g kg⁻¹)	0.127 ^a	0.542 ^b	0.712 ^c	0.760 ^c	1.51 ^d	3.29 ^e	5.25 ^f	5.54 ^f	8.42 ^g	43	74
CAH (g kg⁻¹)	0.965 ^a	2.07 ^b	2.78 ^c	2.94 ^c	4.14 ^d	3.28 ^c	5.16 ^e	1.84 ^b	3.20 ^c	52	31
CAF (g kg⁻¹)	1.14 ^a	1.94 ^b	2.00 ^b	1.77 ^b	2.29 ^c	2.59 ^c	4.40 ^e	3.68 ^d	8.42 ^f	35	62
pH (H₂O)	7.95 ^d	7.83 ^d	7.74 ^{cd}	7.81 ^d	7.59 ^c	6.81 ^b	6.45 ^b	6.56 ^b	6.07 ^a	5.7	5.3
CE (dS m⁻¹)	0.704 ^a	1.21 ^b	1.58 ^c	1.11 ^{ab}	1.87 ^c	3.10 ^d	4.94 ^e	7.08 ^f	12.39 ^g	0.704	1.21
GP	0.849 ^b	1.07 ^c	1.39 ^c	1.66 ^{cd}	1.81 ^d	1.26 ^c	1.17 ^c	0.501 ^a	0.38 ^a	-	-
total N (g kg⁻¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	24
Lignina (g kg⁻¹)	-	-	-	-	-	--	-	-	-	19	24

COS: Carbono orgánico soluble; COT: Carbono orgánico total; 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 se puede ver en 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 enmendados en laboratorio con el 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 grado de polimerización (GP), calculado como la relación: CHA/CFA) aumenta con la enmienda en todos los suelos a excepción de DW5 y DW10. El aumento en la relación CAH/CAF (GP), 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 conductividad eléctrica (CE) de los suelos se ven afectados también por la adición de los residuos. 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. La enmienda da lugar a un descenso del pH de los suelos, especialmente en los suelos enmendados en laboratorio. Igualmente, la CE de los suelos enmendados es mayor que 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 de campo y los suelos del laboratorio enmendados con OW y DW, de pH más ácido y alta CE, pueden ser también atribuidas a pérdidas de los compuestos solubles a través de los procesos de transporte y degradación durante los 9 años de enmienda.

El estudio del sistema de poros de los suelos explica en gran medida los procesos de adsorción, desorción, lixiviación e incluso de degradación que ocurre en el suelo, por lo que su determinación constituye una herramienta básica para el conocimiento del comportamiento de los plaguicidas en este sistema. El volumen de poros total (VTP) ([Figura III.3.](#)) se vio incrementado con la enmienda en los suelos enmendados en el campo, siendo este aumento más importante en los suelos enmendados con DW. El aumento en la porosidad de los suelos enmendados en campo fue debido a un aumento de poros en el rango de mayor tamaño estudiado (10-1000 μm), y en menor medida también a un pequeño aumento en el volumen de los poros de $<1\mu\text{m}$, para estos suelos excepto para DW54, que mostró un aumento mayor en este suelo. [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, lo que puede 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. Este aumento ocurre en el rango mayor de tamaño de poro estudiado (10-100 μm). Y al igual que en campo todos los suelos enmendados mostraron un aumento en el volumen de poro $<1 \mu\text{m}$. 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 (Cox et al., 1997).

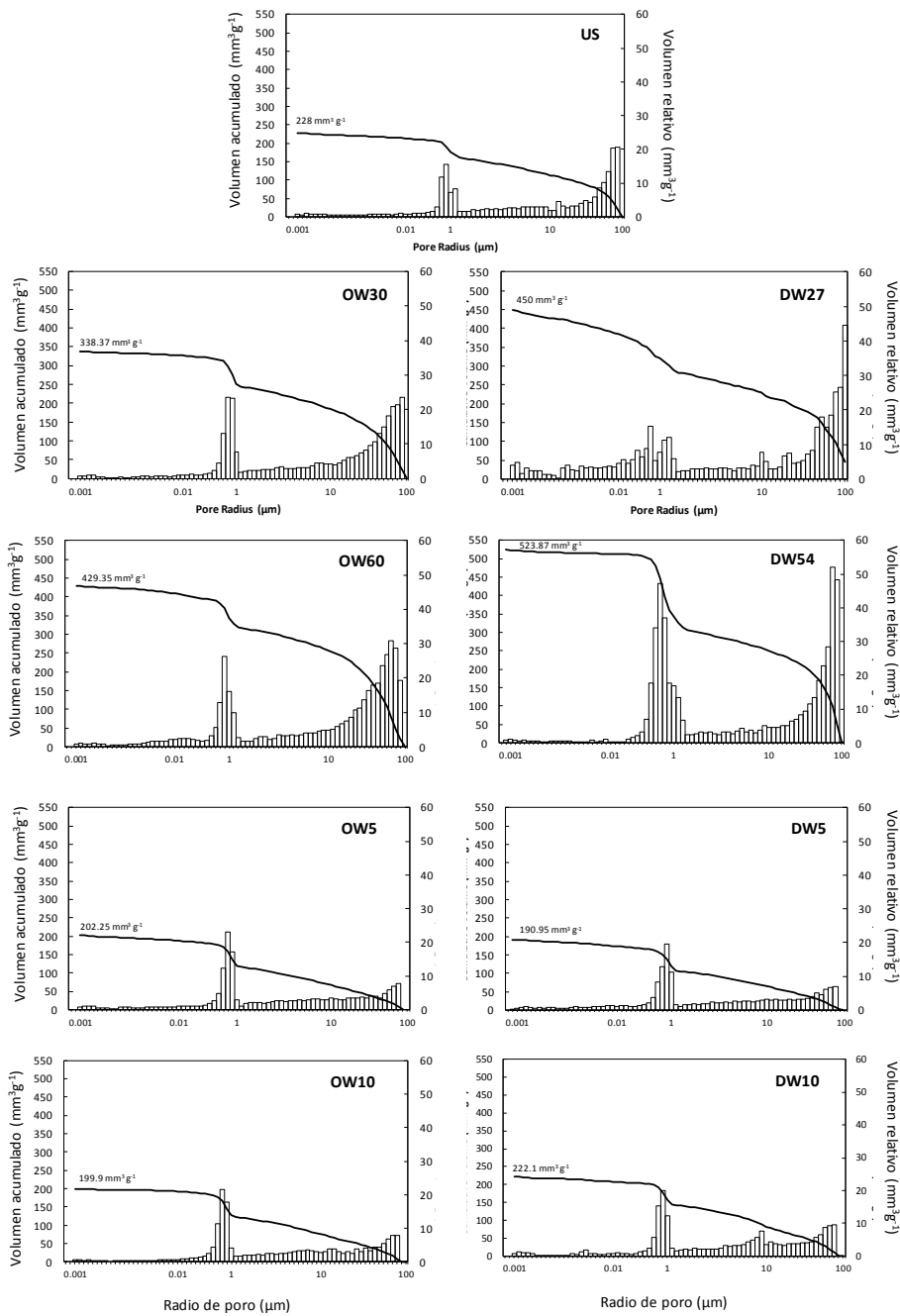


Figura III.3. Valores relativos (histograma) y acumulados (curva) para los volúmenes de Hg para los suelos sin enmendar y enmendados en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).

III.4.2.- Respiración basal

La [Figura III.4.](#) muestra los miligramos de carbono inorgánico (CO_2) producidos 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 CO_2 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](#)), 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 CO_2 .

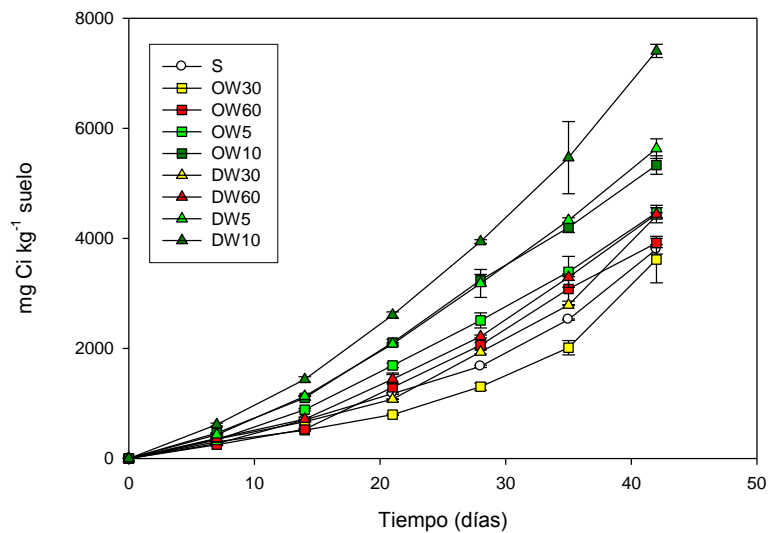


Figura III.4. Respiración basal del suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y laboratorio con OW y DW.

Nuestros resultados revelan que la adición de OW y DW al suelo incrementa la respiración del mismo, que se atribuye al aumento del COS al enmendar ([Tabla III.1.](#)), a excepción del suelo OW30, que mostró mayor contenido en COS que el suelo sin enmendar, y sin embargo, mostró menor tasa de respiración ([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 del suelo enmendado en laboratorio con OW en laboratorio (Figura III.4.).

III.4.3.-Estudios en laboratorio

III.4.3.1.- Estudios de adsorción

Las isotermas 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 que presenta grupos aniónicos que causan que su adsorción a las partículas del suelo se vea afectada por las variaciones de pH debido a la 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, y en este estudio en particular presenta valores para los coeficientes de Freundlich entre 0.032 y 1.70 (Tabla III.2). 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, S-metolacoloro, muestra una alta adsorción en general tanto a partículas inorgánicas como orgánicas en los suelos (Shaner et al., 2006).

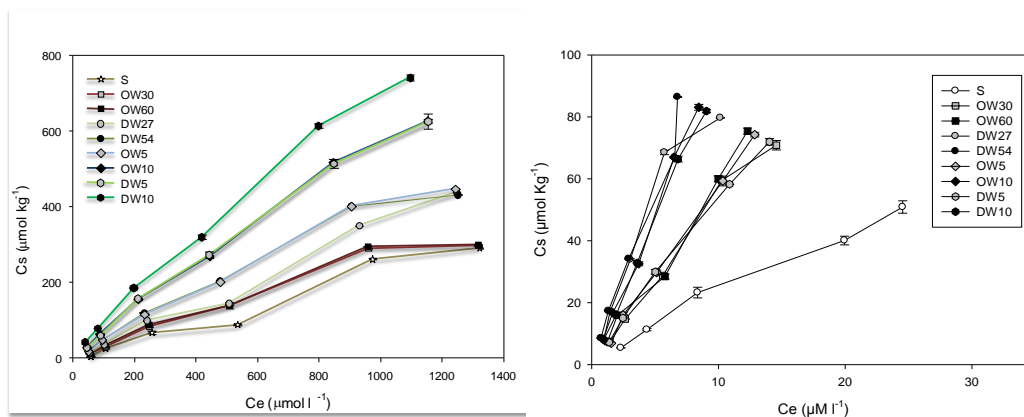


Figura III.5. Isotermas de adsorción para bentazona (izquierda) y S-metolacoloro (derecha) en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo con alperujo y orujo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).

La adición de tanto OW como de DW a los suelos aumentó la capacidad de adsorción de tanto bentazona como S-metolacloro cuando 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 materia orgánica presente de los residuos poco transformados, respecto a los residuos madurados en campo tras 9 años de tratamiento (Chefetz y Xing, 2009). Sin embargo para S-metolacloro el aumento en la adsorción fue mayor para los suelos enmendados en campo y con DW (DW30 y DW60) y para el OW, el suelo enmendado en laboratorio, OW10 (Tabla III.2.)

No se ha encontrado una correlación significativa entre los valores de $K_{f_{ads}}$ 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 5 suelos aumentaban con el contenido en materia orgánica del mismo, y 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 $K_{f_{ads}}$ y el componente soluble de la materia orgánica (COS) ($r^2= 0.96$) y una correlación fuertemente negativa entre $K_{f_{ads}}$ y pH ($r^2= 0.89$), ambos (COS and pH) 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 indica que la adsorción ocurre por medio de interacciones no específicas hidrofóbicas entre la forma molecular de bentazona y los sitios de adsorción, que se explica por el bajo coeficiente de partición octanol agua ($\log P=-0.46$).

S-metolacloro se adsorbe más a los suelos enmendados con DW en campo, y en laboratorio al 10% (DW30, DW60 y DW10), de más altos contenidos de 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-metolacoloro K_f , n_f , 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-metolacoloro		
	K_f ads	R^2	n_f ads	K_f ads	R^2	n_f ads
S	0.032 (0.011/0.097)*	0.922	1.29±0.187**	2.79 (1.63/3.95)	0.985	1.06±0.078
OW30	0.201 (0.128/0.314)	0.979	1.05±0.076	5.27 (4.18/6.35)	0.994	0.999±0.044
OW60	0.265 (0.169/0.413)	0.977	1.10±0.076	6.69 (5.52/7.86)	0.974	0.939±0.088
DW27	0.198 (0.128/0.315)	0.981	1.09±0.075	10.4 (9.22/11.6)	0.959	0.97±0.116
DW54	0.509 (0.359/0.722)	0.984	0.969±0.060	12.2 (11.1/13.3)	0.990	0.968±0.055
OW5	0.416 (0.287/0.603)	0.983	1.00±0.064	5.06 (3.91/6.03)	0.984	1.06±0.078
OW10	0.782 (0.980/1.59)	0.993	0.960±0.039	10.4 (8.37/11.4/)	0.996	1.03±0.039
DW5	1.36 (0.588/0.925)	0.993	0.964±0.039	5.81 (4.73/6.89)	0.994	0.971±0.043
DW10	1.70 (1.54/1.88)	0.998	0.873±0.017	8.37 (7.37/9.41)	0.998	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 del herbicida en el suelo depende de la naturaleza de la misma, de la naturaleza del compuesto químico y de las propiedades fisicoquímicas del suelo (Cox et al., 2001 y 2007). Mientras que en algunos casos las reacciones de adsorción de la MOS en las superficie del suelo aumenta la capacidad de del suelo de adsorber moléculas de plaguicidas (Said-Pullicino et al., 2004), en otros casos la capacidad de adsorción 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), que puede que explique en parte lo que ocurre con S-metolacoloro en este estudio.

III.4.3.2.- Estudios de desorción

Los parámetros de desorción se muestran en la [Tabla III.3](#). Las isothermas de desorción se muestran en las [Figura III.6](#) y [III.7](#) para bentazona y S-metolacloro, respectivamente. Las isothermas de desorción para bentazona no se ajustaban bien a la ecuación de Freundlich ($R^2 = 0.59-0.68$), pero en todos los casos (menos en el suelo S para S-metolacloro) la pendiente de las isothermas de desorción fueron menores que las de adsorción, lo que indica que la adsorción no es reversible para los herbicidas en estos suelos, lo que coincide con lo encontrado en el 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 ([Koskinen y Cheng, 1983](#)).

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

Tabla III.3. Coeficientes de desorción para bentazona y S-metolaclopro $K_{f\text{des}}$ y $n_{f\text{des}}$ en el suelo sin enmendar y enmendados en campo con orujo y alperujo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 Y DW10).

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

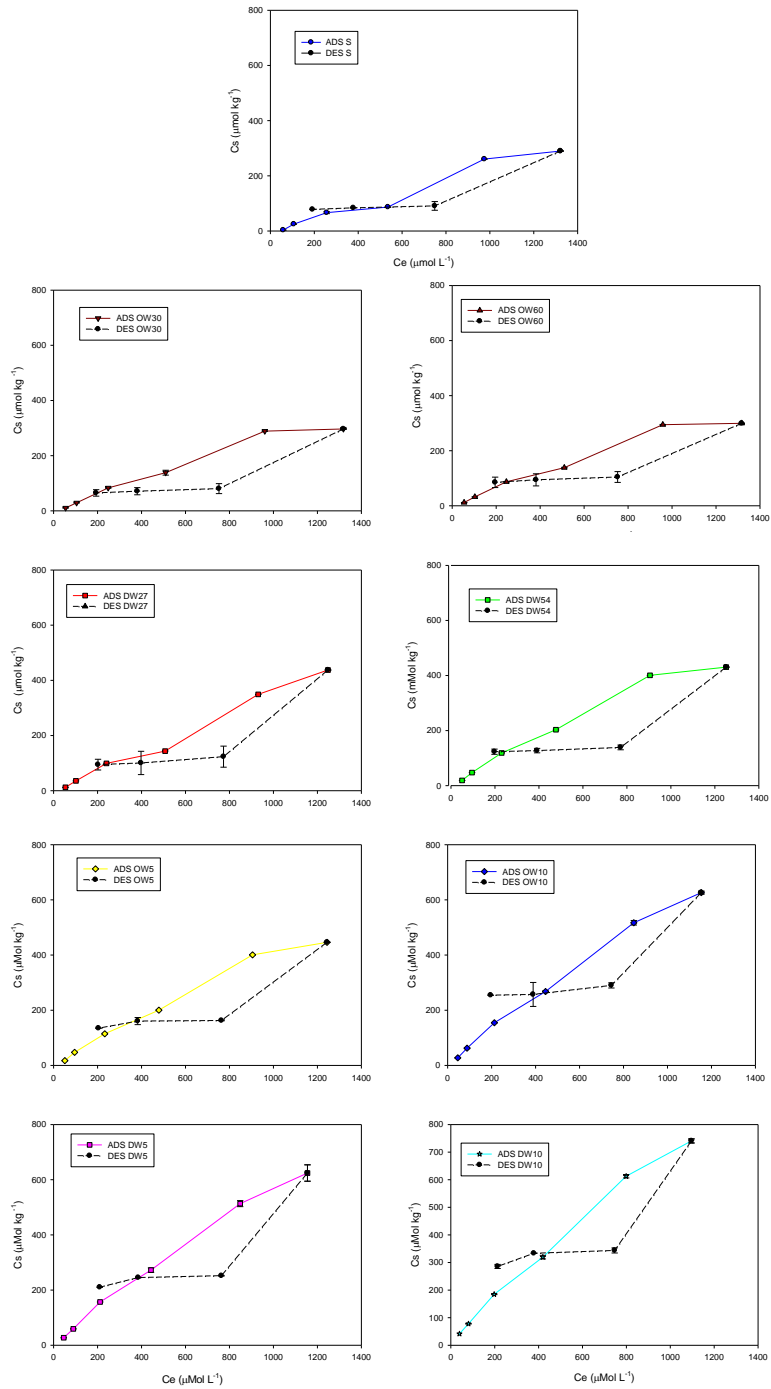


Figura II.6. Isothermas de adsorción-desorción para bentazona en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo con alperujo y orujo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).

