

**DISIPACIÓN DE HERBICIDAS EN UN SUELO
ENMENDADO CON RESIDUOS ORGÁNICOS:
ENSAYOS EN CAMPO E IMPACTO EN LAS
COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO**

Víctor Barba Vicente

2019



**DISIPACIÓN DE HERBICIDAS EN UN SUELO
ENMENDADO CON RESIDUOS ORGÁNICOS:
ENSAYOS EN CAMPO E IMPACTO EN LAS
COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO**

Víctor Barba Vicente

2019



**DISIPACIÓN DE HERBICIDAS EN UN SUELO
ENMENDADO CON RESIDUOS ORGÁNICOS:
ENSAYOS EN CAMPO E IMPACTO EN LAS
COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO**

Memoria presentada por el Licenciado Víctor Barba Vicente para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca dentro del programa de doctorado de Agrobiotecnología.

Salamanca, 24 de octubre de 2019

Víctor Barba Vicente

Dña. María Jesús Sánchez Martín, Profesora de Investigación del CSIC, Dña. María Sonia Rodríguez Cruz, Científica Titular del CSIC y D. Jesús María Marín Benito, Investigador Postdoctoral Contratado del CSIC, del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, directores del trabajo **“Disipación de herbicidas en un suelo enmendado con residuos orgánicos: ensayos en campo e impacto en las comunidades microbianas del suelo”** realizado por el licenciado Víctor Barba Vicente en los laboratorios del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, autorizan la presentación del mismo en el formato de compendio de artículos al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Y para que así conste, firman el presente certificado

Salamanca, 24 de octubre de 2019

Fdo.: María Jesús Sánchez Martín

Fdo.: María Sonia Rodríguez Cruz

Fdo.: Jesús María Marín Benito

El presente trabajo **“Disipación de herbicidas en un suelo enmendado con residuos orgánicos: ensayos en campo e impacto en las comunidades microbianas del suelo”** ha sido realizado en el Departamento de Procesos de Degradación del Medio Ambiente y su Recuperación del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) bajo la dirección de la Prof. Dra. M^a Jesús Sánchez Martín, la Dra. M^a Sonia Rodríguez Cruz y el Dr. Jesús María Marín Benito.

La realización del mismo ha sido posible gracias a un contrato predoctoral de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Orden EDU/310/2015, de 10 de Abril de 2015) cofinanciado por el Fondo Social Europeo, y la investigación ha estado asociada al proyecto: **“Aplicación de herbicidas y residuos orgánicos en cultivos de Castilla y León y su incidencia en la sostenibilidad de los suelos” (CSI240U14)** financiado por la Junta de Castilla y León.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A los directores de este trabajo: la Dra. M^a Jesús Sánchez Martín, Profesora de Investigación del CSIC, la Dra. M^a Sonia Rodríguez Cruz, Científica Titular del CSIC y el Dr. Jesús María Marín Benito, Investigador Postdoctoral Contratado del CSIC en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA), por su dedicación, entrega y apoyo constante.

A la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León por financiar mi contrato predoctoral cofinanciado por el Fondo Social Europeo para la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Carlos García Delgado, Profesor Ayudante Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid, por todo su trabajo y ayuda durante su periodo postdoctoral en el IRNASA.

Al Dr. José Mariano Igual Arroyo, Científico Titular del CSIC en el IRNASA, por su enseñanza sobre el estudio de la estructura de las comunidades microbianas del suelo.

A todo el personal del Grupo de Contaminación de Suelos y Aguas por pesticidas del Departamento de Procesos de Degradación del Medio Ambiente y su Recuperación (IRNASA), especialmente a José Manuel Ordax por todo el trabajo y su ayuda constante en la realización de esta Tesis y al Dr. Eliseo Herrero y M^a José Carpio por su apoyo y amistad durante la realización de este trabajo.

A todo el personal de la finca experimental Muñovela (IRNASA), especialmente a Ángel Luis Iglesias y Cesáreo Pérez por su colaboración y amplia experiencia para el óptimo desarrollo de los ensayos de campo.

Al Dr. Kees van Gestel del departamento de Ecological Science de la Vrije Universiteit en Amsterdam, por su acogida durante mi estancia a su centro de investigación.

A Sofía Luis, Carmen Ruiz y Virginia Gascón por su ayuda y sobre todo su amistad tanto dentro como fuera del laboratorio.

A todo el personal del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA) por su apoyo y los buenos momentos compartidos.

A Patricia Martín, José Manuel Sánchez y Eva López de San Román, por su amistad, apoyo y ayuda.

Y sobre todo a mi familia, en especial a mi madre, a mi hermana y a mi sobrino, por su paciencia, su apoyo incondicional y su cariño durante todo este tiempo.

Muchas Gracias a Todos.