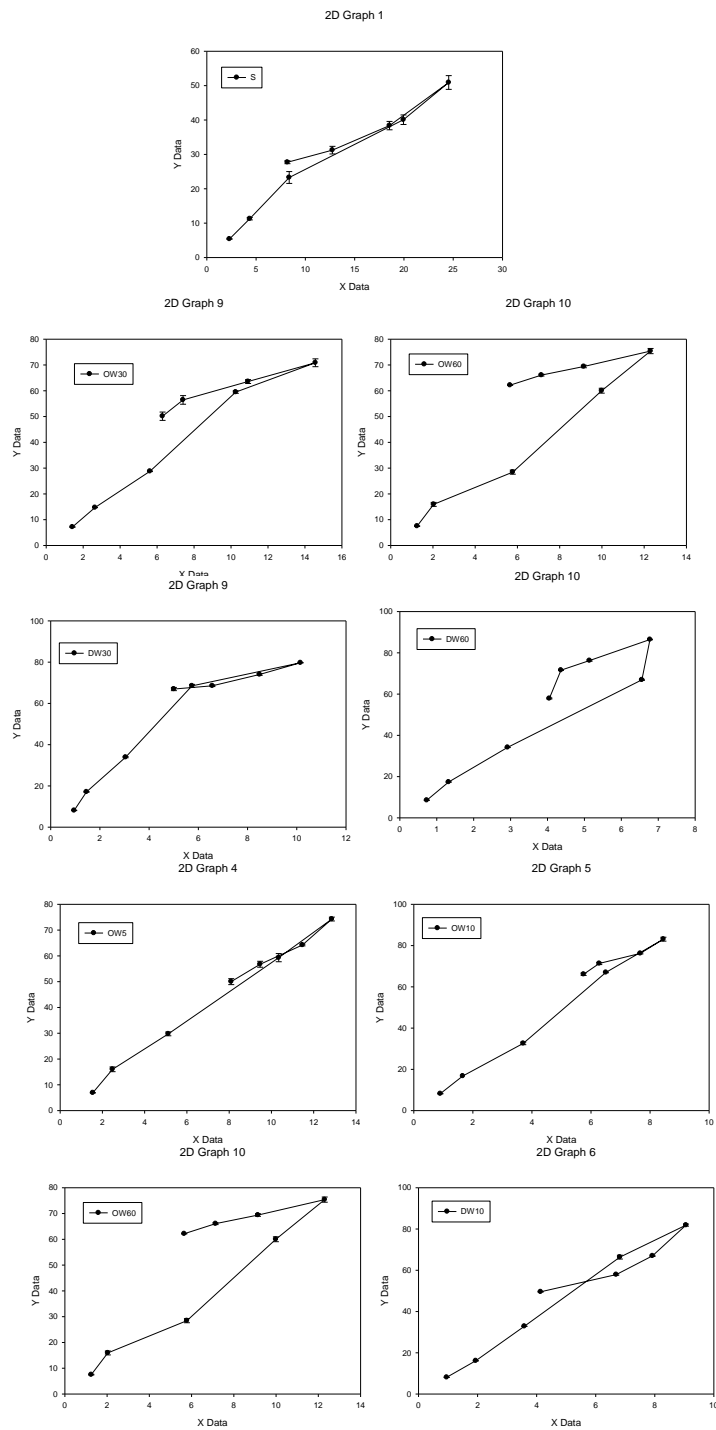


Figura II.7. Isothermas de adsorción-desorción para S-metolachloro en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo con alperujo y orujo (OW30, OW60, DW27 y DW54), y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10).

III.4.3.3.- Estudios de disipación-mineralización

Se monitorizó la disipación de bentazona y S-metolacloro 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.](#)).

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 el orujo, 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 fuente de C lábil para los microorganismos del suelo prefieren usar esta fuente de carbono en lugar del herbicida.

Para 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.](#)).

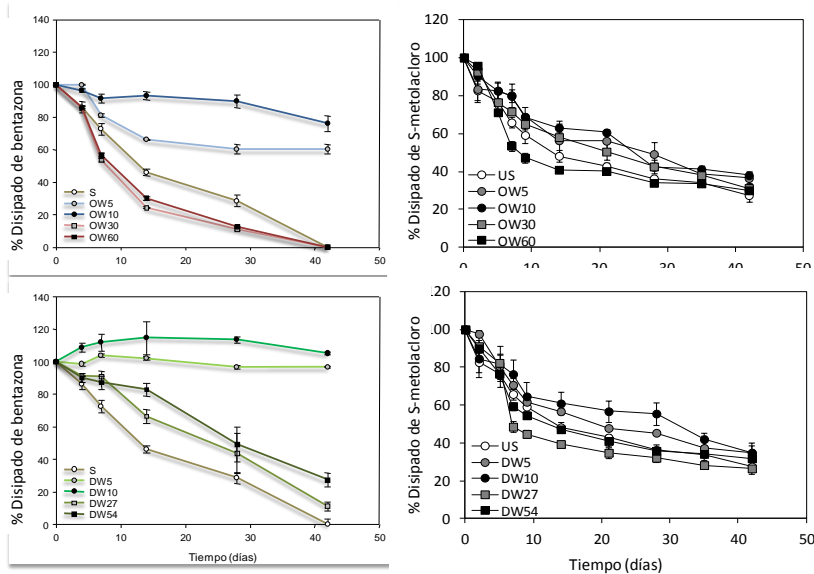


Figura III.8. Curvas de disipación para bentazona (izquierda) y *S*-metolachloro (derecha) en el suelo sin enmendar y los suelos enmendados en campo y laboratorio con OW (arriba) y DW (abajo).

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 42 días de incubación en la [Tabla III.4](#).

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, anteriormente descritos, 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 C que les proporciona el propio herbicida. Esto se ha demostrado previamente en un trabajo 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, y esto se ha visto también que afecta negativamente a la degradación de bentazona ([Rodríguez-Cruz et al., 2008](#)).

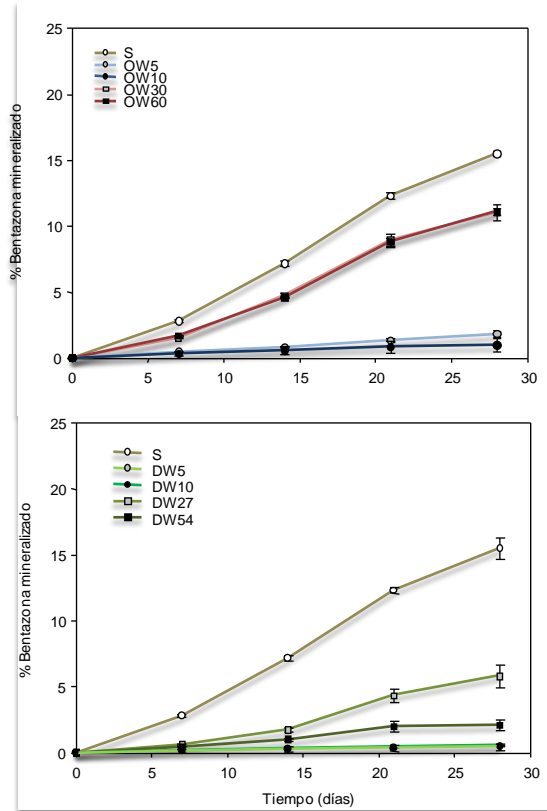


Figura III.9. Curvas de mineralización de bentazona en el suelo sin enmendar y enmendados con OW (arriba) y DW (abajo).

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 bentazona retenida. Los datos se recogen en la [Tabla III.4](#).

Tabla III.4. Vidas medias para bentazona y S-metolacoloro ($T_{1/2}$) en el suelo sin enmendar y enmendado en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54) y en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10). Porcentaje mineralizado y combustionado de bentazona en el estudio de disipación.

Suelos	bentazona			S-metolacoloro		
	$T_{1/2}$ (días)	R ²	Mineralizado (%)	Combustión (%)	$T_{1/2}$ (días)	R ²
S	6.97±1.19	0.854	15.5±0.221**	80.8±0.308	24.5±1.4*	0.937
OW30	6.58±0.60	0.965	11±0.608	92.7±0.801	27.1±2.26	0.958
OW60	6.61±1.12	0.956	11.1±0.287	99.9±1.02	26.4±0.46	0.819
DW27	13.9±1.7	0.919	5.79±0.824	90.5±1.63	23.1±0.72	0.918
DW54	22.7±2.1	0.961	2.09±0.417	105±0.461	26.6±2.09	0.896
OW5	54.1±12.3	0.769	1.82±0.228	66.4±1.13	30.4±2.64	0.929
OW10	127± 18.3	0.864	0.985±0.469	54.8±2.94	30.1±1.96	0.953
DW5	-	0.386	0.513±0.055	67.0±0.95	28.2±2.12	0.932
DW10	-	0.021	0.413±0.235	80.2±2.2	33.8±1.90	0.940

*Los números en paréntesis son los errores estándar para la media

**Errores estándar para la media

II.4.3.5.-Monitorización de actividad deshidrogenasa

Durante las últimas décadas la cuantificación de la biomasa microbiana y las actividades enzimáticas más típicas en el suelo, como la ureasa, la deshidrogenasa (DHA) y la catalasa entre otras, revelan información crucial de la bioactividad de suelos agrícolas frente a distintos manejos del suelo. Por tanto, la actividades enzimáticas y la biomasa microbiana son biomarcadores muy sensibles para la funcionalidad de los suelos cuando se investiga el impacto de prácticas agrícolas (García-Orenes et al., 2010 y Laudicina et al., 2011). Esto es posible ya que las enzimas presentes en los organismos del suelo

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

La determinación de la actividad deshidrogenasa (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., donde se representan conjuntamente las curvas de disipación y las de actividad deshidrogenasa.

La ADH tras 42 días mostró que la adición de enmienda no afecta 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 los suelos enmendados en campo, tanto con OW como con DW. En los suelos enmendados en laboratorio también se encuentra un aumento de ADH de los microorganismos, a los 10 días para los suelos OW5 y OW10, mientras que para los suelos enmendados con orujo (DW5 y DW10) se retrasa hasta los 20 días aproximadamente (Figura III.10). Laucidine (2011) y Tejada (2006) encontraron un aumento en ADH, (Skujins et al., 1967 y García et al., 1997), cuando se añade enmienda al suelo.

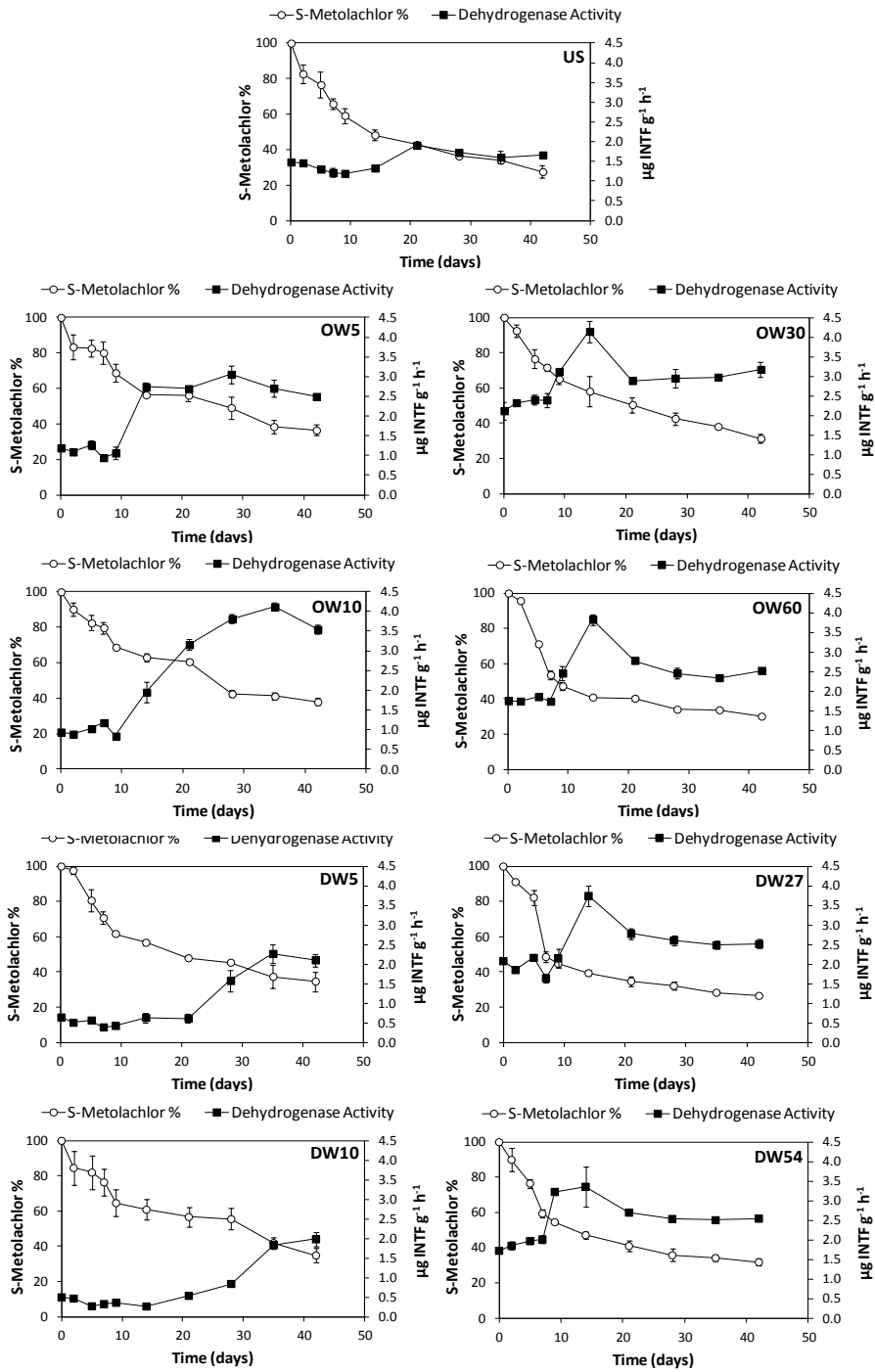


Figura III.8. Curvas de disipación de S-metolachloro junto con la actividad deshidrogenasa de los suelos usados.

II.4.3.6.- 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.](#)

Mientras que bentazona lixivió en todos los suelos, retrasándose su aparición en los lixiviados en los suelos enmendados, sólo se detectó S-metolacloro en los lixiviados del suelo S, sin enmendar, de menor capacidad de adsorción que los enmendados ([Figura III.11.E](#)). La adición de enmienda incrementa mucho la retención del herbicida en los suelos, impidiendo la lixiviación del mismo ([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 condiciones de no-equilibrio en la 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 el suelo en la adsorción de bentazona. Los porcentajes eluidos, extraídos y el total recuperado se muestran en la [Tabla III.5](#). Mientras que se recupera entre un 53± y un 64±% de bentazona en los suelos enmendados, S-metolacloro se recupera hasta un 86% en el suelo OW10, de la gran capacidad de adsorción y vida media alta. La recuperación del herbicida, se puede atribuir a que es retenido fuertemente por el suelo y está protegido de la degradación. La menor adsorción de bentazona, dando lugar a una menor recuperación del herbicida.

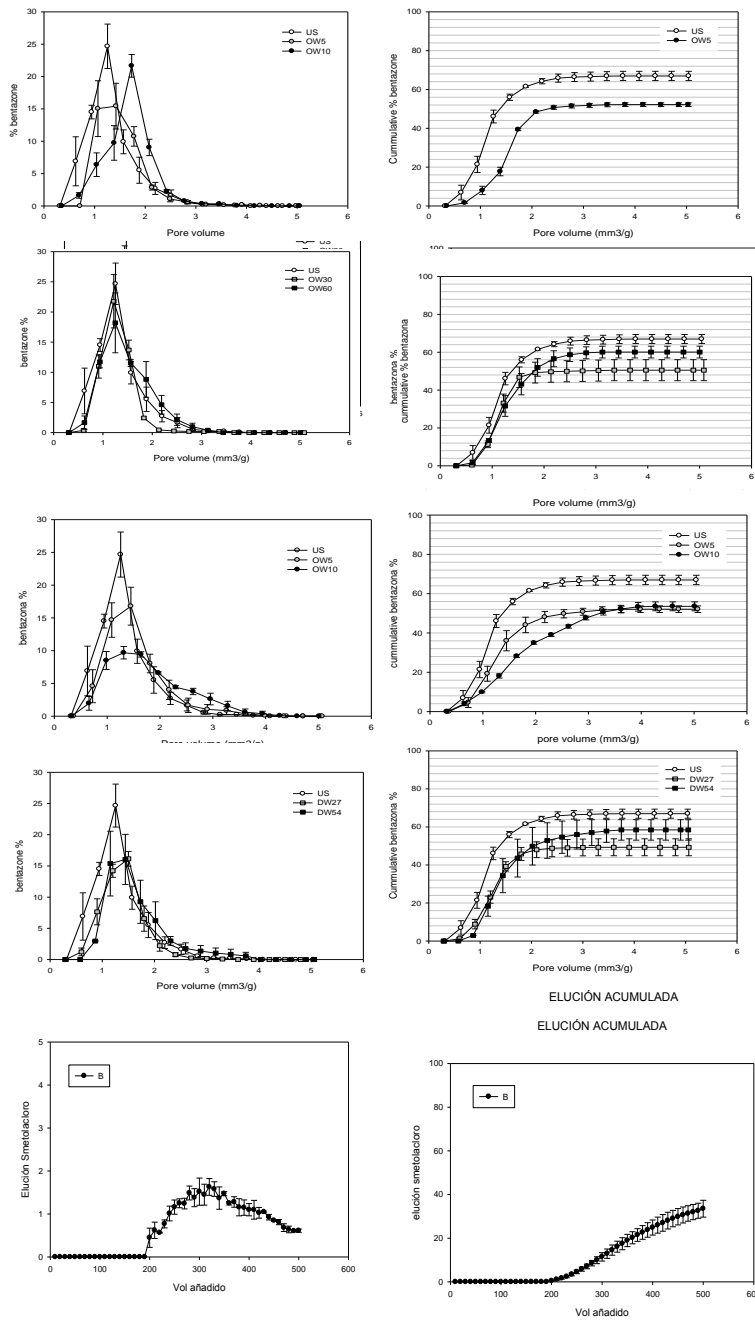


Figura III.11. Curvas para la lixiviación de bentazona (A, B, C y D) en el suelo sin enmendar y enmendado en campo y laboratorio y para S-metolachloro en el suelo sin enmendar (E).

Tabla III.5. Porcentaje de bentazona lixiviado, extraído, total recuperado del suelo de las columnas empaquetadas a mano.

Suelos	Bentazona			S-metolacoloro		
	Lixiviado (%)	Extraído (%)	Total (%)	Lixiviado (%)	Extraído (%)	Total (%)
S	66.9±2.39*	30±1.89	82.2	37.8±4.2	15	52
OW30	50.5±5.56	11.2±1.29	56.7	-	47	18
OW60	60.1±3.11	7±0.070	63.5	-	52	52
DW30	49.3±4.45	7.5±0.226	53.3	-	52	52
DW60	58.4±5.37	7.5±1.21	62.2	-	58	58
OW5	46.4±2.28	28.2±1.75	61.3	-	64	64
OW10	52.2±0.980	13.3±1.57	64.0	-	86	86
DW5	52.1±1.67	14.2±1.86	58.4	-	41	41
DW10	53.6±2.62	7±0.494	56.5	-	55	55

*Errores estándar respecto a la media

Tanto el sistema de poros que compone un suelo como lo 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 que lixiviado. En este estudio se encontró una reducción en la cantidad de bentazona lixiviada y recuperada en todos los suelos enmendados, tanto el laboratorio como en campo. 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, aumenta la adsorción, el entrampamiento físico y también la degradación, ya que estos poros son accesibles a las bacterias (Pignatello y Xing., 1996) y constituye un motivo para esta baja recuperación del total de bentazona.

Todos estos resultados obtenidos en el estudio de lixiviación mostraron el comportamiento distinto 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 los residuos, reveló diferencias principalmente debido al contenido en MOS y la diferente porosidad de los sistema:

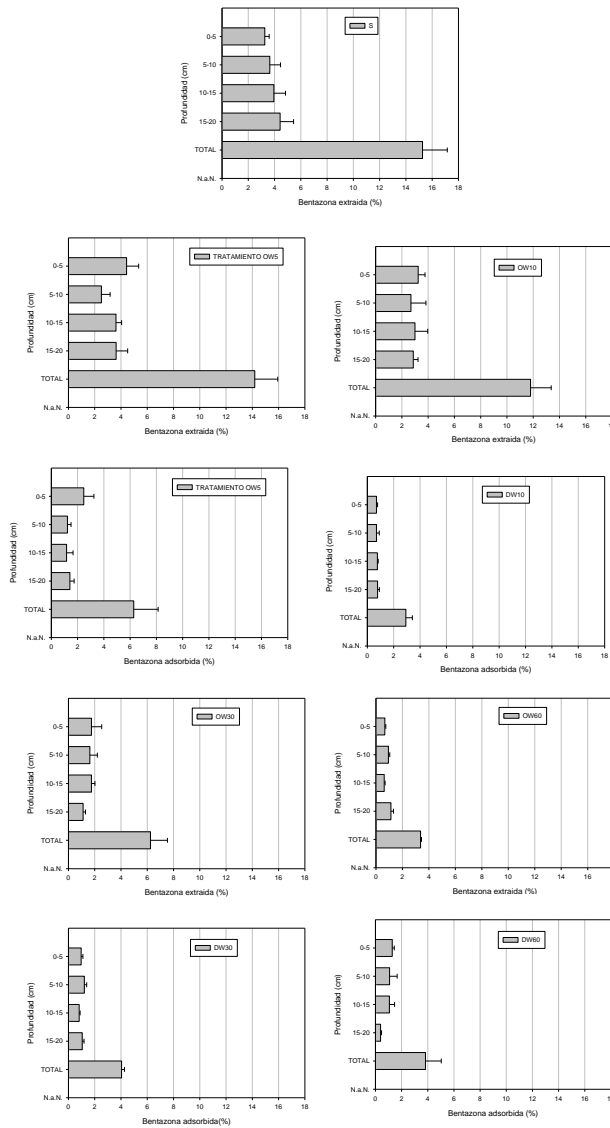


Figura III.12. Porcentaje de bentazona extraído de las columnas alteradas de suelo a distinta profundidades.

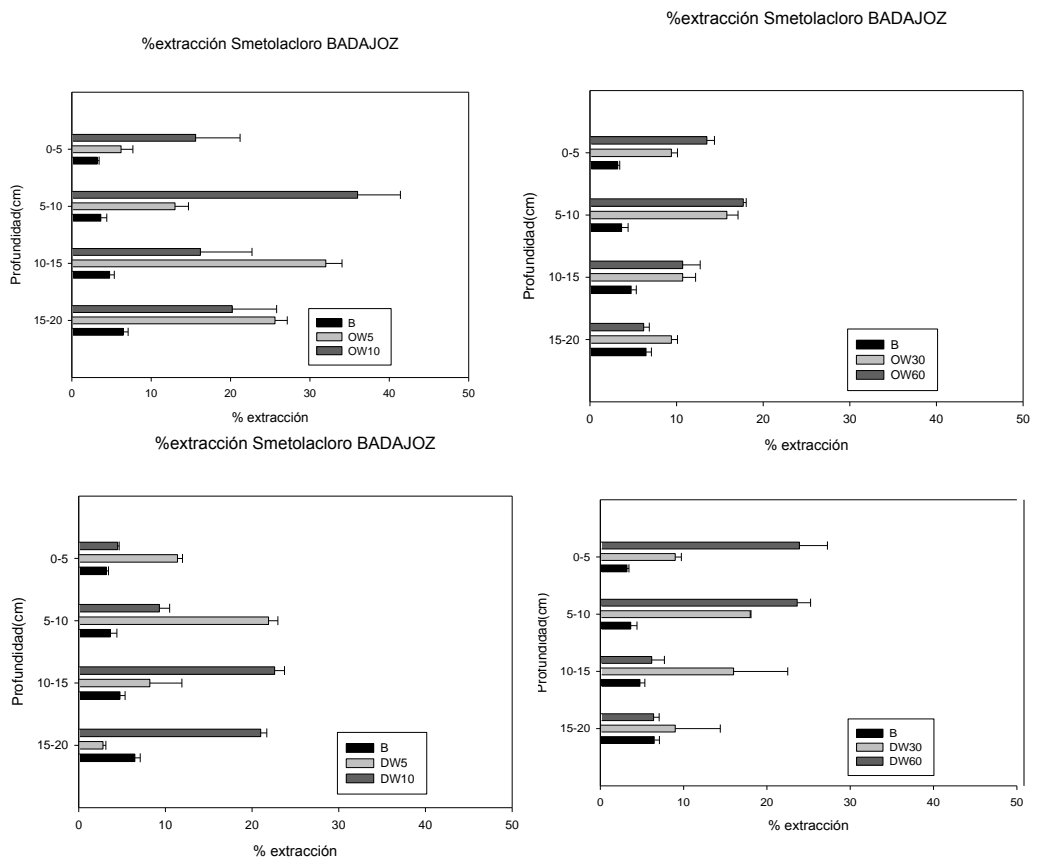


Figura III.13. Porcentaje de S-metolachloro extraído de las columnas de suelo a distinta profundidades.

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 los residuos, reveló diferencias principalmente debido al contenido en MOS y la diferente porosidad de los sistemas.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- 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., 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. Sustain. Dev.* **2005**, 25, 309-315.
- Brown G. The X-Ray Identification and Crystal Structures of clay Minerals, (Ed. G. Brown). **1961**, Mineralogical Society, London.
- Brunetti, 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, 6730-6736.
- Burgos, P., Madejón, E., Cabrera, F. Nitrogen mineralisation and nitrate leaching of a sandy soil amended with different organic wastes. *Waste Manag. Research.* **2006**, 24, 2, 175-182.
- 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. Tot. 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., 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., 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., Conceicao-Fernandes, M., 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**, Vol. 52, No. 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.
- 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 activit under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. **2010**, 109, 110-15.
- Gee, G.W. y Bauder, J.W. Particle size analysis. In: Klute, A. (ed). *Methods of soil analysis, Part 1*, 2nd Ed. American Society of Agronomy. Madison, WI. **1982**. Pp: 383-412.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J. **1970**. Forage fiber analysis: Apparatus, reagents, procedures, and some applications, *Agric. Handbook 379*. USDA-ARS, Washington, DC.
- Hemmat, A.: Aghilinategh, N.: Rezainejad, Y.: Dadeghi, M. Long-term impacts of municipal soilid waste compost, sewage sludge and farmyard manure application on organic carbon, bulk density and consistency limits of a calcareous soil in central Iran. *Soil Till. Res.* **2010**, 108, 43-50.
- Jackson K.L. *Soil Chemical Analysis Advanced Course* (ed. Jackson, M.L.) 2nd 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.: 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-Piñeiro, 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-Piñeiro, 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.
- López-Piñeiro, 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.
- Nelson, D.W. : Sommers, L.E. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: *Methods of soil analysis*. Sparks, D.L., (Eds.), 1996. Madison, pp 961-1010.
- 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.* **2011**, 12, 8, 1241-1256.
- Pignatello, J.J. Dynamic interactions of natural organic matter and organic compounds. *J. Soils Sediments.* Published online. **2012**, DOI 10.1007/s11368-012-0490-4.

- 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. Quo vadis Soil Organic Matter Research? A Biological Link to the Chemistry of Humification. *Advances in Agronomy (Book series)*. **2011**, *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.
- Si, Y.; Zhang, J.; Wang, S.Q.; Zhang; L.G.; Zhou, D. Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethametsulfuronmethyl in acidic soils in China. *Geoderma.* **2006**, *130*, 66–67.
- Sims, J.R.; Haby, V.A. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil. Sci.* **1971**, *112*, 137-141.
- Singh, P. and 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.
- SSS-ISRIC-FAO. 1994. World reference base for soil resources, Draft Wageningen, Rome.
- Tejada, M., Hernández, M. T., y 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. and 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.I. 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 (MARM, 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 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. El comportamiento de terbutilazina en suelos se ve afectado por la presencia de materia orgánica (Singh et al., 2001 y 2002), como pueden ser los residuos orgánicos de almazara usados para enmendar los suelos (Delgado-Moreno et al., 2007), además puede persistir en la parte superior del suelo entre 30 y 90 días, según las propiedades del mismo (Worthing y Hance, 1991).

Glifosato es el herbicida más usado en el mundo desde que salió al mercado en 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 a la vez que más fuertemente retenido debido a su grupo fosfato y por tanto, protegido frente a posible degradación microbiana (Borggaard y Gimsing, 2008). El glifosato se adsorbe 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 la presencia de glifosato y sus residuos en aguas superficiales y subterráneas (Carabías-Martínez, et al., 2003; IFEN, 2006; Arias-Estévez, et al., 2008; Hildebrandt, et al., 2008;).

El objetivo presente estudio es evaluar el efecto que producen los herbicidas terbutilazina y glifosato en la eficiencia fotosintética de olivos de 3 años de edad. Se ha estudiado también el efecto de la adición al suelo de un residuo procedente de

almazara sobre la adsorción de estos herbicidas, y si la eficiencia fotosintética de los olivos se ve afectada por el residuo.

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 la temperatura o humedad en el medio, el funcionamiento del aparato fotosintético de las plantas se desarrolla correctamente, mientras que cuando se presentan temperaturas extremas, sequía e inundación, escasez de nutrientes, contaminación por metales pesados (REF Mateos-naranjo) o contaminación por plaguicidas o residuos orgánicos (Catriona et al., 2003), pasan a ser generadores de estrés para las plantas. En especial, el uso de plaguicidas puede llegar a reducir capacidad de adquirir recursos en un cultivo y, por tanto, mermar su productividad (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 como calor, o puede ser re-emitida como fluorescencia, evitando así daños estructurales permanentes en los sistemas fotosintéticos, causados por el exceso de energía. Si se producen modificaciones en la función fotosintética como respuesta a cambios ambientales, se ocasionarán variaciones detectables en la emisión de fluorescencia. 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 estrés ambiental desaparece. Es por ello que los cambios en la fotoquímica de un organismo vegetal o de una hoja del organismo, consecuencia de la exposición a un factor estresante se pueden cuantificar a través de 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 (marcadores no destructivos de estrés en plantas).

La técnica de **fluorescencia de la clorofila α** se basa en la cuantificación de ese exceso de energía recibido que es re-emitido como fluorescencia. Como se ha dicho anteriormente, a pesar de la alta eficiencia en los organismos diana, los herbicidas pueden ocasionar fitotoxicidad no específica (Galmés et al., 2010). En estudios anteriores se ha observado que la reducción en la eficiencia fotosintética de las plantas de los cultivos como consecuencia de factores estresantes medioambientales (REF). El análisis de la fluorescencia de la clorofila α constituye una herramienta valiosa que permite explicar los niveles de estrés fisiológico de la vegetación antes de que aparezcan síntomas internos irreparables (Castillo et al., 2000; Figueroa et al., 2003). Su cuantificación es una medida precisa y confiable de la temprana de detección de estrés. Además constituye un método rápido y sencillo que no afecta negativamente a la planta.

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 a pH 7 y 20 °C. Terbutilazina es una base débil con 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 CO₂.

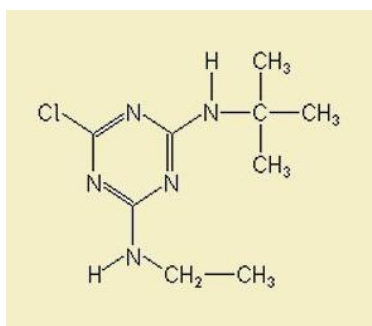


Figura IV.1. Estructura química de las moléculas de terbutilazina

Persiste en la parte superior del suelo, controlando una amplia variedad de malas hierbas a dosis comprendidas entre 0.6 y 3 kg de sustancia activa por ha. Si bien 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 ingrediente activo por hectárea y año. El producto comercial usado en este ensayo ha sido CUÑA (terbutilazina 500 g l⁻¹ en forma de suspensión concentrada suministrado por Spicman Inagra S.A.)

IV.3.1.1. Glifosato

Glifosato (*N*-(fosfonometil) glicina) (Figura IV.2.) es un herbicida sistémico perteneciente a la familia de las glicinas. Se sintetizó por primera vez en 1974. Aparece en forma de cristales incoloros, con peso molecular de 169.1 g mol⁻¹, 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 y fenilalanina y tirosina, junto a otros importantes productos químicos endógenos como lignina, fenoles, y ácido indolacético. Es el único 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).

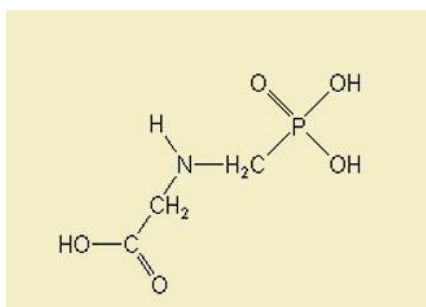


Figura IV.2. Estructura química de las moléculas de glifosato

Para realizar estudios de adsorción bajo condiciones de laboratorio se usó glifosato marcado radiactivamente (P-Metileno-C¹⁴) 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 GLIFOSATO (Glialka 36 g de componente activo por litro, Presmar S.L. España).

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 (S). 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 µmol m⁻² s⁻¹ y una humedad relativa de entre 40-60% (Figura IV.3).

Se realizaron cinco tratamientos distintos por triplicado: macetas de olivo con terbutilazina a la dosis de 3 kg ha⁻¹ (T), macetas con glifosato a un dosis de 3 kg ha⁻¹ (G), macetas a las que se le añadió alperujo (AJ) al suelo a la dosis de 10 Mg ha⁻¹, y macetas con terbutilazina+AJ (TAJ) y macetas con glifosato+AJ (GAJ). Además se usaron tres macetas sin herbicida ni residuo orgánico como controles (C) a lo largo del ensayo.

Para los tratamientos AJ, TAJ y GAJ 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. La longitud de cuatro ramas por maceta y de dos hojas por cada una de estas ramas fue medida y analizada estadísticamente, con el objeto de constituir triplicados con biomasa similar para cada uno de los cinco tratamientos.



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

IV.3.3. Suelo y residuo orgánico

El contenido en carbono orgánico (CO), pH y textura de suelo contenido en 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 es el alperujo Jaén (AJ), con un contenido en materia orgánica 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 en el capítulo II.

Tabla IV.1. Propiedades físico-químicas y textura de del suelo contenido en las macetas, sin enmendar (S) y enmendado al 5% y 10 % (p/p) con AJ (S5AJ y S10AJ, respectivamente).

Suelos	CO (%)	pH (H₂O)	ARCILLA	LIMO (%)	ARENA
S	1.9	7.4			
S5J	3.7	7.1	18	22	59
S10J	5.4	6.7			

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 tratadas de forma separada con 10 ml de soluciones terbutilazina y de glifosato a las concentraciones iniciales (C_i) de: 1, 5, 10 y 20 μM en una solución 0.01 M. Los extractos de terbutilazina y glifosato 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 de terbutilazina fue una mezcla de acetonitrilo/agua Mili-Q (50:50) y se detectó a la longitud de onda de 222 nm en el HPLC, mientras que glifosato se cuantificó 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 de tratamiento con el objeto de conocer la respuesta fisiológica de los olivos en un periodo corto y medio de tiempo de exposición al tratamiento. 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}), calculadas como (Werner et al., 2002):

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

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

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

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

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 coincidiendo con las medidas de fluorescencia de la clorofila a . Se determinó la tasa de fotosíntesis neta (A), la concentración de CO_2 intercelular (C_i) y la tasa de conductancia estomática al CO_2 (G_s) de $365 \mu\text{mol mol}^{-1}$, a una temperatura de entre 25-28 °C, una

humedad relativa del aire de $50 \pm 5\%$ y a una intensidad luminosa de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

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.

$$A = \frac{F[(\text{CO}_2)_e - (\text{CO}_2)_s]}{S} \times \frac{P}{0.082(273 + T) \times 10^4 \times 60} \quad [\text{Ecuación IV.5}]$$

$$1 = \frac{1.61}{G_s} + \frac{1.37}{G_{\text{H}_2\text{O}_{\text{est}}}} + \frac{1.37}{G_{\text{H}_2\text{O}_{\text{cl}}}}$$

$$C_i = C_e - \frac{A}{G_s}$$

F= flujo (lmin^{-1})

$(\text{CO}_2)_e = \text{CO}_2$ a la entrada de la cámara ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)

$(\text{CO}_2)_s = \text{CO}_2$ a la salida de la cámara ($\mu\text{mol mol}^{-1}$).

S= superficie fotosintética (cm^2) calculada para cada hoja. La superficie de hoja introducida en la cámara del IRGA se calculó mediante su aproximación al área de un trapecio ¿? Preguntar enrique.

P= presión atmosférica (atmósferas).

T= temperatura del aire en la cámara ($^{\circ}\text{C}$).

$G_{\text{H}_2\text{O}_{\text{est}}} =$ conductancia estomática al agua ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

$G_{\text{H}_2\text{O}_{\text{cl}}} =$ conductancia de la capa límite al agua ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

$C_e =$ concentración de CO_2 externo (en la cámara) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$).