Esta Tesis Doctoral se presenta como compendio de las publicaciones que se especifican a continuación:

1. “Application of green compost as amendment in an agricultural soil: Effect on the behaviour of triasulfuron and prosulfocarb under field conditions”

J.M. Marín-Benito^a, V. Barba^a, J.M. Ordax^a, M.S. Andrades^b, M.J. Sánchez-Martín^a, M.S. Rodríguez-Cruz^a

^aInstituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), C/ Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, España

^bDepartamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, C/ Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain

Journal of Environmental Management 207 (2018), 180-191

2. “Simultaneous application of two herbicides and green compost in a field experiment: Implications on soil microbial community”

C. García-Delgado, V. Barba, J.M. Marín-Benito, J.M. Igual, M.J. Sánchez-Martín, M.S. Rodríguez-Cruz

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), C/ Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, España

Applied Soil Ecology 127 (2018), 30–40

3. “Recycling organic residues in soils as amendments: Effect on the mobility of two herbicides under different management practices”

J.M. Marín-Benito, V. Barba, J.M. Ordax, M.J. Sánchez-Martín, M.S. Rodríguez-Cruz

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), C/ Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, España

Journal of Environmental Management 224 (2018), 172–181

4. “Influence of different agricultural management practices on soil microbial community over dissipation time of two herbicides”

Carlos García-Delgado, Víctor Barba-Vicente, Jesús M. Marín-Benito, J. Mariano Igual, María J. Sánchez-Martín, M. Sonia Rodríguez-Cruz

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), C/ Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, España

Science of the Total Environment 646 (2019), 1478–1488

5. “Assessment of ^{14}C -pro-sulfocarb dissipation mechanism in soil after amendment and its impact on the microbial community”

Víctor Barba, Jesús M. Marín-Benito, Carlos García-Delgado, María J. Sánchez-Martín, M. Sonia Rodríguez-Cruz

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), C/ Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, España

Ecotoxicology and Environmental Safety 182 (2019) 109395

6. “Transport of ^{14}C -pro-sulfocarb through soil columns under different amendment, herbicide incubation and irrigation regimes”

Víctor Barba, Jesús M. Marín-Benito, María J. Sánchez-Martín, M. Sonia Rodríguez-Cruz

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), C/ Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, España

Science of the Total Environment (Publicado on-line: 23 de octubre de 2019)

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134542

Track Your Accepted Article

The easiest way to check the publication status of your accepted article

Transport of 14C-prosulfocarb through soil columns under different amendment, herbicide incubation and irrigation regimes

Article reference STOTEN_134542
Journal Science of the Total Environment
Corresponding author M. Sonia Rodríguez-Cruz
First author Víctor Barba
Received at Editorial Office 5 Aug 2019
Article revised 17 Sep 2019
Article accepted for publication 17 Sep 2019
DOI [10.1016/j.scitotenv.2019.134542](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134542)



ISSN 0048-9697

Last update: 23 Oct 2019

[Share via email](#)

Status comment

- Your article is now available online.

Production events

23 Oct 2019	Article published online	i
18 Oct 2019	Rights & Access form completed by you	
18 Oct 2019	Rights & Access form sent to you for completion	
18 Oct 2019	Colour order form completed by you	
18 Oct 2019	Colour order form sent to you for completion	
18 Oct 2019	Offprint order form completed by you	
18 Oct 2019	Offprint order letter sent to you for completion	
5 Oct 2019	Received for production	

Complimentary items

- You are entitled to a Share Link for your article free of charge. The Share Link will be sent you as soon as the final article is published in an issue. [i](#)

[Track another article >](#)

Bibliographic information

Volume/Issue

Will appear soon

Full bibliographic details

Will appear soon

Article available online

23 Oct 2019

[View your article](#) [i](#)

[Cited by in Scopus: 0](#) [i](#)

[Get your Stats on Mendeley](#) [i](#)



Track another article

Now also available
to Authors

- ✓ Printed copies of the journal issue
- ✓ Customized posters
- ✓ Publication certificate

[Find more offers](#)

ELSEVIER'S WebShop



ÍNDICE

1. OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. PESTICIDAS.....	7
2.1.1. Producción y uso actual.....	7
2.1.2. Herbicidas.....	8
2.1.3. Contaminación de suelos y aguas por herbicidas.....	11
2.2. DINÁMICA DE HERBICIDAS EN SUELOS.....	12
2.2.1. Degradación y / o disipación de herbicidas en suelos: Ensayos en laboratorio y campo.....	14
2.2.2. Movilidad de herbicidas en suelos: Ensayos en laboratorio y en campo.....	15
2.3. RESIDUOS ORGÁNICOS.....	17
2.3.1. Residuos orgánicos y su uso como enmienda en agricultura.....	17
2.3.2. Efecto de residuos orgánicos en el comportamiento de herbicidas.....	19
2.3.3. Efecto de residuos orgánicos sobre las comunidades microbianas del suelo.....	20
2.3.4. Efecto de los herbicidas sobre las comunidades microbianas del suelo.....	21
2.3.5. Efecto de la aplicación de residuos orgánicos y herbicidas de manera simultánea sobre las comunidades microbianas del suelo.....	22
2.4. BIBLIOGRAFÍA.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. MATERIALES.....	33
3.1.1. Compost vegetal.....	33
3.1.2. Suelo.....	34
3.1.3. Herbicidas.....	35
3.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	36
3.2.1. Caracterización del compost vegetal y del suelo sin enmendar y enmendado.....	36
3.2.2. Estudio de disipación y movilidad de los herbicidas triasulfuron y prosulfocarb en el suelo sin enmendar y enmendado: Experimentos de campo.....	37
3.2.3. Toma de muestra de suelos.....	38
3.2.4. Extracción y análisis cuantitativo de los herbicidas.....	39
3.2.5. Determinación de parámetros indicadores de la estructura, abundancia y actividad de las comunidades microbianas durante el proceso de disipación de los herbicidas.....	41
3.2.6. Estudios de la disipación y movilidad de prosulfocarb en el suelo sin enmendar y enmendado: Experimentos de laboratorio.....	43
3.2.7. Análisis de los resultados obtenidos.....	49
3.3. BIBLIOGRAFÍA.....	50

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
4.1. CAPÍTULO 1: Application of green compost as amendment in an agricultural soil: Effect on the behaviour of triasulfuron and prosulfocarb under field conditions	53
4.1.1. Resumen.....	55
4.1.2. Artículo.....	61
4.1.3. Material Suplementario.....	75
4.2. CAPÍTULO 2: Simultaneous application of two herbicides and green compost in a field experiment: Implications on soil microbial community	83
4.2.1. Resumen.....	85
4.2.2. Artículo.....	89
4.2.3. Material Suplementario.....	103
4.3. CAPÍTULO 3: Recycling organic residues in soils as amendments: Effect on the mobility of two herbicides under different management practices	111
4.3.1. Resumen.....	113
4.3.2. Artículo.....	117
4.3.3. Material Suplementario.....	129
4.4. CAPÍTULO 4: Influence of different agricultural management practices on soil microbial community over dissipation time of two herbicides	135
4.4.1. Resumen.....	137
4.4.2. Artículo.....	141
4.4.3. Material Suplementario.....	155
4.5. CAPÍTULO 5: Assessment of ¹⁴ C-prosulfocarb dissipation mechanism in soil after amendment and its impact on the microbial community	169
4.5.1. Resumen.....	171
4.5.2. Artículo.....	175
4.5.3. Material Suplementario.....	189
4.6. CAPÍTULO 6: Transport of ¹⁴ C-prosulfocarb through soil columns under different amendment, herbicide incubation and irrigation regimes	193
4.6.1. Resumen.....	195
4.6.2. Artículo.....	199
4.6.3. Material Suplementario.....	235
5. CONCLUSIONES.....	241



OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de un residuo orgánico (compost vegetal) en suelos de cultivo como enmienda en la disipación, movilidad y persistencia de los herbicidas triasulfuron y prosulfocarb, y la influencia de esta aplicación simultánea en las comunidades microbianas del suelo como indicadores de la conservación y calidad del suelo.

Para conseguir este objetivo se abordaron los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluación de la disipación, persistencia y movilidad de los herbicidas triasulfuron y prosulfocarb aplicados en un suelo agrícola sin enmendar y enmendado con compost vegetal en parcelas experimentales en condiciones de campo:
 - 1.1. Influencia de la aplicación de los herbicidas triasulfuron y prosulfocarb como formulaciones individuales (Logran[®] y Auros[®], respectivamente) o conjunta (Auros Plus[®]).
 - 1.2. Evaluación del efecto de la aplicación individual o conjunta de los herbicidas sobre la abundancia, actividad y estructura de las comunidades microbianas del suelo a través de la determinación de los parámetros biomasa microbiana, respiración, actividad deshidrogenasa y perfil de ácidos grasos de fosfolípidos del suelo.
 - 1.3. Estudio de la aplicación repetida de los herbicidas como una formulación conjunta (Auros Plus[®]), de la dosis de compost vegetal añadido como enmienda orgánica, del régimen de irrigación y de las propiedades del suelo.
 - 1.4. Evaluación de la influencia de diferentes factores (dosis de enmienda, riego y aplicación repetida de herbicidas como una formulación conjunta (Auros Plus[®])) sobre la estructura de las comunidades microbianas del suelo a través de la determinación del perfil de los ácidos grasos de fosfolípidos.

2. Estudio del mecanismo de disipación y de la movilidad de prosulfocarb en el suelo sin enmendar y enmendado con compost vegetal en condiciones de laboratorio:
 - 2.1. Evaluación de la disipación del herbicida aplicado a diferentes dosis y balance total de masa del herbicida marcado en ^{14}C . Determinación de las fracciones mineralizada, extraíble en solución acuosa, extraíble en solución orgánica y no extraíble (residuos enlazados) en función del tiempo.
 - 2.2. Influencia del envejecimiento del herbicida en el suelo y del régimen de lavado de la columna de suelo en la movilidad del ^{14}C -prosulfocarb a través de columnas empaquetadas de suelo sin enmendar y enmendado con compost vegetal.

Los Resultados obtenidos en el desarrollo de estos Objetivos Parciales han dado lugar a seis artículos originales de investigación publicados en revistas científicas de prestigio internacional e indexadas en la edición científica del *Journal Citation Reports* que se incluyen en el ***Apartado 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN*** de esta Memoria en la versión publicada. Un resumen en español de estos artículos se incluye también en dicho ***Apartado 4.***



INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. PESTICIDAS

2.1.1. Producción y uso actual

Un pesticida se puede definir como un compuesto químico, orgánico o inorgánico, cuyo propósito es prevenir, repeler, controlar o mitigar alguna plaga. Una plaga se define, en su sentido más amplio, como cualquier organismo vivo considerado como perjudicial por el hombre y que provoca daños a su persona, a su propiedad o al medioambiente. Puede tratarse de plagas provocadas por animales (ratones, insectos o algún parásito), plantas no deseadas (malas hierbas) o microorganismos (virus, hongos o bacterias).

En la actualidad, la utilización de pesticidas en cultivos agrícolas es esencial para proteger los cultivos frente a cualquier tipo de plaga y producir alimentos de calidad y en suficiente cantidad para cubrir las necesidades alimenticias de la creciente población mundial.