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. Adsorción

Las isothermas 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 al 5% y 10% (p/p) (S5AJ y S10AJ) se muestran en la [Tabla IV.2.](#)

Tabla IV.2. Coeficientes de adsorción para terbutilazina (T) y glifosato (G) en el suelo sin enmendar (S) y enmendados al 5% y 10% con alperujo (S5AJ y S10AJ).

Herbicidas	Suelos	K_f ($\text{mg}^{-1/n_f} \text{ kg}^{-1} \text{ mL}^{1/n_f}$)	R^2	$1/n_f$
T	S	0.964(0.622/1.490) ^a	0.85	0.57±0.23 ^b
	S5AJ	1.386 (1.089/1.763)	0.93	0.69 ±0.13
	S10AJ	7.680 (5.344/9.680)	0.89	0.86 ±0.25
G	S	5.130 (4.798/5.496)	0.99	0.83 ±0.09
	S5AJ	5.440 (5.288/5.640)	0.99	0.81 ±0.04
	S10AJ	5.411 (5.190/5.633)	0.99	0.78 ±0.05

^aLos números en paréntesis corresponden con los error estándar (SE) respecto a la media de K_f . ^bLos números corresponden con la media $1/n_f \pm \text{SE}$. (PONER R^2 DESPUES DEL $1/n_f$)

Glifosato se adsorbe al suelo sin enmendar (S) alrededor de 5 veces más que terbutilazina, sin embargo no se detectaron diferencias significativas en la adsorción de glifosato al enmendar con alperujo a las dosis de 5% y 10% (p/p) ([Tabla IV.2.](#), [Figura IV.6.](#)). Esto se atribuye a que glifosato se adsorbe en general fuertemente al suelo, principalmente a los coloides inorgánicos del mismo ([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, al enmendarse al 5% y 10% (w/w) (S5AJ y S10AJ), respectivamente ([Tabla IV.2.](#)). Terbutilazina presenta una baja solubilidad en agua (8.5 mg l^{-1}) y mayor afinidad por la materia orgánica, que explica el aumento de adsorción al enmendar. Esto se ha demostrado en trabajos anteriores ([Celis et al., 1998](#); [Cabrera et al., 2007- 2009](#); [Krawariti et al., 2010](#)). Mientras mayor sea la adsorción, menor cantidad de moléculas de terbutilazina pueden ser absorbidas por la plantas, reduciendo o evitando poder desencadenar un efecto tóxico sobre las mismas.

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 ocurre preferentemente en la fase mineral del suelo (principalmente en minerales de arcilla con carga variable), siendo fuertemente adsorbido a estos componentes y convirtiéndose en una molécula casi inmóvil en el perfil del suelo (Vereecken. 2005; Mamy y Barriuso, 2007; Borggaard y Gimsing, 2008). Cuando el pH de la solución del suelo se encuentra entre 4 y 8, glifosato presenta gran afinidad por cationes trivalentes como Fe^{3+} y Al^{3+} , por lo que compite por los mismos sitios de adsorción que el fósforo (Laitinen et al., 2009). Esto explica que el aumento en contenido de carbono orgánico no afecte tanto a la adsorción del glifosato respecto a la terbutilazina. Sin embargo, Mc Bride. (1991) y Yu y Zhou. (2005) vieron que el glifosato se puede unir a la materia orgánica a través de puentes de iones metálicos a pesar de su alta solubilidad en agua (10.5 g l^{-1}). Los suelos de las macetas con pH entre 6.7 y 7.4 (Tabla IV.2) y valores de P Olsen (P fácilmente extraíble de la solución del suelo) mucho mayores que los presentados por Simonsen et al. (2008) en un estudio con un suelo agrícola, la alta adsorción de glifosato revela que la competencia por este elemento no determina su adsorción a las partículas del suelo (Tabla IV.2.).

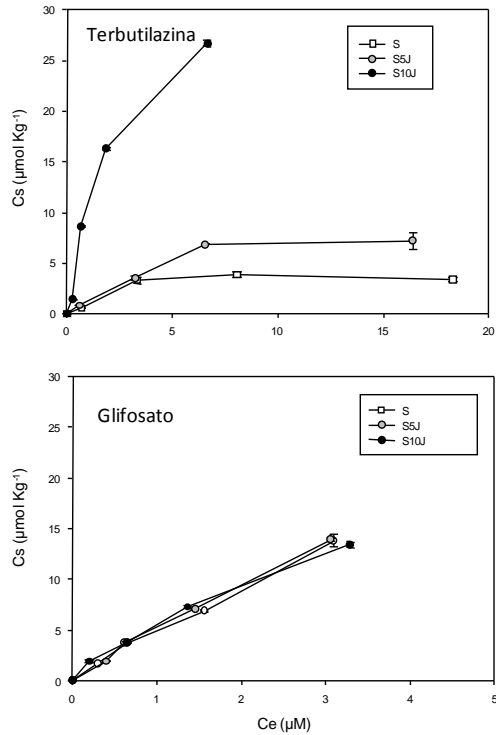


Figura IV.6. Isotermas de adsorción de terbutilazina (arriba) y de glifosato (abajo) en el suelo (S) sin enmendar y enmendados al 5% y 10% con alperujo (S5AJ y S10AJ).

IV.4.2. Fluorescencia

La eficiencia fotoquímica potencial del PSII ($F_v F_{m-1}$), la eficiencia real del PSII (Φ_{PSII}) y el quenching no fotoquímico (NPQ) medidos al mediodía para los tratamientos control, AJ, T, G, TAJ y GAJ, 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 ($F_v F_{m-1}$) al amanecer tras 60 días en *Olea europaea* L. se muestra en la [Figura IV.8](#). No se muestran los datos de $F_v F_{m-1}$, 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, $P > 0.05$).

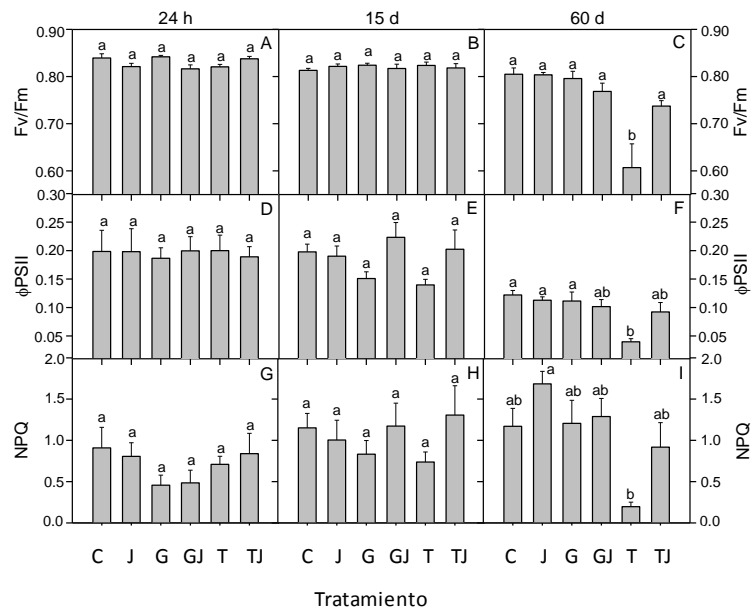


Figura IV.7. Eficiencia fotoquímica potencial del PSII ($F_vF_m^{-1}$) (A-C), Eficiencia real del PSII (Φ_{PSII}) (D-F), y quenching no fotoquímico (NPQ) (G-I) medido al mediodía en los tratamientos de *Olea europaea* tratados con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GAJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TAJ) 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.), sin embargo, tras 60 días, los olivos tratados con la terbutilazina (T) expresaron efecto fitotóxico estadísticamente significativo, mostrando valores más bajos al mediodía (0.60 respecto a 0.80 para el control; 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 menos partículas de herbicida.

Aunque el aumento de carbono orgánico al enmendar el suelo no afectó a la adsorción de glifosato (Tabla IV.1.; Figura IV.6.), éste mostró mayor adsorción comparado con terbutilazina (a excepción del suelo enmendado al 10% donde es mayor la adsorción de terbutilazina que glifosato), lo que indica que ésta fuerte adsorción de glifosato, junto con la baja cantidad adsorbida por las raíces (Coupland y Lutman., 1982; Rodrigues et al., 1982; Laitinen, et al., 2007) hace que glifosato esté

menos disponible 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.).

Los bajos valores de F_vF_{m-1} para los olivos tratados con la terbutilazina, al mediodía tras 60 días de experimento (Figura IV.7.) 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), anteriormente observado 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 contenidas en los cloroplastos de los olivos, y se traduce en un efecto bien a corto plazo y a la vez reversible, como por ejemplo encontró Popov y Cornisa. al exponer a cuatro malas hierbas a concentraciones altas del herbicida atrazina, que es lo que se denomina fotoinhibición dinámica, o bien 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).

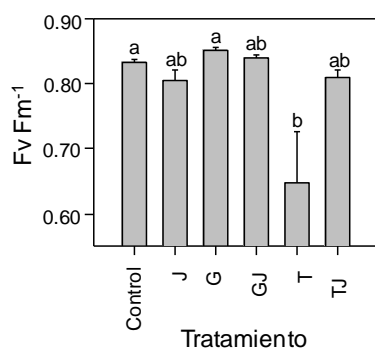


Figura IV.8. Eficiencia fotoquímica potencial del PSII (F_vF_{m-1}) (A-C), medida al amanecer en los tratamientos de *Olea europaea* tratados con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GAJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TAJ) tras 60 días. Los valores representan la media \pm SE, $n = 9$. Las distintas letras indica que las medias son significativamente diferentes entre sí (Tukey test, $P < 0.05$).

Por el contrario a Catriona et al. (2003) que 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, $P < 0.0001$)). Mostrando 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 TAJ 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, al mismo tiempo que se enriquece el suelo en materia orgánica.

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 menores 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 en 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.9.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. 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 *Zoostera capricorni*. Mientras que los olivos T mostraron la mayor fotoinhibición crónica, en presencia de alperujo (TAJ) este efecto se reducía. Por el contrario, los olivos G y GAJ mostraron una respuesta a la fotoinhibición similar al control.

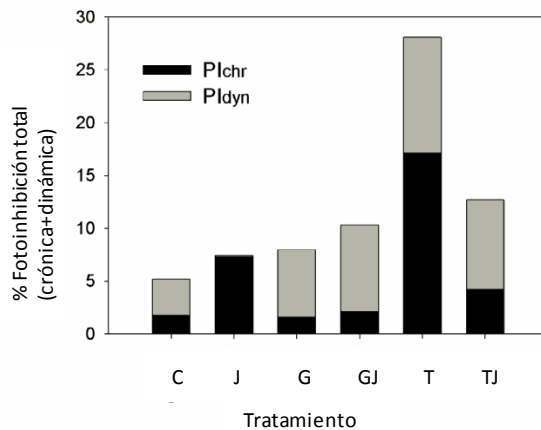


Figura IV.9. Daño crónico (barras negras) y daño dinámico (barras grises) fotoinhibición de las hojas de adultos *Olea europea* tratados con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GAJ), con terbutilazina (AT) y con terbutilazina y alperujo (TAJ).

IV.4.3. Intercambio gaseoso

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, TAJ y GAJ. 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 porque estos estudios no incluyen el análisis de pigmentos de las hojas.

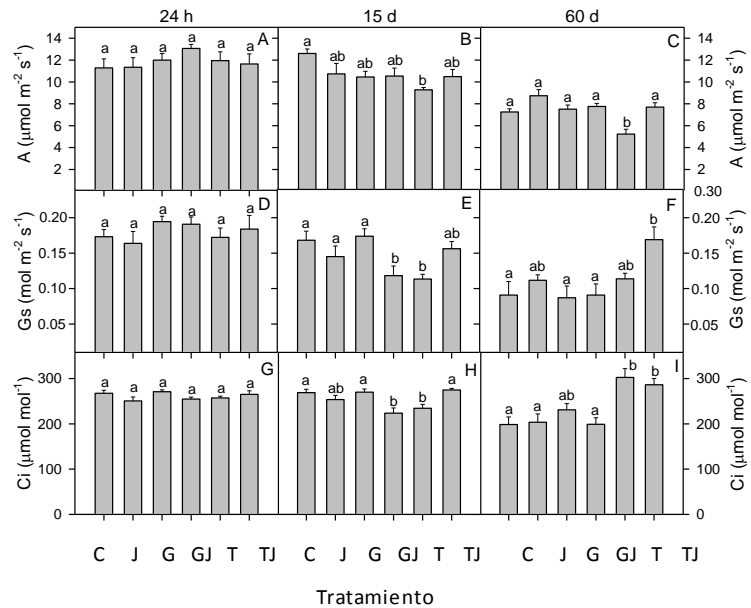


Figura IV.10. Tasa fotosintética (A) (A-C), conductancia estomática (Gs) (D-F), y concentración intercelular de CO_2 (Ci) (G-I) en *Olea europaea* tratada con alperujo (AJ), glifosato (G), y con alperujo y glifosato (GAJ), con terbutilazina (T) y con terbutilazina y alperujo (TAJ) tras: 24 horas (A, D, G); 15 días (B, E, H); y 60 días (C, F, I). Los valores representan la media \pm SE, $n = 9$.

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 no se encuentran diferencias significativas para los olivos TAJ, como sea visto en párrafos anteriores.

Además la adición de AJ incrementa GS en ambos casos (TAJ y GAJ) (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 olivos T.

Para los olivos tratados con el glifosato, no se encontraron diferencias significativas para A , G_s ni C_i durante el experimento, pero en caso de GAJ, 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 no afecta a la actividad biológica del herbicida (Cañero et al., 2010) y mejora las propiedades del suelo (Alburquerque et al., 2009). Además, está 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 la aplicación al suelo de terbutilazina es una fuente indirecta de fitotoxicidad para los olivos, reduciendo la eficiencia fotosintética que fue contrarrestada por la adición de OW a los suelos, debido al aumento de la adsorción del herbicida a las partículas de suelos, siendo de esta manera disponible para ser absorbido por las plantas. Los resultados obtenidos pueden ser útiles para el manejo de estrategias que engloban el uso de herbicidas en el cultivo del olivar.

IV.6. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Aragón, R., García, J. L., Morell, I., Hernández, F., Tuñón, J; Pozo, O; Grimalt. **2001**. Investigación de plaguicidas en las aguas subterráneas de la vega media del Segura (Murcia). Comunicación VII Simposio de hidrología. Asociación Española de la hidrología subterránea.
- 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. and 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., 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, 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.
- 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.
- 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.
- Cornejo, J., Hermosín, M.C., Celis, R., Cox, L. 2005. Methods to determine sorption of Pesticides and Other Organic Compounds. In: *Soil-Water-Solute process characterization. An integrated approach*. Editorial CRC PRESS 435-463.
- Coupland, D. and Lutman, P.J.W. Investigations into movement of glyphosate from treated to adjacent untreated plants. *Ann. Appl. Biol.* **1982**, 101, 315-321.
- Dalton, R. and 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.
- 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 terbuthylazine. *J. Environ. Qual.* **2008**, 36, 1793-1802.
- El cultivo del Olivo. 5ªEdi. Editores D.Barranco, R. Fernández.Escobar, L, Rallo. **2004**. Coedición Juna de Andalucía y Consejería de Agricultura y Pesca.
- Enciclopedia Mundial del Olivo. Consejo oleícola internacional, Madrid, **1996**. Plaz & Janés Editores, S.A. Barcelona.
- Flexas, J. and Medrano, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revised. *Ann. Bot.* **2002**, 89, 183-189.

- Franz, J.E., Mao, M.K., Sikorski, J.A. **1997**. Glyphosate: an unique global herbicide. American Chemical Society Monograph 189. Washington DC.
- 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 and Environ.* **2011**, 34, 2, 245-260.
- Haynes, D., Ralph, P., Prange, J., Dennison, B. The impact of the herbicide diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. *Mar. Poll. Bull.* 2000, 41, 288-293.
- 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.
- IFEN (**2006**). The pesticides in the water, data of 2033 and 2004. Rapport of French Institute of the Environment. Orleans France, 40 p.
- Kravvariti, K., Tsiropoulos, N.G., Karpouzas, D.G.. Degradation and adsorption of terbuthylazine and chlorpyrifos in biobed biomixtures from composted cotton crop residues. *Pest. Manage. Sci.* **2010**, 66, 1122-1128.
- 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. Liñán (ed) Madrid.
- 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.

- Mamy L., y Barriuso, E. Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaces with the introduction of glyphosate resistant crops. *Chemosphere*. **2005**, 61, 6, 844-55.
- MARM, **2012**.
- Maxwell, K. and 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., Sommers, L.E. **1982**. *Methods of Soil Analysis, Part 2*; American Society of Agronomy. Wisconsin.
- 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., Cambrollé, 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.
- 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.
- Saladin, G. and 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.
- 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 terbuthylazine in core and packed soil columns. *Chemosphere*. **2002**, 47, 409-415.
- Tomlin, C.D.S. (Ed.) **2006-2007**. The e-Pesticide Manual. A World Compendium. Version 4.0. Fourteenth ed. BCPC, Surrey, U.K.
- Vereecken, H. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Manag., Sci.* **2005**, 61, 1139-1151.
- Von Caemmerer, S. y 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.
- Williams, S.L., Carranza, A., Kunzelman, J., Datta, S., Kuivila, K.M. Effects of the herbicide diuron on Cordgrass (*Spartina foliosa*) reflectance and photosynthetic parameters. *Estuaries Coasts*. **2009**, 32, 146-157.

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](#); [Grenni et al., 2012](#)). Estos microorganismos se ha calculado que 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](#)). Son característicos por su ubicuidad en toda clases de ecosistemas, tanto terrestres, acuáticos como aéreos. Esta ubicuidad característica, ha proporcionado a estos organismos 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, las técnicas cultivo-dependientes 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](#)), para aumentar la fiabilidad de este tipo de estudios.

La introducción de técnicas moleculares en la tecnología del mundo microbiano en los años 80, ha provocado un aumento exponencial en la obtención de información sobre la diversidad/composición microbiana de todos los medios 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 técnicas de “huella molecular” como DGGE (Electroforesis en gel en gradiente desnaturizante) 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 técnica DGGE, es una de las técnicas moleculares más usadas en 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). Más allá del DGGE, nos encontramos con la Pirosecuenciación. Esta técnica proporciona información de todas las especies activas biológicamente o no de una muestra, en menos de 5 h. La técnica de Pirosecuenciación permite secuenciar ADN basándose en la síntesis de esta molécula (Ronaghi., 2001). Hasta hace unos años la secuenciación se realizaba usando el método Sanger (Sanger et al., 1977), el cual resolvía 67000 bases por hora. Mientras que el descubrimiento de la Pirosecuenciación permite resolver casi 4.5 millones de bases por hora. Esta reveladora técnica constituye una puerta al más completo conocimiento hasta ahora de las comunidades microbianas de los ecosistemas naturales.

La importancia de los microorganismos de los suelos radica en su implicación en los procesos de transformación de materia orgánica, o 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 et al., 1978; 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; Grivan et al., 2003-Girvan et al., 2005). Las poblaciones microbianas de estos ecosistemas 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 en la comunidad microbiana de los suelos (Viti et al., 2008; Wu et al., 2008; Caraciolo et al., 2010).

Al incorporarse al sistema suelo, además de afectar a las especies diana, los plaguicidas afectan a microorganismos del suelo (Perucci et al., 2000; Vichetti et al., 2002), y este impacto puede ser tanto positivo, negativo o simplemente no afectar a las comunidades microbianas del suelo. Singh y Ghoshal. (2010) han comprobado que la adición de Butacloro reduce la 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 han revelado un aumento en la respiración, que a su vez implica un crecimiento de la población bacteriana (Haney et al., 2000).

Se ha visto que la aplicación de plaguicidas a los suelos reduce la diversidad microbiana pero puede aumentar la diversidad funcional de las comunidades. En ocasiones la población microbiana se afecta por la aplicación de plaguicidas pero tras un periodo de aclimatación, la población recupera su actividad normal o incluso a veces, se ve incrementada (Fließbach y Mader, 2004; Niewiadomska, 2004). Gonod et al., 2006 revelaron modificaciones en la estructura de comunidades en respuesta de la aplicación de 2,4-D en estudios de DGGE y que éste efecto desaparecía tras 7 días de tratamiento. En otros estudios se ha revelado efecto tóxico irreparable sobre la diversidad microbiana en los suelos (Ingram et al., 2005; Wang et al., 2006).

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 y 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-metolacoloro sobre poblaciones microbianas del suelo tras un periodo de tiempo determinado de incubación, aislar bacterias de los suelos a diferentes dosis de herbicidas con el fin de obtener organismos tolerantes o resistentes a los mismo y por último, 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 que se describen 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 está 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) 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, ya que era el único suelo con posibilidad de conseguir muestras frescas 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, T10M) y por otro lado muestras del suelo T10J previamente incubadas con MCPA y S-metolacloro 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 0.5g de las muestras de los alperujos y muestras de suelo sin enmendar (S, C y T), de los alperujos AJ y AM 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) (ANEXO) para extracción de ADN en muestras de suelo siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez extraído las muestras se conservaron a -20°C para sus posteriores 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).

El método de extracción consiste en lisar 0.5g 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, pH4.3) y se agita a 5.5 ms^{-1} durante 30 s en un sistema de agitación rápida (Precellys 24-Lysis&homogenation, Stretton Scientific Ltd.). Estas muestras se centrifugan a 13500rpm 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 13500rpm 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 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, que se mezcló e incubó a 37°C durante 25 min. Transcurrido ese tiempo se añaden 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 y antes y después de tratamientos de 45 días y 72 días con MCPA y S-metolacoloro, respectivamente (T, T10J, T10J-MCPA y S-metolacoloro) y las muestras de alperujos (AJ y AM). Para ello, se puso a interaccionar 1g 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 10⁻⁴ y 10⁻⁶ para los alperujos AJ y AM, respectivamente. Los extractos se sembraron en medio TSA (Ver composición en ANEXO V.*), 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 el medio, 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 más idónea para el crecimiento de los microorganismos de estos suelos.

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 confirmó que las extracciones de ADN y ARN de tanto las muestras de suelo, como de las colonias aisladas, fueron satisfactorias. Para ello se cargó 5µl 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 (Ver composición en ANEXO V.?) durante 20 minutos a 120 V. La migración de la banda de ADN extraído se visualizó con la ayuda de un transliluminador de emisión UV. 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 100pb) de los fragmentos de restricción del ADN del Fago lambda resultado de la digestión con endonucleasa Hlind III o EcoRI/HindIII.

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 los éstos, los microorganismos más abundantes del suelo, y no de los hongos (mohos y levaduras) que también se estudian a través de estas técnicas pero a partir de ARN 18S. Para ello se usaron los cebadores universales del domino Bacteria (Tabla V.1.) que fueron suministrados por Invitrogen, y se diluyeron con agua desionizada hasta una concentración stock de 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>	CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGG
P3		GGGCACGGGGGCCTACGGGAGGCAGCA
P341F		ATTACCGGCTGCTGG
P907R	<i>DGGE</i>	CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGG
		GCACGGGGGGCCTACGGGAGGGAGCAG
		CCGTCAATTCCTTTRAGTTT

Todas las reacciones de PCR se completaban hasta un volumen total de 50 μ l conteniendo: 25 μ l Master Mix (50 unidades ml^{-1} de la polimerasa Taq DNA en una reacción tampón (pH=8.5), 400 μ M de cada uno de los dinucleótidos (dNTP), 3mM MgCl_2), 10 μ M de cada cebador, 2.5 μ l de Dimetil sulfóxido (DMSO) (Fisher Scientific Loughborough, Leicestershire, UK), 2 μ l de albúmina de suero bovino (BSA 10mg ml^{-1} , SIGMA, St Louis, MO, USA) y 2 μ l de ADN molde. Estos 50 μ l 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.

Cebadores tal y tal			Cebadores tal y tal		
TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (segundos)	NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (segundos)	NÚMERO DE CICLOS
95	60	1	95	60	1
95	45		72	45	35
55	30	35			
72	45		72	45	
72	600	1	45	350	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 una electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) usando el Sistema DCode (Bio-Rad, Hertfordshire, United Kingdom) (Muyzer et al., 1993). 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.

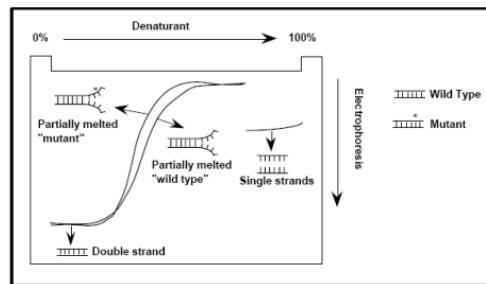


Figura V.1. Fundamento de la desnaturalización en gel de poliacrilamida y gradiente desnaturalizante creciente.

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 rango 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 S20 (solución desnaturalizante al 20%) y S70 (solución desnaturalizante al 70%) necesarias para la formación del gel

-S20: 16 ml de S0 y 4 ml de S100

-S70: 8 ml de S0 y 12 ml de S100

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 1.5mm, entre las cuales se formaría 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 los 40 ml de la mezcla de las dos soluciones S20 y S70 se hubieron mezclado e incorporado 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 341Fy 907R) se cargaron en los pocillos del gel (25 µl mezclados con 5 µl tampón de carga 6x (1:1) y después se aplicó una carga eléctrica de 150V durante 10 min a 60°C. Tras esto, se dejó una carga eléctrica de 60V durante 16 horas. Los geles se observaron 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%)
<i>Acrilamida/Bis (37.5:1)(40%)</i>	30 ml	30 ml
<i>TAE (50x)</i>	2 ml	2 ml
<i>Formamida desionizada</i>	-	40 ml
<i>Urea</i>	-	42 g
<i>H2O destilada</i>	<i>(hasta completar 100ml)</i>	<i>(hasta completar 100ml)</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 usando el Transiluminador Gene Flash UV imager (Syngene BIO imager, Cambridge, UK). Bandas seleccionadas de estos geles DGGE fueron extraídas del gel y entonces amplificadas por PCR, y limpiadas (QIAquick, Qiagen) antes de mandarse a secuencias. 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).

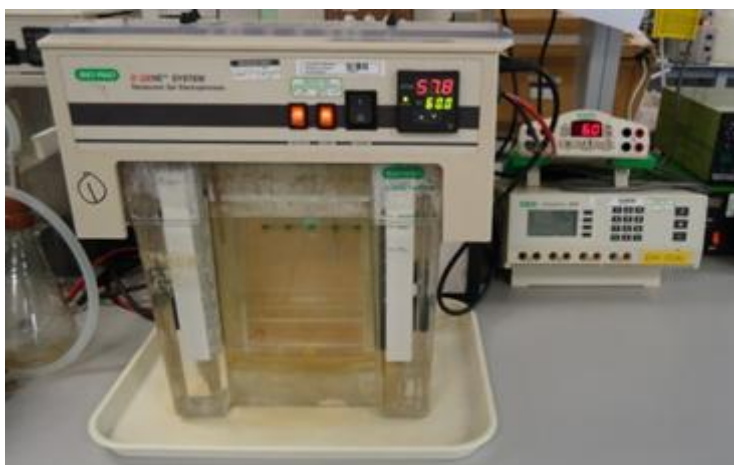


Figura V.2. Equipo de electroforesis D Gene System-Denaturing Gel Electrophoresis para DGGE (BIO RAD).

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

Para este estudio se prepararon placas de Petri con medio TSA (ANEXO V.) con glucosa como fuente de carbono y placas de Petri con TSA con herbicida como única fuente de carbono, con una solución de herbicidas a las concentraciones de 0, 2, 3, 5, 7, 10 kg ha^{-1} . Para ello se mezcló 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 enfriar. 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 los residuos.

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

Una vez se obtuvieron cepas que toleraban y 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 5ml del medio de 250ml de cultivo TSA con los herbicidas como fuente de carbono líquido inoculado con las distintas cepas, que se centrifugaba y se filtraba previamente.

V.3.12. Secuenciación

El ADN amplificado y purificado (10µl de la muestra junto con 5.5 pmol del cebador 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 NCBI (National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

En este estudio se consideró que las secuencias que diferían entre sí menos de 1% pertenecía 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 y sólo se consiguió obtener producto en los casos: S, S congelado, S10J S10M y para los suelos tratados con MCPA Y S-metolacloro (T10J-MCPA y T10JS-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; Mettel, et al., 2010;) y sólo con el método de Griffiths et al. (2000) modificado, se consiguió extraer ARN de las muestras en estudio. Se inocularon muestras de suelo (T, C, T110J, C10J, T10M, C10M) durante 96 h a 37°C aplicando un volumen de agua hasta alcanzar la capacidad de retención del suelo, inoculando algunas muestras con organismos previamente cultivados en laboratorio como controles positivos y con muestras de suelo frescas colectadas de un jardín en el momento del estudio. De las muestras inoculadas en laboratorio no se obtuvo ARN, mientras que de las muestras de suelo fresco de un jardín, sí (estos datos no se presentan). El método de extracción fue efectivo pero no funcionó con nuestras muestras.

Como se ha dicho con anterioridad, el ARN extraído del suelo representa la población biológicamente activa de éstos en el momento de la extracción Griffiths et al. (2000). El proceso de extracción de ARN es más complejo que el de ADN, ya que las moléculas de ARN presentan alta sensibilidad a la degradación por las nucleasas. Las nucleasas que actúan específicamente sobre el ARN, las ARNasas, son abundantes en las muestras biológicas y también están presentes en las manos y en general por toda la superficie de nuestros cuerpos (Mettel et al., 2010).

Las muestras de ARN 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 RIN.

MUESTRAS	CONCENTRACIÓN (ngµl ⁻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

*error estándar respecto a la media

Se encontró que el suelo SCONGELADO sufrió una reducción significativa de la concentración de ARN respecto al S FRESCO (Tabla V.4.), lo que se atribuyó al proceso de congelación, el cual se ha visto que 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 en el suelo congelado. El mayor número RIN cuantificado se encontró para el único suelo fresco (SFRESCO), 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.4.1. 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 T10JS-metolacloro). Por otro lado, 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.

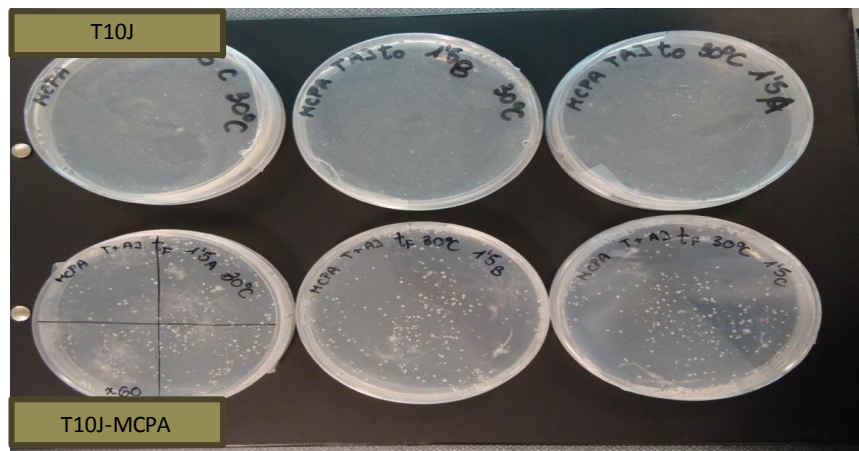


Figura V.3. Placas medio TSA inoculadas con suelo T10J y T10J-MCPA tras 8 días a 30°C y oscuridad.

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), parecía en mayor número que las blancas.

Tabla V.4. Número medio de colonias 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-METOLACLORO	38±7	41±7	79

*Error estándar respecto a la media.

Esto se atribuyó a la presencia de herbicida, 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 kgha⁻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.*). La incubación con el herbicida favoreció el crecimiento de estos organismos frente a los organismos formadores de colonias blancas.

Tabla V.5. Número de colonias de color blanco y azul en placas con concentraciones crecientes de MCPA.

MCPA (kgha ⁻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 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 constituían 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.6. Presencia (X) o ausencia (-) de las cepas (A1-A24) secuenciadas en los suelos T0, T10J, T10MCPA y T10JS-metolacloro.

cepa	IDENTIDAD(%)	Identificación cepa	T0	T10J	T10J MCPA	T10J S-metolacloro
A1	99	<i>Achromobacter piechaudii</i>	X	X	X	X
A2	99	<i>Achromobacter xylooxidans*</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)

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.).

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

IDENTIDAD			Tolerancia a				
Cepa	Nombre científico		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> (<i>Sinorhizobium morelense</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 BLUE</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*

Además, no se encontraron diferencias entre los individuos secuenciados entre los suelos incubados con MCPA y con S-metolacloro. La incubación a medio plazo no es suficiente para favorecer la presencia de organismos especializados en la degradación de estos herbicidas. Mientras que en un estudio de [Singh y Ghosal. \(2010\)](#), la aplicación del herbicida Butalacloro por un lado aumentó la producción del cultivo, pero se vio reducida, sin embargo, la actividad biológica total del suelo. Este efecto desaparecía cuando se aplicaba enmienda orgánica al suelo junto con el tratamiento de herbicida.

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

Identificación cepa	IDENTIDAD (%)	Nombre científico	Tolerancia a S-metolacloro (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> (<i>Sinorhizobium morelense</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 BLUE</i>	T	T	T	NT	NT
A24	99	<i>Duganella nigrescens</i>	NT	NT	NT	NT	NT

^aTambién identificada por *Alcaligenes xylosoxydans*

Tampoco se encontraron diferencias importantes entre los organismos que toleraban (T) concentraciones altas de MCPA y S-metolacoloro (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 xylosoxydans*, *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 xylosoxydans*, *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 *Oxalobacteraceae sp.* y *Janthinobacterium sp.* en muestras de residuos orgánicos (Ref cuaderno negro meter). *Achromobacter piechaudii*, *Achromobacter xyloxydans*, pertenecen a un género se ha encontrado engloba organismos con capacidad de degradar moléculas aromáticas y se han aislado de suelos contaminados con metales pesados (Ma et al., 2008). *Acinetobacter sp.* puede usar S como fuente de energía y que se ha aislado anteriormente de compost. Individuos del género de *Alcaligenes* se ha encontrado en residuos de lodo de depuradoras (Tanio et al., 1981) y se ha comprobado que es capaz de degradar fenantreno (Kiyahara et al., 1982). También se ha encontrado que puede degradar moléculas orgánicas en suelos arenosos como 4-clorofenol (Balfanz y Rehm. 1991). Extractos de los alperujos también se inocularon en placas Petri con medio TSA y se caracterizó la morfología de las UFC (Figura V.4. y Tabla V.10).

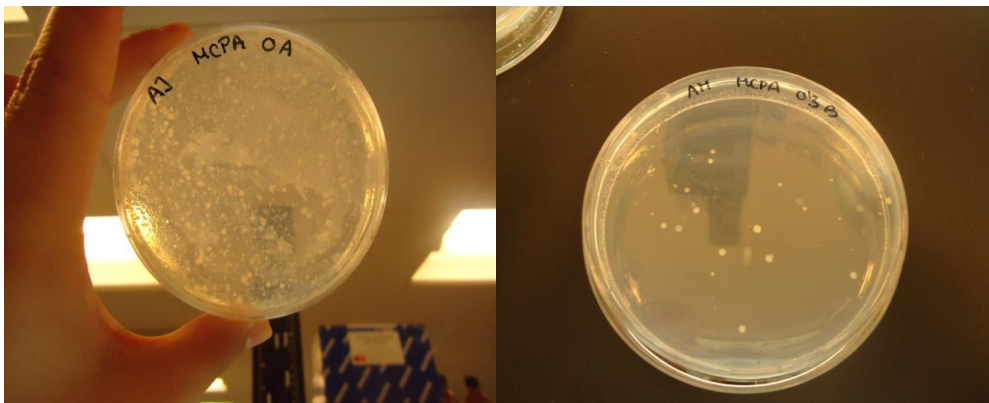


Figura V.4. Placas con medio TSA inoculado con extractos de los alperujos AJ (izquierda) y AM (derecha).

Resultado de la inoculación de extracto de los alperujos, observamos alta variedad de microorganismos respecto a la encontrada en los suelos (Tablas V.9. y V.10.). Los residuos de almazara presentan alto contenido en CO (81% para AJ y 91% para AM) y esto 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, coincidiendo con el mayor contenido en CO (91% para AM). Además, el pH de AM (4.8), más ácido que el de AJ (6.8), constituye 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 del proceso de compostaje, más avanzado en este alperujo que en el caso de AM.

Tabla V.9. Morfología y número de UFC en placas TSA inoculadas con extracto de los alperujos AJ y AM.

Dosis MCPA (kg ha ⁻¹)	Tipos colonias AM (ufc g ⁻¹ de alperujo)				MEDIA
	rosa	amarilla	azul	blanca	
0	3	6	-	RESTO	23±1
0,3	3	3	2	RESTO	22,5±4.5

0,6	4	4	-	RESTO	27,5±1.5
1	3	4	-	RESTO	33,5±1.5
Dosis S-metolacloro (kg ha⁻¹)	rosa	amarilla	azul	blanca	MEDIA
0	2	-	3	24	24±0.5
0,3	-	-	-	16	16±1
0,6	-	-	-	14	14±2
1	-	-	-	16	16±0.5

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

Dosis MCPA (kg ha⁻¹)	Tipos colonias AJ (ufc g⁻¹ de alperujo)			
	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	-	-	37±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

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 (se considera que corresponden con organismos que al menos están presentes un 1% del total en muestra de suelo (Casamayor et al., 2000) en los perfiles de DGGE para estos suelos. 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.).