Los pesticidas deben cumplir una serie de requisitos para poder alcanzar un uso amplio en la agricultura: deben ser efectivos contra la plaga sobre la que actúan, no tener efectos negativos sobre otros organismos de la flora o fauna del terreno, su uso debe producir beneficios económicos que superen el gasto que conllevan, no deben ser tóxicos para la salud del hombre ni animales, etc. (Early, 2018). Además, la tendencia actual está dirigida a disminuir las dosis de pesticidas necesarias mediante el desarrollo de formulaciones de compuestos más eficaces que actúan de manera más específica.

Los pesticidas pueden clasificarse según diferentes criterios. La clasificación atendiendo a su aplicación es la más común y engloba a: herbicidas (control de malas hierbas), insecticidas (control de insectos), fungicidas (control de hongos), acaricidas (control de ácaros), bactericidas (control de bacterias), nematocidas (control de nematodos), rodenticidas (control de roedores), etc.

Globalmente, la mayor proporción de pesticidas utilizados en el sector de la agricultura durante el año 2017 se dio en Asia, seguido de América y Europa (FAO, 2017) (Figura 1). España es un país con un alto consumo de pesticidas y con tendencia a crecer con el tiempo. El consumo de pesticidas en nuestro país se incrementó en más de 5500 t en el periodo 2013-2016. Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2017), durante el año 2017 se llegaron a consumir más de 72000 toneladas de pesticidas en agricultura y horticultura con una inversión media de 657 M \$ (período

2000-2016). España ocupa el 9º puesto a nivel mundial en lo que a inversión en pesticidas se refiere (FAO, 2017).

Las principales categorías de productos fitosanitarios utilizados en agricultura en nuestro país corresponden al uso de fungicidas y bactericidas (53%), herbicidas (22%), insecticidas y acaricidas (9%) y a otros productos (16%) (Figura 2) (MAPA, 2017).

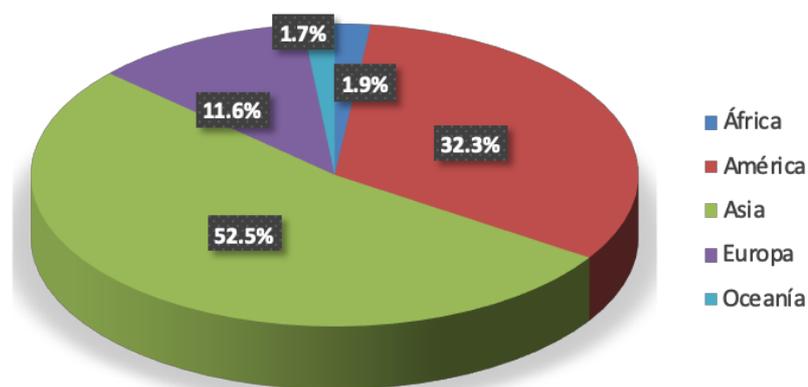


Figura 1. Porcentaje global de ventas de pesticidas en todo el mundo en el año 2017.

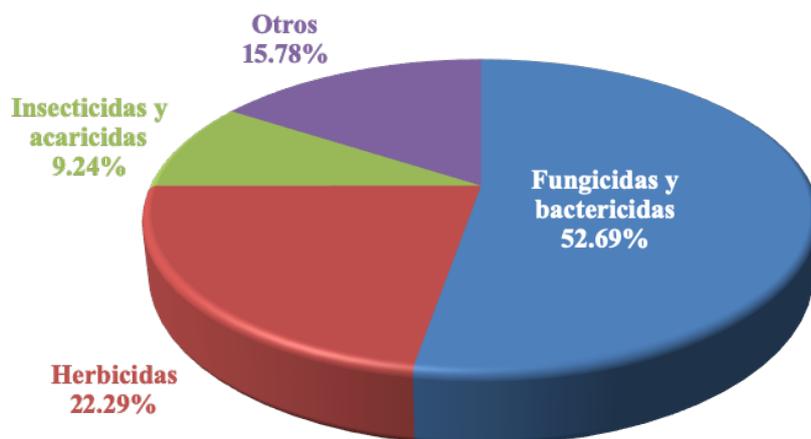


Figura 2. Cantidades (%) de los principales productos fitosanitarios comercializados en España en el año 2017.

2.1.2. Herbicidas

Los herbicidas son compuestos químicos utilizados para inhibir o impedir el desarrollo de plantas no deseadas o malas hierbas en cultivos agrícolas. Estas malas hierbas suelen presentar una alta dispersión (por el viento o el agua) y una gran resistencia. Además, provocan problemas en los cultivos tales como la reducción de la

cosecha al competir por recursos como agua o luz, dificultad de la recogida de la cosecha e incremento de los costes económicos.

Los herbicidas pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios:

i) Según su rango de acción:

- a. Totales: Se aplican para conseguir controlar la totalidad de las malas hierbas presentes. Suelen utilizarse para limpieza de terrenos. Un ejemplo es el glifosato.
- b. Selectivos: se aplican para eliminar un tipo concreto de maleza sin afectar al cultivo.