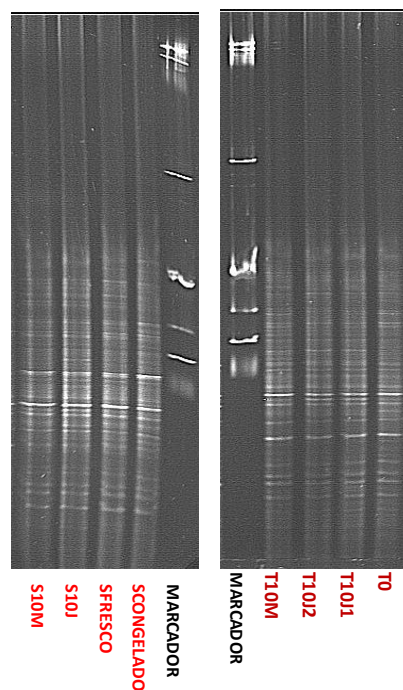


Figura V.5. Perfil DGGE comparando ADN extraído del suelo T (T0) sin enmendar y enmendado con AJ y AM (T10J y T10M) (derecha) y del suelo S congelado, fresco y enmendados con AJ y AM (SCONGELADO, SFRESCO, S10J Y S10M) (izquierda).

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), 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, T10J2 y T10J1 y T0, respectivamente. Los perfiles para el suelo arenoso, S, SCONGELADO, SFRESCO, S10J Y S10M, no mostraron diferencias entre el número de bandas ni intensidad de las misma (Figura V.5.).

Se ha descrito 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 (Casamayor et al., 2000).

Frente a cultivos-dependientes, la PCR y el DGGE se sabe aumentan la reproducibilidad y exactitud (Moreno et al., 2009), sin embargo, en este estudio el número total de bandas, no superó el número estimado de UFC averiguado 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.). Esto permitía compara las diferencias entre poblaciones microbianas activas biológicamente en el momento de la extracción y las no activas. La intensidad de algunas bandas de tanto el suelo T10J-MCPA como T10J-S-metolacloro fue mayor para ADNc que para ADN (flechas azules, Figura V.5.). 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 e bandas de la técnica de DGGE.

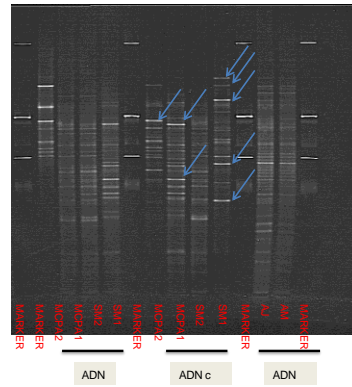


Figura V.6. Perfil DGGE comparando ADN y ADNc de los suelos T10J-MCPA y T10J-S-metolaclo AJ y AM.

La mayor intensidad de las bandas, también explica 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. 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 concuerda con el mayor número de UFC y mayor diversidad morfológica encontrada en técnicas cultivo-dependientes mostrada en este capítulo (Tablas V.9. y V.10). El alperujo AJ mostró 34 bandas fácilmente identificables, mientras que el AM, que mostró menor nitidez, sólo presenta 26.

V.4.5. Selección de microorganismos resistentes

Resultado del estudio de tolerancia de cepas seleccionadas descrito en el apartado V.4.3. se seleccionaron *Janthinobacterium sp.*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter sp.* Estas cepas se inocularon por separado en matraces que contenían 250 ml de medio líquido TSA con los herbicidas como única fuente de carbono. Al mismo tiempo se inocularon dos matraces con medio TSA con glucosa como fuente de carbono además del herbicida como controles positivos (Figuras V.7. y V.8.).

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).

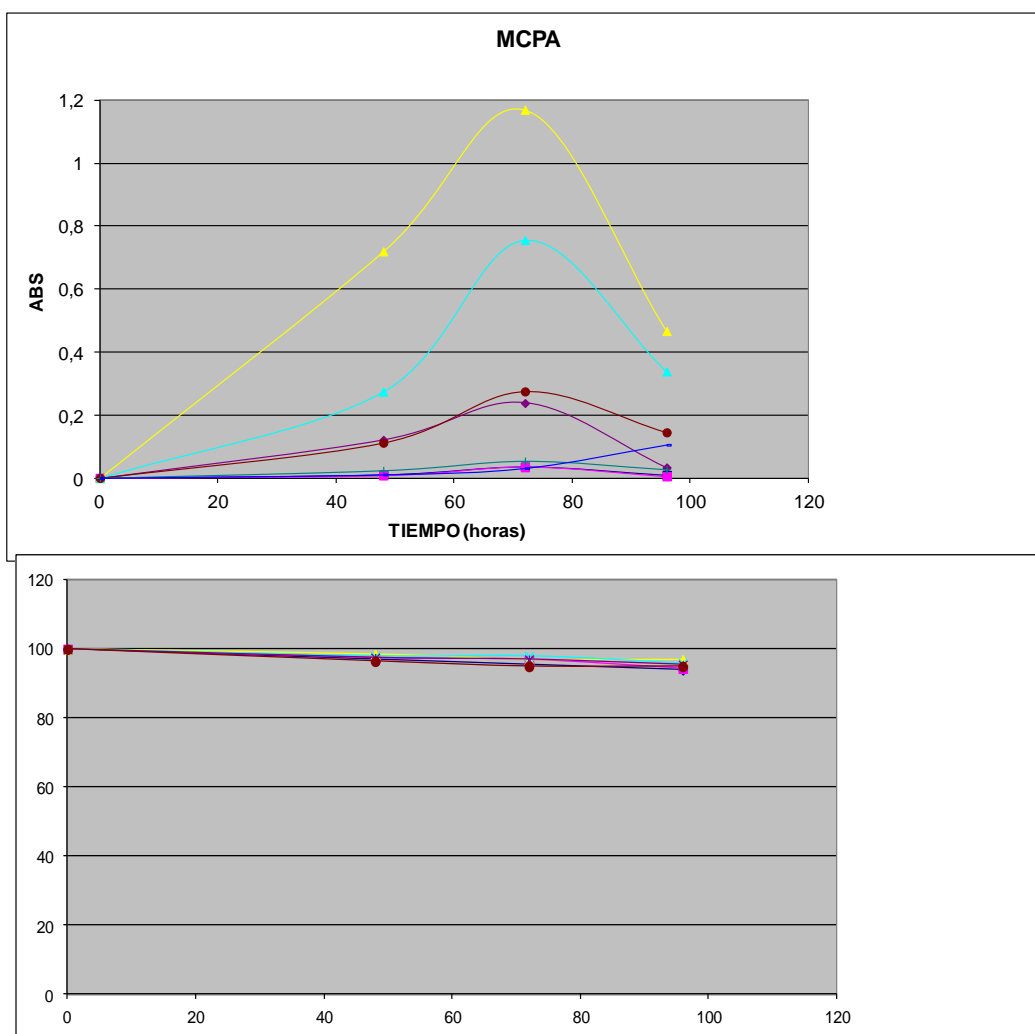


Figura V.7. Absorbancia del medio TSA respecto al tiempo de incubación con el herbicida MCPA (arriba) y cinética de degradación del herbicida (abajo).

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 600nm), a la vez que se medía 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, mientras que en el caso de MCPA y S-metolacoloro como fuente de carbono única, mostró una absorbancia de hasta 0.3 y 0.5, en presencia de MCPA y S-metolacoloro, respectivamente. La cuantificación por HPLC de los herbicidas mostró muy baja capacidad de degradación de los mismos, más acusado para MCPA, que para S-metolacoloro (Figuras V.7. y V.8.). Estudios recientes han mostrado la capacidad de levaduras para degradar el herbicida metolacoloro (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. V.8.). La baja degradación de los herbicidas estudiados en presencia de *Janthinobacterium sp.* y *Achromobacter xylosoxidans*, pudo deberse a este cese en el crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo.

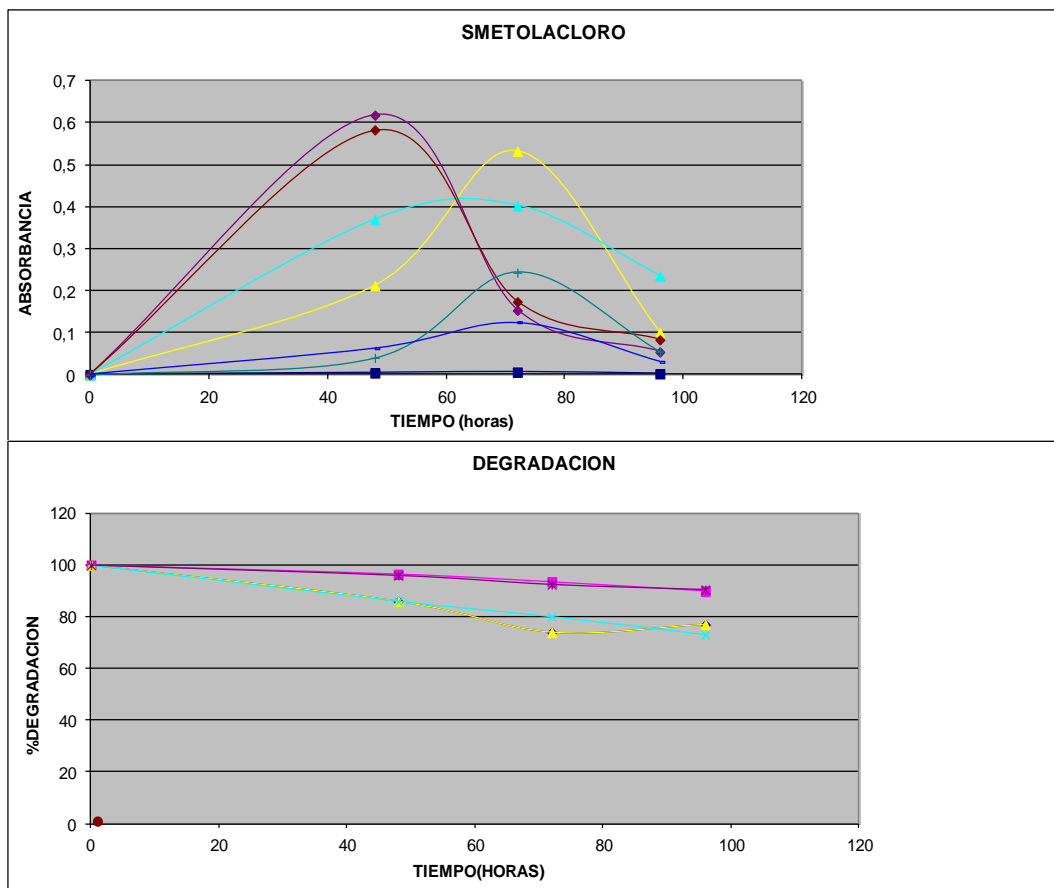


Figura V.8. Absorbancia del medio TSA respecto al tiempo de incubación con el herbicida S-metolacoloro (arriba) y cinética de degradación del herbicida (abajo).

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 formaciones. En estudios de suelos contaminados con herbicidas o con metales pesados, se ha encontrado que estas estructuras son frecuentes (cita Liz me dio). La formación de estas estructuras se atribuye a una respuesta a una situación de estrés, como son las altas concentraciones de herbicidas o contaminantes, y que destruye las bacterias que se encuentran alrededor, 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.

CONCLUSIONES

El uso de enmiendas orgánicas como los alperujos y los herbicidas MCPA y S-metolacoloro, no produjeron 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 de 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-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.
- 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.
- 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., Inglemo, 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. *Journal of 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 pedomics: the first study of the ovine foot 16S rRNA-based microbiome. *ISME J.* **2011**, 1-12.
- 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., Sexstone, A.J. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses. *Soil Biology and Biochemistry*. **2007**, 39, 1570-1579.
- 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. Environment. Microbiol.* **2000**, 5488-5491.
- 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 n°1.
- Kiyohara, h., Nagao, K, Kouno, K., Yano, K. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis*, AFK2. *Appl. Environment. Microbiol.* **1982**, 458-461.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylooxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction *Brassica juncea*. *J. Environ. Manage.* **2009**, 90, 2, 831-7.
- 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.
- METER Petrosino, J.F., Hieghlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A., Versalovi, J. Metagenomic Prosequencing. *Clinic. Chem.* **2009**, 55, 5.
- Mettel, C., Kim, Y., Shrestha, P.M., Liesack, W. Extraction of mRNA from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 5995-6000.

- 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.
- 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.
- Ronaghi, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research.* **2001**, 11, 3-11.
- 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., 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., 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. y 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., 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. 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 DOI: 10.1371/journal.pone.0007401.
- 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. Conclusiones Generales

VI. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis Doctoral resumen en las siguientes conclusiones:

-El alperujo AJ de mayor pH y de menor COS que AM, mostró contenidos en lignina y celulosa bajos, típicos de material humificado. Los espectros de fluorescencia del COS de los dos alperujos revelaron HIX de 9.5 para AJ y 1.3 para AM, confirmando el estado de compostaje más avanzado del primero. El alperujo AM de menor grado de humificación, presentaba en solución más compuestos fenólicos que AJ que le proporcionan carácter ácido, por lo que los grupos carboxilos de las moléculas en solución se encuentran tanto en forma COOH como COO⁻. Mientras que AJ, que como consecuencia de un mayor estado de humificación y compostaje, ha perdido los compuestos fenólicos que le proporcionan el carácter ácido, y presenta menos grupos COO en solución.

-Tanto los resultados del estudio por fluorescencia, como los de FT-IR, confirman la distinta naturaleza de los componentes orgánicos solubles de los alperujos. A pesar del similar contenido en MO de los mismos, podríamos indicar que el alperujo AJ constituye una mejor elección como enmienda para el suelo frente al alperujo AM, ya que aporta una materia orgánica más estable.

-Los estudios de superficie y porosidad de los suelos revelaron que la adición de los alperujos AJ y AM a las dosis de 5% y 10% aumentó el volumen total de poros en los tres suelos estudiados, respecto a los suelos sin enmendar.

-La adición de alperujo al suelo aumentó el contenido de carbono orgánico soluble y por tanto de carbono lábil para los microorganismos del suelo, explicando la mayor respiración encontrada en los suelos enmendados.

-La adsorción del herbicida MCPA se ve afectada por la concentración de herbicida en solución, describiendo isotermas tipo L, mientras que la adsorción del herbicida S-metolacloro no se ve afectada por la concentración, mostrando isotermas tipo C.

-MCPA y S-metolacloro mostraron muy baja capacidad de adsorción en los tres suelos sin enmendar en laboratorio, siendo ligeramente mayor para el segundo.

-Los valores de K_{fads} para MCPA en los suelos enmendados no muestran aumento importante en la adsorción para los tres suelos, mientras que los K_{d10} revelan incremento en la adsorción, principalmente al enmendar con AJ. Los coeficientes K_{fads} y K_{d10} para S-metolacloro aumentan al enmendar los suelos con los alperujos, que para K_{d10} fue mayor al enmendar con AJ, al igual que ocurrió para MCPA.

-Las adsorciones de MCPA y S-metolacloro a los suelos sin enmendar, aunque bajas, no son reversibles, ya que mostraron n_{fads} mayores que los n_{fdes} para los tres suelos (a excepción del suelo C para S-metolacloro). Sin embargo, los suelos enmendados presentan adsorción reversible de MCPA. El aumento del carbono orgánico soluble en la solución tras la enmienda con alperujo podría ser la causa de ello, ya que ésta podría favorecer la desorción del herbicida retenido en la fase sólida hacia la fase líquida de la solución. A diferencia de MCPA, la adición de enmienda en los suelos no favorece la desorción de S-metolacloro hacia la solución del suelo.

-Las $T_{1/2}$ de MCPA de los suelos sin enmendar fueron menores en los suelos con mayor contenido en carbono orgánico (C y T) que se explica por una mayor actividad biológica en los suelos, que favorece la degradación de los herbicidas. Para S-metolacloro no hubo diferencias significativas.

-La adición de los alperujos aumentó la persistencia de MCPA y S-metolacloro en los suelos, Esto se atribuye, por un lado, al efecto protector que proporciona la mayor adsorción estando el herbicida menos disponible para sufrir procesos de degradación, pero también puede ser debido a que los microorganismos del suelo prefieran utilizar esta materia orgánica (alperujo) como fuente de carbono, en lugar de degradar el herbicida presente en la disolución del suelo, aumentando su persistencia. La adición de enmienda redujo la mineralización de MCPA en todos los suelos estudiados corroborando su alta persistencia en los estudios de disipación.

-Los estudios de movilidad revelaron baja y muy alta retención de MCPA y S-metolacloro, respectivamente mostrando un retraso en la lixiviación mayor al enmendar siendo el efecto mucho más intenso para S-metolacloro.

-El aumento de volumen de poro obtenido al enmendar los tres suelos no se tradujo en un aumento en la lixiviación para ninguno de los herbicidas. Revelando que la materia orgánica de los suelos constituye en este caso un factor más determinante que la porosidad de los suelos.

-La adición tanto de alperujo (OW) como de orujo (DW) modificó las propiedades originales del suelo. Se encontró menor contenido en COS de los suelos enmendados en el campo que se atribuyó a pérdidas por procesos de lixiviación y escorrentía y a procesos de degradación por parte de los microorganismos presentes en el suelo. El volumen total de poro se incrementó al enmendar con los dos residuos respecto al suelo sin enmendar.

-La adición de los residuos a los suelos incrementó la adsorción de los herbicidas, siendo mayor en el caso de S-metolacloro, que bentazona, siendo más intensa en los suelos enmendados en laboratorio (OW5, OW10, DW5 y DW10) que en campo (OW30, OW60, DW27 y DW54).

-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, para los suelos enmendados con el orujo, las vidas medias de bentazona se incrementaron por los factores de 2 y 3 para DW27 y DW54, respectivamente. Los suelos enmendados en laboratorio mostraron vidas medias hasta 18 veces mayores que el suelo original. Para S-metolacloro no se encontraron en este caso diferencias importantes en su persistencia en los suelos enmendados respecto al suelo original.

-El incremento en la adsorción no se tradujo en una mayor retención de bentazona por los suelos en los estudios de lixiviación, mientras que por el contrario sí para S-metolacloro, que sólo lixivió en el suelo sin enmendar (S).

-Mientras que la mineralización de bentazona se vio reducida al enmendar los suelos, tanto en campo como en laboratorio, la monitorización de la actividad deshidrogenasa de los suelos en presencia de S-metolacloro no reveló efecto tóxico por parte del herbicida, ni de la adición de los residuos, confirmando esto último el incremento de la respiración de los suelos al enmendar, frente al suelo original.

-En este trabajo se muestra también que la aplicación al suelo de terbutilazina, que a diferencia de glifosato, es una fuente indirecta de fitotoxicidad para los olivos (*Olea europaea*), reduciendo la eficiencia fotosintética que fue contrarrestada por la adición de OW a los suelos, debido al aumento de la adsorción del herbicida a las partículas de suelos, siendo de esta manera disponible para ser absorbido por las plantas.

La adición de residuos de almazara no se tradujo en una reducción de la población microbiana presente en suelos. Estudios de tolerancia a altas dosis de herbicidas, mostraron cepas tolerantes a MCPA y S-metolacloro, sin embargo, estas cepas no lograron crecer en presencia de estos herbicidas como única fuente de carbono.

-Estudios cultivo-dependientes de 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, por lo que no se observó efecto tóxico sobre los microorganismos del suelo.

-Los estudios de cultivo-independientes (DGGE), mostraron un aumento en la intensidad de las bandas en el perfil de los suelos enmendados, lo que coincide con un aumento en la concentración de ARN de estos suelos, y por tanto de la actividad biológica, confirmando la ausencia de efecto tóxico de los residuos e incluso expresando una tendencia favorable por la adición de residuos.

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. Hemostín,[†] 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*²-*tert*-butyl-6-chloro-*N*⁴-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.^{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*²-*tert*-butyl-6-chloro-*N*⁴-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) is a postemergence selective herbicide applied directly to the soil and mainly absorbed by roots. It inhibits the Hill reaction and CO₂ sorption in the chlorophyllous function.¹⁸ Glyphosate (*N*-(phosphonomethyl)glycine) is a postemergence nonspecific herbicide which inhibits 5-enolpyruvylshikimate 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 odorous 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

Published: April 25, 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 (Glialka 36), 360 g of active ingredient L⁻¹, Puzosur S.L., Spain and terbuthylazine (CUN4), 50 g of active ingredient L⁻¹, Sipcam Inagro 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,²⁸ and the pH was determined in a 1:2.5 (kg L⁻¹) soil/dionized 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.^{29,31} The organic matter content of this residue (determined by calculation) is 81%, and the pH is 6.7 (1:2 kg L⁻¹ residue/dionized 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, C_i, 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 + acetic anhydride (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 C_i 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_fC_i^{1/n}, and sorption coefficients K_f and 1/n calculated.

Plant Material and Treatments. Olive aropara 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 (PMS-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.¹³ reported that fluorescence parameters of olive trees were affected by herbicide treatments from week one, but Redondo-Gómez et al.¹⁶ 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.¹⁶ 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_s), and nonphotochemical quenching (NPQ = F_v - F_v/F_s).³² Chronic (P_{1,Ch}) and dynamic (P_{1,Dyn}) photoinhibition was calculated according to Werner et al.³³ as follows: P_{1,Ch} = [(F_v/F_m)_{max} - (F_v/F_m)_{min}]/[(F_v/F_m)_{max}] × 100; P_{1,Dyn} = [(F_v/F_m)_d - (F_v/F_m)_m]/[(F_v/F_m)_{d}] × 100; where (F_v/F_m)_d and (F_v/F_m)_m are dawn and midday F_v/F_m values, respectively. (F_v/F_m)_{max} 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,

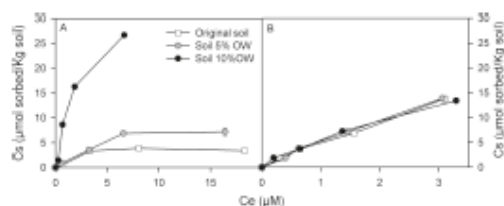


Figure 1. Terbutylazine (A) and glyphosate (B) adsorption isotherms in soil unamended (white, A and B) and amended at 5% (gray, A and B) and 10% with OW (black, A and B).

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 ($\text{ng}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{ mL}^2 \text{ h}^{-1}$)	$1/n$	R^2
terbutylazine	S	0.964 (1.490–0.622) ^a	0.57 ± 0.23 ^b	0.85
	S + 5% OW	1.306 (1.763–1.009)	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 (5.496–4.790)	0.83 ± 0.09	0.99
	S + 5% OW	5.440 (5.640–5.280)	0.81 ± 0.04	0.99
	S + 10% OW	5.411 (5.633–5.190)	0.78 ± 0.05	0.99

^aNumbers in parentheses are standard errors (SE) about the mean K_d .
^bNumbers 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,I).

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,¹⁰ 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).^{10,13} 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.^{26,35–37} 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 Radondo-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 a setup in soils. The addition of this waste to the soil does not affect herbicide biological activity³⁸ and improves soil physicochemical properties.³⁹ Furthermore, it is easily accessible since it is generated close to olive crops.

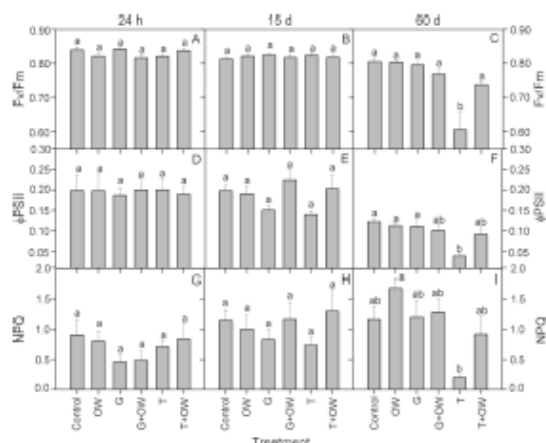


Figure 2. Maximum quantum efficiency of PSII photochemistry, F_v/F_m (A–C), quantum efficiency of PSII, Φ_{PSII} (D–F), and nonphotochemical quenching, NPQ (G–I) at midday in *Olea europaea* treated with solid olive-mill organic waste (OW), glyphosate (G), and both of them (G + OW), terbutylazine (T) 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, $P < 0.05$).

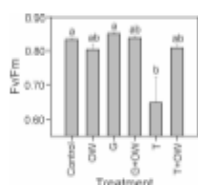


Figure 3. Maximum quantum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m) at dawn in *Olea europaea* treated with solid olive-mill organic waste (OW), glyphosate (G), and both of them (G + OW), terbutylazine (T) and T + OW after 60 days. Values represent mean \pm SE, $n = 9$. Different letters indicate means that are significantly different from each other (Tukey test, $P < 0.05$).

In the case of glyphosate, which competes for the same sorption sites in soil as phosphorus,³⁹ adsorption occurs on the mineral phase of the soils (mainly on variable clay minerals), being strongly adsorbed by these soil components and becoming almost immobile in the soil profile.^{40,42} The increase in soil organic matter upon amendment with the organic residue OW did not affect glyphosate sorption (Table 2; Figure 1B). However, the higher values of K_d for glyphosate in the original unamended soil compared to terbutylazine indicates that this strong sorption, together with the low amount adsorbed by roots,^{10–12} makes glyphosate unavailable to be absorbed by plants, and, consequently, no effects on photochemistry of olives

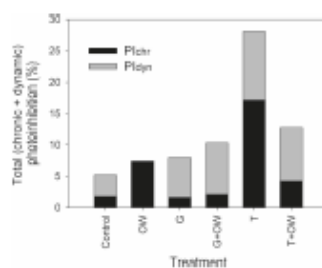


Figure 4. Chronic (Solid bars) and dynamic (shaded bars) photoinhibition of adult leaves of *Olea europaea* treated with solid olive-mill organic waste (OW), glyphosate (G), and both of them (G + OW), terbutylazine (T) and T + OW after 60 days of treatment.

plants are observed (Figure 2). Also the mode of action of this herbicide accounts for the results observed. Although glyphosate has been shown to inhibit δ -aminolevulinic acid synthesis in other crops blocking the synthesis of chlorophyll and other porphyrins,⁴⁰ its main mode of action is to inhibit the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, which is not directly related to photosynthesis.¹⁹

Dissipation of energy as heat (NPQ) is a protecting mechanism in plants, which usually increases when F_v/F_m and Φ_{PSII}

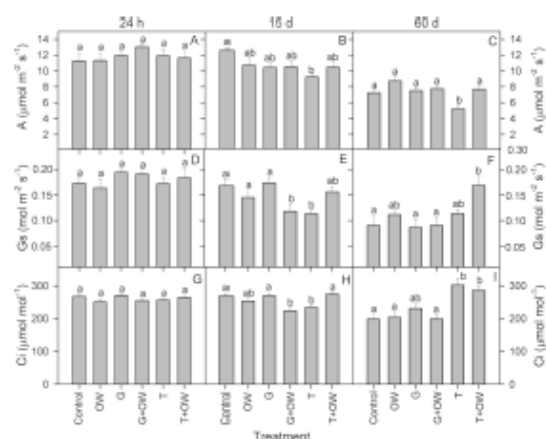


Figure 5. Net photosynthetic rate, A (A–C), stomatal conductance, G_s (D–F), and intercellular CO_2 concentration, C_i (G–I) in *Olea europaea* treated with solid olive-mill organic waste (OW), glyphosate (G), and both of them (G + OW), terbutylazine (T) and T + OW after 24 h (A, D, G), 15 days (B, E, 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 terbutylazine 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,¹⁷ in studies with diuron on the seagrass *Zostera spiciformis*.

Young olive trees showed an early expression of phytotoxic effect 15 days after terbutylazine treatment, which became statistically significant 60 days after treatment. A significant reduction in values of Φ_{PSII} after 60 days of treatment with terbutylazine 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 terbutylazine treated plants counterbalanced the reduction of F_v/F_m and Φ_{PSII} parameters since, as described above, this OW makes terbutylazine less available to be absorbed by plants.

In relation to gas exchange parameters, there was a very clear effect in olives treated with terbutylazine 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 terbutylazine 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.⁴¹ Values for photosynthesis rate confirmed that the addition of OW reduces the negative effect generated by terbutylazine 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 terbutylazine 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: +34-954-624711. Fax: +34-9-54624002. E-mail: lcoz@irnae.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.J.C. acknowledges her FPI fellowship from MINCIN.

ABBREVIATIONS USED

A , net photosynthetic rate; C_e , equilibrium concentration; C_i , initial concentration; C_{i0} , intercellular CO_2 concentration; C_s , amount sorbed; F_0 , minimal fluorescence level in the dark-adapted state; F_m , maximal fluorescence level in the dark-adapted state; F/F_m , maximum quantum efficiency of PSII photochemistry; Φ_{PSII} , quantum efficiency of PSII; G_s , stomatal conductance; K_f , sorption coefficient; NPK, n on photochemical 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.
- Camblao-Martínez, R.; Rodríguez-Gomález, E.; Fernández-Laspeña, M. E.; Olivo-Suárez, L.; Sánchez-San Román, F. J. Evolution over time of the apical cell pollution of water in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res.* 2003, 37, 928–938.
- Cornejo, J.; Hemond, M. C.; Cohn, R.; Cox, L. 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.
- Ara-Estévez, M.; López-Pérez, J.; Martínez-Carballa, E.; Simón-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.
- Hildebrand, A.; Gallardo, M.; Lacorte, S.; Tardif, R.; Bouché, D. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards on surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res.* 2008, 42, 3315–3326.
- Saldaña, G.; Clement, C. Physiological side effects of pesticides on non-target plants. In *Janu V. Livingston. Agriculture and soil Pollution: New research*; NOVA Science Publishers Inc.: Huppange, 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.
- Rigot, A.; Fontaine, F.; Clément, C.; Vallée-gervais, N. Effect of the herbicide fluroxypyr on photosynthetic performance of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Chemosphere* 2007, 67, 1243–1251.
- Williams, S. L.; Camano, A.; Kunsolman, J.; Data, S.; Kuvika, K. M. Effects of the herbicide diuron on *Cordgrass* (*Spartina foliosa*) resistance and photosynthetic parameters. *Estuarine Coast.* 2009, 32, 146–157.
- Maxwell, K.; Johnson, G. L. Review: Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *J. Exp. Bot.* 2000, 51 (346), 659–698.
- Negri, A.; Volhard, C.; Humphrey, H.; Hayward, A.; Jones, R.; Eggleston, G.; Fabris, K. Effects of the herbicide diuron on the early life history stages of coral. *Mar. Pollut. Bull.* 2006, 51, 370–383.
- Buck, W.; Frank, H. Chlorophyll a fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1998, 40, 34–41.
- Haynes, D.; Ralph, P.; Prange, J.; Demison, R. 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 coral crop research. *Photophysica* 2003, 41, 321–330.
- Redondo-Gómez, S.; Cox, L.; Cornejo, J.; Figueroa, E. Combined effect of diuron and atrazine 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, L.; 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, 521–528.
- Goussas, C.; Boussac, A.; Rutherford, 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 phytoactivity and nutritional products*; Liñán, C., Ed.; Agrotécnicos S.L.: Madrid, Spain, 2009.
- Franz, J. E.; Mao, M. K.; Sikomki, J. A. *Glyphosate: an emerging 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.; Wanhua, A. D.; Corbin, F. C. Eradication 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.; Pao, I. Differential phytotoxicity of glyphosate in maize seedlings following applications to roots or shoot. *Weed Res.* 2005, 45, 27–32.
- Laitinen, P.; Ramo, S.; Simen, K. Glyphosate translocation from plants to soil—does this constitute a significant proportion of residues in soil? *Plant Soil* 2007, 300, 51–60.
- Vereschin, H. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Plant Manage. Sci.* 2005, 61, 1139–115.
- Boggs, O. K.; Ginning, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Plant Manage. Sci.* 2008, 64, 441–456.
- Calbera, A.; Cox, L.; Velázquez, P.; Korkinen, W. C.; Comejo, J. Fate of diuron and terbuthylazine in soils amended with two-phase olive oil mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4828–4834.
- Dobryzcka, C.; Karpouza, D. G.; Mektikoglou-Spiridou, U.; Eleftheriades, L.; Voudris, E. A. Influence of different organic amendments on the degradation, metabolism and adsorption of terbuthylazine. *J. Environ. Qual.* 2008, 36, 1793–1802.
- Torlin, C. D. S. *The e-Pesticide Manual: A World Compendium*, Version 4.0, 14th ed.; BCPC: Surrey, UK, 2006–2007.
- Nelson, D. W.; Sommers, L. E. *Methods of Soil Analysis, Part 2*; American Society of Agronomy: Madison, WI, 1982.
- Albuquerque, J. A.; Gomáriz, J.; Tortosa, G.; Cegarra, J. Evaluation of "alpenjo" composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation* 2009, 20, 257–270.
- Lucena-Rodríguez, P.; Hernández, D.; Hernández-Agudelo, L.; Lucena, J. J. Remediation of a two-phase olive mill waste extract into a microcosm system. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 1085–1092.
- Redondo-Gómez, S.; Mateos-Naranjo, E.; Cambaló, J.; López, T.; Figueroa, M. E.; Dary, A. J. Carry-over of differential salt tolerance in plants Grown from dimorphic seeds of *Suaeda spaldora*. *Ann. Bot.* 2008, 102, 103–112.
- Werner, C.; Corasta, O.; Beychig, W. Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Plant. Plant Biol.* 2002, 29, 999–1011.
- Von Gunther, S.; Faucher, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 1981, 153, 377–387.
- Cela, R.; Barriola, E.; Honor, S. Effect of liquid sewage sludge addition on atrazine sorption and desorption by soil. *Chemosphere* 1998, 37, 1091–1107.
- Calbera, A.; Cox, L.; Fernández-Hernández, A.; García-Otín-Cranton, C.; Comejo, J. Field application of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2009, 132, 260–266.
- Kravari, K.; Tsiropoulos, N. G.; Karpouza, D. G. Degradation and adsorption of terbuthylazine and chlorpyrifos in biobed biotreatments from composted cotton crop residues. *Plant Manage. Sci.* 2010, 66, 1122–1128.
- Cañero, A. I.; Cox, L.; Hemond, M. C.; Cornejo, J. Effect of soil amendment with an organic residue on α -metolachlor fate. 14th Ramiran International Conference, Lisbon, Portugal, 2010, C7-0096.
- Laitinen, P.; Ramo, S.; Niskanen, U.; Jauhainen, L.; Simen, K.; Tutola, E. Glyphosate and phosphorus leaching and residues in boreal sandy soil. *Plant Soil* 2009, 323, 267–283.

- (40) Li, J.; Smeda, R. J.; Sellers, R. 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) Fierza, J.; Mednes, 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 Ingeniería Agrónoma, Universidad de Extremadura, Ctra. de Cáceres, 06071 Badajoz, Spain^c Área de Edafología y Química Agrícola, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Avda de Iruya 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 xxxxx

Keywords:

Bentazone

Olive oil mill waste

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 lower 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 a 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-Lacena 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 saw 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 retaining soils and crop yields, potentially lowering the need for inputs of N, P, and K fertilizer (Binetti 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 (Sier et al., 2006; Santuso 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; Santuso 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 Pico, 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-benzoxiadiaz-4(3H)-one 2,2-dioxide) is one of the most widely used herbicides in farming worldwide for controlling weeds 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_e , Amount sorbed of herbicide; C_0 , its total concentration of herbicide; C_e , equilibrium; K_d , partition coefficient of herbicide; K_p , sorption coefficient of Freundlich coefficient and isotherm parameter; DOC, dissolved organic carbon; TOC, total organic carbon; CHA, carbon humic acids; CA, carbon fulvic acids; EC, electrical conductivity; PC, polymerization grade; CEC, cation exchange capacity.

* Corresponding author. Tel.: +34 954624711; fax: +34 954624002.

E-mail address: lcox@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 Lavial – 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 Odegal, a two-phase continuous olive oil industry located in Pontealegre (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 UGUEL 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 INAP (National Institute of Agrarian and Fisheries Research) in Bvas, Portugal (38°53' N, 7°9' W, 290 m above sea level) (López-Piñero et al., 2008a). The soil is classified as Cutanic Lavial (ISSS-ERIC 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 1.24%, respectively) and 27 and 54 Mg DW ha⁻¹ (equivalent to 0.56 and 1.12%, 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, desorption, mineralisation and leaching studies. Its water solubility was 570 mg L⁻¹, and pKa = 3.2 (Romem et al., 1996; Bolvin 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 Na₂P₂O₇ + 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. Uguine 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 × 10³ 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 $\gamma = 0.48 \text{ N m}^{-1}$ 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_0) and equilibrium (C_e) solution concentrations.

Sorption results were fitted to the Freundlich model, $C_s = KdC_e^{1/n}$, where C_s (mM kg⁻¹) is the amount of herbicide sorbed at the equilibrium concentration C_e (mM L⁻¹), and Kd (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. Desorption 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 desorption 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 spilted 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 92.5 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 OW 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 5% and 10% doses (w/w) (OW5, OW10, DW5 and DW10). Physicochemical properties of organic residues (OW and DW).