En muchas ocasiones, la clasificación de un herbicida en total o selectivo depende de su concentración o dosis aplicada, dado que un herbicida total puede convertirse en selectivo a concentraciones bajas, y viceversa.

ii) Según su modo de acción:

- a. Residuales (o de suelo): Se aplican directamente sobre el suelo, creando una película tóxica que regula la proliferación de malas hierbas de tal modo que al atravesarla les provoca la muerte. No suelen afectar a las malas hierbas que ya existían a la hora de su aplicación, sólo a las que germinen.
- b. Foliar: Pueden distinguirse dos tipos:
 - De contacto: Destruyen las hojas y tallos de las malas hierbas presentes en el terreno donde se aplica al entrar en contacto con ellas y no afectan a las raíces.
 - Sistémicos: Son absorbidos y trasladados a través del sistema vascular hasta la raíz, provocando la muerte de las plantas. En este grupo se incluyen los herbicidas hormonales.

iii) Según el momento de aplicación:

- a. Pre-siembra: Se aplican antes de la siembra.
- b. Post-siembra: Se aplican una vez se ha realizado la siembra. Pueden distinguirse dos tipos:
 - Pre-emergencia: Se aplican antes de que el cultivo emerja del suelo. Suelen utilizarse en terrenos donde haya historia de presencia de malas hierbas.
 - Post-emergencia: Se aplican cuando el cultivo y las malas hierbas ya han germinado.

iv) *Según su composición y estructura químicas:* Compuestos piridínicos y biperidínicos (paraquat, diquat, etc.), organoclorados (pentaclorofenol, etc.), dinitroanilinas (trifluralin, etc.), sulfonilureas (metsulfurón metilo, triasulfuron, etc.), triazinas (atrazina, etc.) o carbamatos y tiocarbamatos (prosulfocarb, etc.).

A la hora de elegir el herbicida más adecuado se debe tener en cuenta el estado del cultivo y de las malas hierbas a eliminar, además de las características fisicoquímicas del suelo.

Durante el año 2017, en España se utilizaron alrededor de 16000 t de herbicidas en el sector agrícola. Este valor supone un aumento de un 2.5% con respecto al año 2016 y es uno de los más altos registrados en nuestro país donde se ha ido incrementado en la última década (Figura 3) (FAO, 2017).

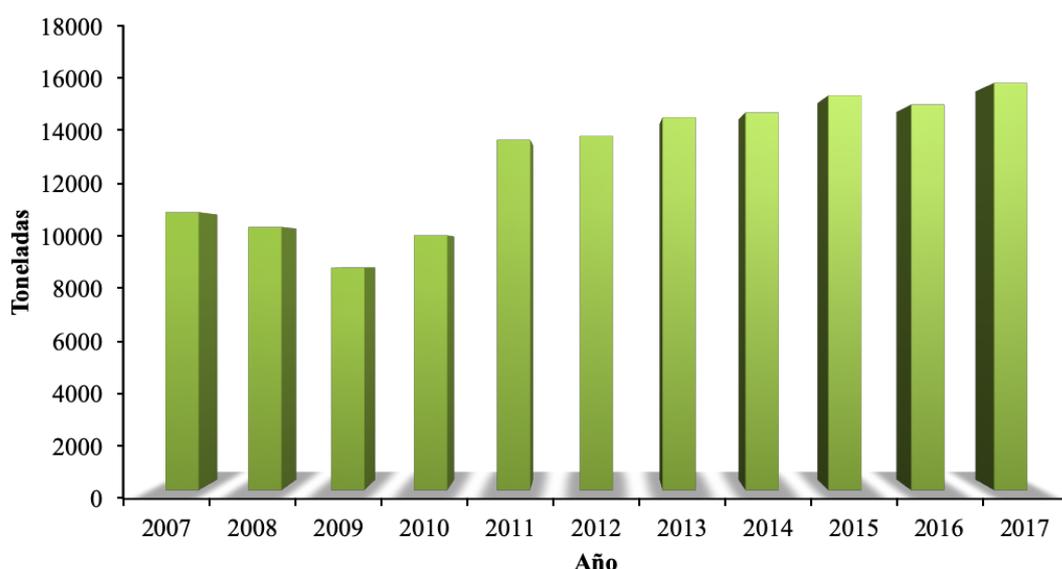


Figura 3. Evolución del uso de herbicidas en España durante los últimos años.

Compuestos pertenecientes al grupo de las sulfonamidas y tiocarbamatos, como el triasulfuron y el prosulfocarb, son ampliamente utilizados en la actualidad en diferentes tipos de cultivos. Estos compuestos pueden utilizarse de manera individual o conjunta para el control de malas hierbas en cereales de secano o regadío, ya que proporcionan un buen control de las malas hierbas (Cirujeda and Taberner, 2010; Knežević et al., 2010; Bajya et al., 2015; Mehmeti et al., 2018).

2.1.3. Contaminación de suelos y aguas por herbicidas

La aplicación de herbicidas en la agricultura actual es una práctica extendida que está dirigida a incrementar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, el uso extensivo de estos compuestos puede plantear serios problemas de contaminación ambiental (Huang et al., 2016; Malyan et al., 2019). Además, el uso de moléculas móviles y persistentes puede afectar a la calidad del suelo y de las aguas superficiales o subterráneas. Por otra parte, la movilidad de los herbicidas desde la superficie del suelo acorta la duración del control residual sobre las malas hierbas y puede producir contaminaciones de las aguas subterráneas como ha sido puesta de manifiesto en sistemas agrícolas de distintos países (Herrero-Hernández et al., 2013; Fingler et al., 2017; Gosetti et al., 2019).