	US	OW30	OW60	DW27	DW54	DW5	DW10	DW5	DW10	DW	DW
TOC (g kg ⁻¹)	14.6	30.7	37.6	46.1	63.5	37.8	54.8	34.2	54.6	535	516
DOC (g kg ⁻¹)	0.127	0.542	0.712	0.760	1.508	3.288	5.248	5.536	8.419	43	74
ClA (g kg ⁻¹)	0.905	2.072	2.764	2.942	4.142	3.278	5.159	1.845	3.205	52	31
CFA (g kg ⁻¹)	1.137	1.937	2.005	1.774	2.291	2.593	4.404	3.680	8.425	35	62
pH (H ₂ O)	7.95	7.83	7.74	7.81	7.59	6.81	6.45	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	12.39	2.56	6.40
PC	0.949	1.069	1.389	1.658	1.808	1.264	1.172	0.501	0.38	–	–
Total N (g kg ⁻¹)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	16	24
Lignine (g kg ⁻¹)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	19.6	23.7
Humic/fulvic (g kg ⁻¹)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	19.1	16.7
Cellulose (g kg ⁻¹)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	22.8	21.5

TOC: Total organic carbon, DOC: Dissolved organic carbon, ClA: carbon humic acids, CFA: carbon fulvic acids, PC: 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 5000 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 22 kg ha⁻¹ dissolved in water was applied to the top of the columns. Each day the columns were leached with de-ionized 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 of and K_{oc} at the C_{oc} = 1 mM, in unamended (US) and soil amended in the field (OW30 and OW60 and DW27 and DW54) and in the laboratory (OW5, OW10, DW5 and DW10).

Soils	K _d (mL g ⁻¹)	K _{oc} (mL g ⁻¹)	R ²
US	0.032 (0.011–0.097) ^a	1.29 ± 0.187 ^{ab}	0.922
OW30	0.201 (0.128–0.314)	1.85 ± 0.076	0.979
OW60	0.205 (0.109–0.413)	1.10 ± 0.076	0.977
DW27	0.198 (0.129–0.315)	1.09 ± 0.075	0.981
DW54	0.509 (0.359–0.722)	0.969 ± 0.060	0.984
OW5	0.416 (0.287–0.603)	1.00 ± 0.064	0.983
OW10	0.762 (0.590–1.59)	0.960 ± 0.039	0.993
DW5	1.36 (0.558–0.925)	0.994 ± 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 error about the mean.

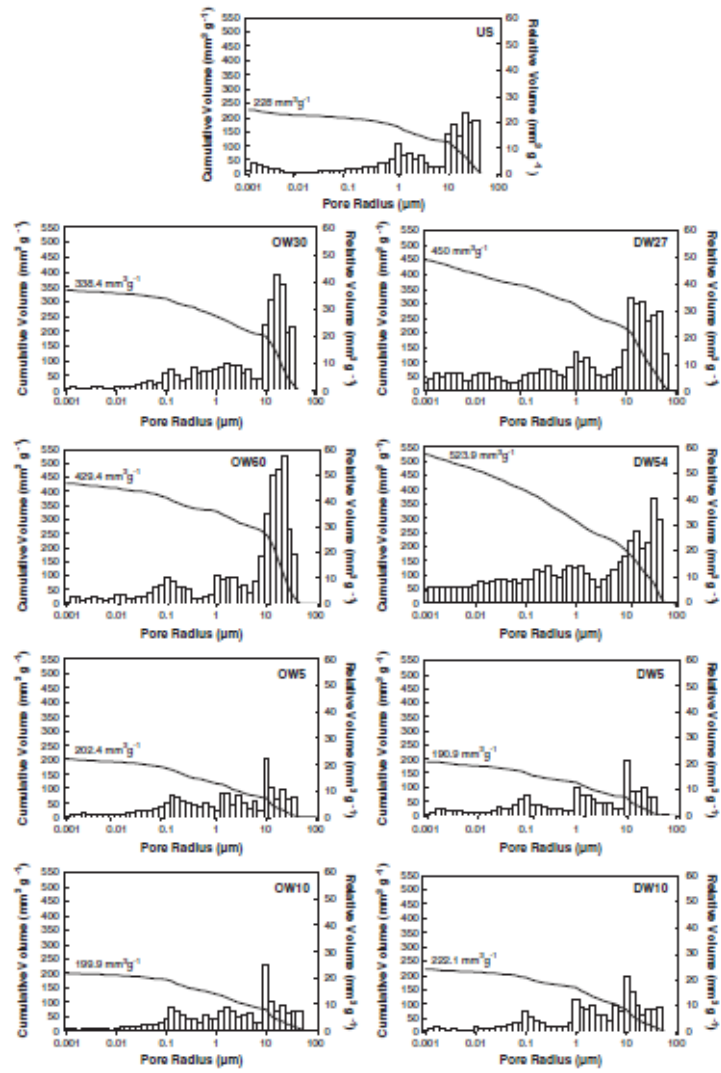


Fig. 1. Relative (histogram) and cumulative (curve) Hg pore volumes for US and soils amended in field (OW30, OW60, DW27 and DW54), and in the laboratory (OW5, OW10, DW Sand DW10).

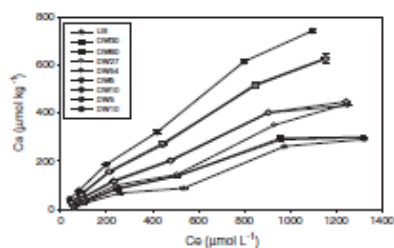


Fig. 2. Benzazone adsorption isotherms in US and soils amended in the field (OW50, OW50, DW27 and DW50), and in the laboratory (DW5, DW10, DW5 and DW10).

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 Killi (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 benzazone in the studied soil were shown in Fig. 2, and sorption coefficients after fitting isotherms to Freundlich equation in Table 2. Benzazone is a weak acid (pKa=3.2) and thus it

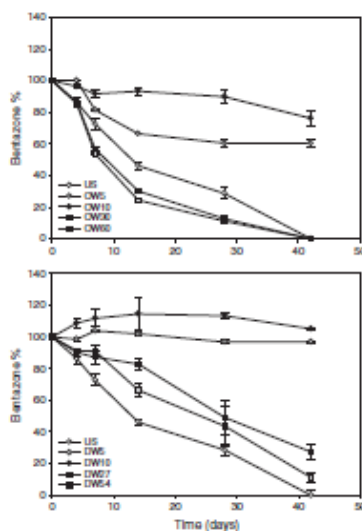


Fig. 3. Desorption curves for benzazone in US and soils amended with OW (top of the figure) and DW (bottom of the figure).

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 (nf). The largest value was obtained for freshly amended 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 K_d and pH ($r^2 = 0.84$), which suggests more specific interactions in the more sorptive systems (Calvet, 1989). Addition of both OW and DW increased benzazone 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 (Chefez 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 Bolvin 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, U et al. (2003) found that the distribution coefficient of benzazone in five different soils was a function of soil organic matter content and Carizosa et al. (2000) showed a large increase of benzazone sorption by smectite upon modification with organic cations (organoclay). The high content in illite of this soil does not suggest an important contribution of clay minerals to benzazone 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 (U et al., 2003; Bolvin 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-Pulicino 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; Collis et al., 1998; Cox et al., 2001, 2007). DOC from compost have been also shown to favour desorption processes when sorption is low (Barriso et al., 2011).

3.3. Degradation studies

Disipation of bentazone was monitored in US, in freshly amended soil with OW and DW and in soils amended in the field. Disipation 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 disipation 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 disipation in field amended soils, since the limited bioavailability of the molecule protected herbicide from transformation (Plum 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 disipation 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 hydromylation at the 6- or 8-position of the phenyl ring, which are further metabolised rapidly (Krauber et al., 2000; Bolvin 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 disipation studies. The amount of bentazone mineralised was similar to that reported by Plum 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 soil amended in the field (OW00 and OW60 and DW27 and DW54) and in the laboratory (DW5, DW10, 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	0.954	15.5 ± 0.221 ^{ab}	80.8 ± 0.308
OW00	6.58 (5.02–7.28)	0.965	11 ± 0.608	82.7 ± 0.801
OW60	6.61 (5.59–7.40)	0.956	11.1 ± 0.287	88.9 ± 1.02
DW27	13.9 (12.2–16.4)	0.919	5.79 ± 0.824	80.5 ± 1.63
DW54	22.7 (20.6–25.3)	0.961	2.09 ± 0.417	105 ± 0.461
DW5	54.1 (42.5–74.5)	0.789	1.82 ± 0.228	66.4 ± 1.13
DW10	127 (106–158)	0.864	0.885 ± 0.669	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.

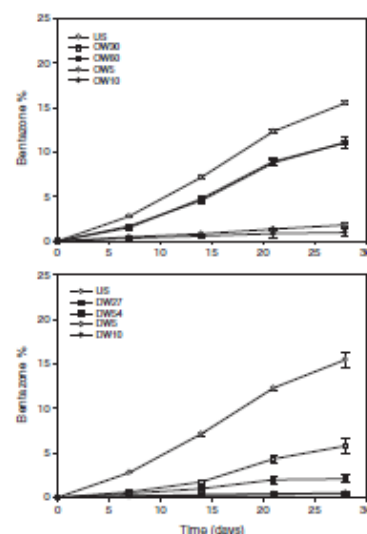


Fig. 4. Mineralization curves for bentazone in US and soils amended with OW (top of the figure) and DW (bottom of the figure).

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 Bolvin et al. (2004) on the effect of time on bentazone sorption.

Both, soil pore system and sorption are responsible for the residence time of a 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

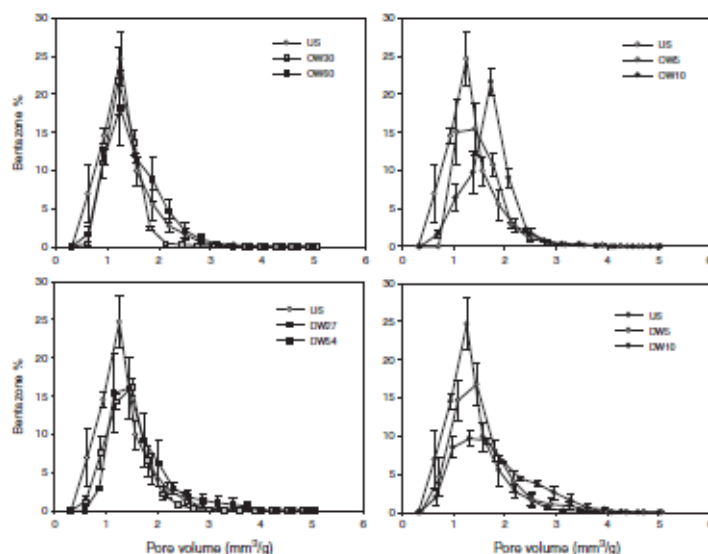


Fig. 5. Breakthrough curves for bentazone in untreated (US) and soils amended in the field and laboratory.

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, 1995). 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. Calero thanks the MEC/PECYT for a FPI fellowship. D. Becerra thanks the Junta de Extremadura for his FR 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

- Albarin A, Oñil R, Hierrosin MC, López-Ribotín A, Ortega-Calvo J, Cornejo J. Effect of solid olive-mill waste addition to soil on sorption, degradation and leaching of the herbicide simazine. *Soil Use Manag* 2003;19:150–6.
- Albarin A, Oñil R, Hierrosin MC, López-Ribotín A, Cornejo J. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere* 2004;54:717–24.
- Albarqueque JA, González J, García D, Ojeda J. Agrochemical characterization of "Alperujo", a solid by-product of the two phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioscience Technol* 2004;52:195–200.
- Andréu V, Rib V. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trends Anal Chem* 2004;23:772–89.

Table 4
Percentage of bentazone leached, extracted and total recovered from handpacked soil columns.

Soils	Leached (%)	Extracted (%)	Total recovered (%)
US	65.9 ± 2.39 ^a	15.3 ± 1.89	81.2
DW00	50.5 ± 5.56	6.25 ± 1.29	56.7
DW03	60.1 ± 3.11	3.37 ± 0.070	63.5
DW07	49.3 ± 4.45	4.04 ± 0.225	53.3
DW54	58.4 ± 5.37	3.82 ± 1.21	62.2
DW5	46.4 ± 2.28	14.2 ± 1.75	61.3
DW10	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.

- Barrizo E, Andrade MS, Benoit P, Houtz S. Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from composite experimental data and modeling approach. *Biodegradation* 2011;106:117–33.
- Beck AJ, Johnston AE, Jones KC. Movement of nonionic organic chemical in agricultural soils. *Critical reviews. Environ Sci Technol* 1993;23:219–48.
- Bolin A, Chemier R, Perrin-Ganier C, Schiavon M. Time effect on bentazone sorption and degradation in soil. *Peer Manag Sci* 2004;60:309–14.
- Bolin A, Chemier R, Schiavon M. Bentazone adsorption and desorption on agricultural soils. *Agron Sustainable Dev* 2005;25:309–15.
- Bonari G, Plaza C, Serrati N. Olive pomace amendment in Mediterranean conditions: effect on soil and biotic acid propionic and wheat (*Triticum turgidum* L.) yield. *J Agric Food Chem* 2005;53:5730–6.
- Burgos P, Madalén 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, Koskinen W, C. Sadowny M. Availability of triazine herbicide in aged soils amended with olive oil mill waste. *J Agric Food Chem* 2006;54:4112–9.
- Cabrera A, Cox I, Fernández-Hernández A, García-Ote C, Ovejero C. Cornajo J. Field application of olive mill solid waste application in olive crops: effect on herbicide retention. *Agric Ecosyst Environ* 2009;132:200–6.
- Cabrera J, López-Ribero A, Barrizo E, 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.
- Calvo R. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ Health Perspect* 1988;83:145–77.
- Camizosa MJ, Calderín MJ, Vallejos MC, Cornajo J. Organosolvent extraction and carrier for the herbicide bentazone. *Sci Total Environ* 2000;247:285–93.
- Cela R, Barrizo E, Houtz S. Sorption and desorption of atrazine by sludge amended soils: dissolved organic matter effects. *J Environ Qual* 1998;27:1348–55.
- Chavez B, Xing B. Relative role of aliphatic and aromatic moieties as sorption domains for organic compounds: a review. *Environ Sci Technol* 2009;43:1689–9.
- Cox I, Cela R, Hermosín MC, Becker A, Cornajo J. Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agric Ecosyst Environ* 1997;65:151–61.
- Cox I, Circhi A, Cela R, Hermosín MC, Koskinen WC, Cornajo J. Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils: dissolved organic matter effect. *Environ Sci Technol* 2001;35:1058–65.
- Cox I, Fernández MC, Zuloaga A, Hermosín MC, Cornajo J. Changes in dissolved organic carbon of soil amendments with aging: effect on pesticide adsorption behavior. *J Agric Food Chem* 2004;52:5035–42.
- Cox I, Velasco P, Cabrera A, Hermosín MC, Cornajo J. Dissolved organic carbon interactions with sorption and leaching of diuron in organic-amended soils. *Bar J Soil Sci* 2007;58:714–21.
- Corning HK, Van Soest PJ. Forage fiber analytic apparatus, reagents, procedures, and some applications. *Agric handbook* 378. USDA-ARS. Washington, DC: U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE; 1970.
- Kazdy V, Jolli D. Influence of olive oil solid waste applications on soil pH, electrical conductivity, soil nitrogen transformations, carbon content and aggregate stability. *Bioscience Technol* 2008;99:2225–32.
- Knauber WB, Rostek AJ, Schink B. Microbial metabolism and further fate of bentazone in soil. *Environ Sci Technol* 2000;34:598–603.
- Komilis DP, Ham RC. The effect of lignin and sugar in the aerobic decomposition of solid waste. *Waste Manag* 2003;23:419–23.
- Li XB, Liu WP, Xu DM, Lee S. Influence of organic matter and pH on bentazone sorption in soils. *J Agric Food Chem* 2009;57:5302–6.
- Lera R, Lázaro G, Gómez S, Gómez S, Schwab D, Wiersma F, et al. Pan-European Survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in groundwater. *Water Res* 2010;44:4115–26.
- López-Ribero A, Fernández J, Ruiz-Núñez JM, García A. Response of soil and wheat crop to the application of two-phase olive mill waste to Mediterranean agricultural soils. *Soil Sci* 2006;171:723–30.
- López-Ribero A, Barrizo E, Nuñez JM, Barrio C. Short and medium-term effects of two-phase olive mill waste application on olive grove production and soil properties under warm Mediterranean conditions. *Bioscience Technol* 2004;96:7962–7.
- López-Ribero A, Hernández J, Barrizo E, Ruiz-Núñez JM, Barrio C. Effects of six-wed two-phase olive mill waste on Mediterranean soils and the wheat crop. *Soil Sci Soc Am J* 2008;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, Latney J, Farmer WJ, Williams CE, Ben-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 B. Mechanisms of desorption of organic chemicals to natural particles. *Environ Sci Technol* 1996;30(1):1–11.
- Puati S, Marchand AL, Lagacherie B, Martin-Guernet F, Soulez G. Effect of cropping cycle and repeated herbicide applications on the degradation of diclofopromethyl, bentazone, diuron, imazamox and pendimethalin in soil. *Peer Manag Sci* 2002;58:303–12.
- Quail RC. Biodegradability of fractions of dissolved organic carbon leached from decomposing leaf litter. *Environ Sci Technol* 2005;39:1616–22.
- Rodríguez-Chaz MS, Jones JC, Bendig CD. Study of the spatial variation of the biodegradation rate of the herbicide bentazone with soil depth using constant incubation methods. *Chemosphere* 2008;73:1211–5.
- Rodríguez-Luana F, Hernández Q, Hernández-Apaolaza I, Luana J. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a microorganism fertilizer. *J Agric Food Chem* 2010;58:1085–92.
- Rosario E, Sánchez-Suazo F, Peña A, de la Colina C, Díez G. Bentazone leaching in Spanish soils. *Peer Sci* 1996;47:7–15.
- Said-Philicis D, Gjelost G, Wells AJ. Environmental fate of triasulfuron in soils amended with municipal waste compost. *J Environ Qual* 2004;33:1743–51.
- Si Y, Jiang J, Wang SQ, Zhang GC, Zhou C. Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethiononol in acidic soils in China. *Geoderma* 2006;130:66–7.
- Sims JL, Haby VA. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil Sci* 1971;512:137–41.
- SE-458C-BAQ. World reference base for soil resources. Wageningen, Rome: Draft; 1994.
- Tisdal 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 n°60. Washington DC: LA Richards (Ed.); 1954.
- Washburn EW. The dynamics of capillary flow. *Phys Rev* 1921;17:273–83.