La concentración máxima permitida de pesticidas, incluidos herbicidas, en aguas se encuentra regulada por diferentes directivas que tratan de limitar la contaminación de ecosistemas acuáticos. En la Directiva Europea 80/778/EEC sobre la potabilidad de las aguas y la revisión 98/83/ECC se establece una concentración máxima para un pesticida individual en aguas potables de $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, y una concentración total máxima de $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. El Reglamento (CE) número 1107/2009 del parlamento europeo, por el que se deroga la directiva 91/414/CEE, establece las normas aplicables a la autorización de productos fitosanitarios en su presentación comercial, y a su comercialización, utilización y control en la Unión Europea. Establece además las normas relativas a la aprobación de sustancias activas, protectores y sinergistas contenidos en los productos fitosanitarios. La finalidad de este reglamento es garantizar la protección de la salud humana y animal, así como el medio ambiente, además de mejorar la producción agrícola.

En la actualidad, sin embargo, se ha observado la presencia de residuos de herbicidas en suelos y aguas en diferentes países del mundo a niveles más altos de los permitidos (Echeverría-Sáenz et al., 2012; Lopez et al., 2015; Zheng et al., 2016; Herrero-Hernández et al., 2017).

Dada la naturaleza tóxica de los herbicidas, se han realizado esfuerzos considerables para controlar, entender y minimizar su impacto medioambiental (Odukkathil and Vasudevan, 2013; Marín-Benito et al., 2018).

2.2. DINÁMICA DE HERBICIDAS EN SUELOS

Los herbicidas aplicados en terrenos agrícolas sufren una dispersión o distribución entre las distintas fases del ambiente: agua, aire, suelo y biota. Estos herbicidas interaccionan con cada una de estas fases de maneras muy complejas a través de multitud de reacciones físicas, químicas o biológicas que suelen ocurrir de manera simultánea. Una vez el herbicida entra en contacto con el suelo empezará a moverse a otros sistemas con su estructura original o degradándose, en función del tiempo.

Los procesos medioambientales que rigen el comportamiento y destino de los herbicidas en suelos pueden dividirse en tres grandes grupos (Zimdahl, 2007; Marín-Benito, 2011):

- i) **Acumulación:** Procesos que conllevan el paso entre dos medios sin que el herbicida sufra ninguna transformación química. El herbicida mantiene por lo tanto su función original. En este grupo se incluyen los procesos de adsorción y desorción.
- ii) **Eliminación:** Procesos que conllevan una transformación de los herbicidas en otros diferentes que pueden presentar funciones, toxicidades y comportamientos diferentes. Puede tratarse de procesos químicos, biológicos o fotoquímicos. En este grupo se incluye el proceso de degradación.
- iii) **Movimiento:** Procesos que conllevan un desplazamiento del herbicida sin incurrir en ninguna transformación química. Se diferencian de los procesos de acumulación en que existe un desplazamiento importante desde la posición inicial. En este grupo se incluyen los procesos de lixiviación, escorrentía y volatilización.

Todos estos procesos pueden ocurrir de manera individual o simultánea y se encuentran determinados no sólo por las propiedades físicas y químicas de los herbicidas sino también por las características del medio con el que interactúa.

El proceso de **adsorción** consiste en el paso de las moléculas de un soluto (denominado adsorbato) desde la fase acuosa hasta la superficie de un sólido que actúa como sorbente (adsorbente) (Calvet et al., 1989). En el caso de los herbicidas, éstos serían el adsorbato y el suelo el adsorbente. Este proceso puede ser de naturaleza física, cuando la adsorción ocurre mediante fuerzas débiles (normalmente fuerzas de van der Waals), o de naturaleza química, cuando ocurre mediante enlace químico. El proceso de adsorción de herbicidas en el suelo está muy relacionado con la superficie específica de las

partículas del suelo y su tamaño. Debido a esto, la fracción coloidal del suelo presenta una mayor capacidad de retención de las moléculas del herbicida (Jiang et al., 2018; Spuler et al., 2019).

El proceso de **desorción** consiste en la liberación de moléculas de adsorbato de la superficie del adsorbente. La combinación de estos procesos de adsorción-desorción es muy importante para el comportamiento de los herbicidas en el suelo, ya que condicionan la cantidad de herbicida que se encuentra disponible en el suelo (Silva et al., 2019).

Entre las propiedades fisicoquímicas del suelo que están implicadas en estos procesos de acumulación destacan la textura, el contenido en arcilla y materia orgánica, y el pH del suelo. Por otra parte, las características de los herbicidas también influyen en gran medida en estos procesos, especialmente su volatilidad, solubilidad en agua, persistencia y su estructura química. Además, estos procesos se ven influenciados por diferentes factores del medio, tales como la humedad, temperatura, régimen de lluvias y de vientos, así como por las prácticas de cultivo utilizadas.

El proceso de **degradación** de un herbicida suele provocar la mayor parte de la pérdida de compuesto tras su aplicación (Noshadi et al., 2018; Schuhmann et al., 2019). La degradación puede ser ocasionada por hongos, bacterias y otros microorganismos presentes en el suelo (degradación microbiológica), por diferentes procesos químicos (oxidación, reducción, deshidrohalogenación, hidrólisis) (degradación química) o por la exposición a la luz solar (degradación fotoquímica).

En relación con los procesos que implican un movimiento de los herbicidas en el suelo cabe señalar la **lixiviación** que origina su desplazamiento vertical a través del perfil del suelo. Este proceso es consecuencia de su disolución en agua, ya sea proveniente de la lluvia o del riego y está considerado como el principal responsable de la contaminación de las aguas subterráneas. La lixiviación puede tener lugar mediante un movimiento rápido de los herbicidas en el agua a través de los macroporos del suelo (flujos preferenciales) o mediante un movimiento lento de los herbicidas a través de los microporos del mismo (flujo matricial) (Cohen et al., 1995; Whitford et al., 1995). Otros procesos de movimiento como la **escorrentía** tienen lugar cuando la cantidad de agua aplicada al suelo supera la capacidad de infiltración de dicho suelo. Debido a esto los herbicidas son transportados por la superficie disueltos en el agua o adsorbidos en partículas del suelo pudiendo llegar a alcanzar y/o contaminar las aguas superficiales

(Cohen et al., 1995; Ulrich et al., 2018). Estos compuestos pueden también transportarse por **volatilización** que consiste en la pérdida del herbicida en forma de vapor desde la superficie del suelo, del agua o de las plantas (Voutsas et al., 2005).

2.2.1. Degradación y/o disipación de herbicidas en suelos: Ensayos en laboratorio y en campo

Uno de los principales fenómenos que experimentan los herbicidas en suelo es su degradación a compuestos más sencillos (metabolitos). Por ello, los estudios de degradación, independientemente de la escala a la que se realicen, son esenciales a la hora de evaluar el destino de los herbicidas aplicados en suelos. El escenario más sencillo para el estudio de las cinéticas de degradación es el realizado en condiciones de laboratorio. En la literatura actual puede encontrarse un gran número de estudios de degradación de diferentes herbicidas en suelos con diferentes propiedades en condiciones controladas. Francisco et al. (2018) estudiaron el comportamiento del herbicida aminociclopiraclo en tres suelos con propiedades fisicoquímicas diferentes. Evaluaron la mineralización, los residuos extractables y la formación de residuos enlazados utilizando el herbicida marcado con ^{14}C en condiciones de laboratorio. El uso de compuestos marcados abre nuevas posibilidades de estudio ya que permite, en experimentos realizados en laboratorio, seguir de cerca el destino de esos compuestos al realizar balances de masas y así caracterizar de manera más precisa su comportamiento en los suelos.

En la bibliografía también puede encontrarse trabajos sobre la degradación de estos compuestos aplicados en suelos enmendados con residuos orgánicos. Por ejemplo, Rodríguez-Cruz et al. (2019) estudiaron la degradación del herbicida petoxamida aplicado a un suelo no enmendado y enmendado con lodos de depuradora y compost vegetal en condiciones de laboratorio. Los resultados mostraron que la velocidad de degradación del herbicida disminuía al aumentar la dosis de herbicida aplicado, aunque la vida media del herbicida no presentó diferencias significativas en el suelo sin enmendar y enmendado a las dosis más bajas de herbicida. Haskis et al. (2019) evaluaron la degradación del herbicida metribuzina y sus metabolitos (deamino-, deaminodiketo- y diketo-metribuzina) en condiciones de luz y de oscuridad en muestras de suelo no enmendado y enmendado con biochar. El estudio mostró que la adición del biochar redujo drásticamente o incluso inhibió la degradación durante el periodo de tiempo estudiado.

Los experimentos de degradación realizados en laboratorio permiten que las condiciones del estudio estén controladas. Sin embargo, los resultados son más realistas cuando los estudios se realizan en parcelas agrícolas bajo condiciones de campo, donde los herbicidas, suelos y otros elementos se verán expuestos a condiciones reales del medio. Por ejemplo, Pang et al. (2016) determinaron las cinéticas de disipación de los herbicidas rimsulfuron, mesotriona, fluroxipir-meptil y fluroxipir aplicados a un suelo agrícola cultivado con maíz y determinaron las cinéticas de disipación tanto en muestras de suelo como de paja. Concluyeron que, aunque en un primer momento las cantidades de herbicidas eran mayores en las muestras de paja de maíz que en las de suelo, la velocidad de degradación de los herbicidas era mayor en la paja. Carretta et al (2019) estudiaron la disipación de los herbicidas terbutilazina, su metabolito desetil-terbutilazina, y S-metacloro en condiciones de campo. El experimento se llevó a cabo en parcelas experimentales tras aplicarle un fertilizante inorgánico al suelo, enmendarlo con lodos de depuradora o con una mezcla de ambos. El estudio puso de manifiesto que los herbicidas estudiados presentaban una disipación más rápida en los suelos enmendados solamente con fertilizante inorgánico que en los suelos enmendados con lodos de depuradora o la mezcla de ambos. También se apreció que la presencia de la enmienda orgánica disminuyó la degradación del herbicida terbutilazina y la formación de su metabolito desetil-terbutilazina.

2.2.2. Movilidad de herbicidas en suelos: Ensayos en laboratorio y en campo

Los estudios sobre movilidad de herbicidas en suelos se realizan generalmente en condiciones de laboratorio o invernadero, pudiendo encontrar un gran número de estos trabajos en la literatura actual. Los estudios en laboratorio se basan en el paso de disoluciones de lavado a través columnas de suelo empaquetadas o columnas de suelo sin distorsionar contaminadas con herbicidas y el análisis posterior de las aguas lixiviadas. Berzins et al. (2019) estudiaron la movilidad del herbicida glifosato y su metabolito principal (ácido aminometilfosfónico) en columnas empaquetadas de suelo procedente de la capa superficial de suelos con diferentes características (arenoso y areno-arcilloso). Realizaron tres etapas de lavado de las columnas contaminadas. El contenido total en herbicidas recogido en las tres fases de lavado fue significativamente mayor en las columnas con suelo arenoso que en las columnas con suelo areno-arcilloso. Guimarães et al. (2019) evaluaron la movilidad de los herbicidas ametrin, diuron, hexazinone y

metribuzin utilizando columnas empaquetadas con cinco suelos con propiedades fisicoquímicas diferentes. Se aplicaron herbicidas marcados con ^{14}C y determinaron la concentración de dichos herbicidas en las aguas de lavado tras añadir 200 mm durante 48 horas simulando el efecto de la lluvia. Además, determinaron la concentración remanente de los compuestos en las columnas a diferentes profundidades. Concluyeron que la movilidad de los herbicidas dependía especialmente de las características de los suelos estudiados. Vasilakoglou et al. (2000) estudiaron la movilidad de los herbicidas alacloro, acetoclor, metolacloro, S-metolacloro, dimetenamida y flufenacet como distintas formulaciones (emulsionables y microencapsuladas) en columnas empaquetadas de un suelo limo-arcilloso. Según sus resultados, el tipo de formulación afectó a la movilidad de los herbicidas, aunque no detectaron ninguno a profundidades mayores de 30 cm.

Tejada et al. (2017) evaluaron en un suelo semiárido (Xerollic Calciorthid) el efecto de la adición de residuos sólidos municipales, estiércol de aves de corral o estiércol de vaca sobre la movilidad del herbicida flazasulfuron. El estudio se llevó a cabo en columnas empaquetadas con suelo enmendado y sin enmendar y permitió concluir que la aplicación de la enmienda orgánica disminuyó la movilidad del herbicida, especialmente con los residuos sólidos municipales. Otros autores también observaron que la movilidad de otros herbicidas como el linuron se vio afectada tras la enmienda del suelo. Marín-Benito et al. (2013) determinaron que la movilidad del linuron en columnas empaquetadas de un suelo franco arenoso enmendado con diferentes residuos orgánicos (lodos de depuradora, orujo de uva, substrato postcultivo del champiñón) se vio reducida en comparación con el suelo sin enmendar. Por su parte, Marín-Benito et al. (2018) estudiaron el efecto de 5 enmiendas orgánicas, algunas de ellas de bajo coste, utilizadas como barreras en columnas empaquetadas en la movilidad de los herbicidas etofumesato y terbutrina.

Los estudios de movilidad de herbicidas en columnas de suelo sin distorsionar lavadas posteriormente en el laboratorio permiten obtener resultados más representativos de la realidad ya que las propiedades fisicoquímicas (densidad, grado de compactación, tamaño de partícula, micro y macroporosidad, etc.) y microbiológicas del suelo se mantienen inalteradas. A pesar de ello, este tipo de estudios son menos frecuentes que los realizados en columnas empaquetadas. Walker et al. (2005) utilizaron esta técnica para estudiar la movilidad de los herbicidas clortoluron, isoproturon y triasulfuron utilizando columnas sin distorsionar de un suelo franco arenoso y un suelo arenoso franco arcilloso.

Por su parte, López-Piñeiro et al. (2014) estudiaron el efecto de la aplicación de residuos de la molienda de aceitunas como enmienda orgánica en la movilidad de los herbicidas MCPA y S-metalocloro en un suelo franco arcillo-arenoso con bajo contenido en materia orgánica en columnas de suelo inalteradas, observando un movimiento vertical más lento para MCPA y especialmente para S-metacloro en las columnas de suelo enmendado que en las de suelo sin enmendar.

Estos estudios permiten sacar conclusiones rápidas de lo que ocurre en la realidad pero de un modo aproximado. Los resultados más representativos y por tanto más extrapolables requieren estudios de movilidad en campo bajo condiciones de temperatura y humedad reales. Estos estudios se llevan a cabo extrayendo columnas del perfil de suelo donde el herbicida ha sido previamente aplicado y analizando la presencia del compuesto a diferentes profundidades (Boesten and van der Pas, 2000; Mamy et al., 2008; Cabrera et al., 2009) o mediante su recogida en lisímetros instalados en el campo y su cuantificación en los lixiviados (Marín-Benito et al., 2014). El elevado coste económico y tiempo necesario para el desarrollo de este tipo de experimentos junto con su alta dependencia de las condiciones climáticas los hacen menos habituales que los realizados en el laboratorio. Por ejemplo, Kočárek et al. (2010) estudiaron la movilidad del herbicida clortoluron a través del perfil de tres suelos diferentes mediante la toma de muestras sin alterar a diferentes profundidades (0-50 cm). Aunque detectaron la presencia del herbicida a lo largo de todo el perfil estudiado, la mayor concentración del compuesto se encontró en la capa más superficial del suelo (0-2 cm).

2.3. RESIDUOS ORGÁNICOS

2.3.1. Residuos orgánicos y su uso como enmienda en agricultura

Según la legislación española (Ley 10/1998 del 21 de abril), se define *residuo* como “cualquier sustancia u objeto perteneciente a alguna persona de las categorías que figuran en el anexo de esta ley, del cual su poseedor se desprenda o del que tenga la intención u obligación de desprenderse”. Según cual sea el origen de estos residuos, puede hablarse de residuos orgánicos, de origen animal y vegetal (ya sean urbanos, agrícolas, industriales o ganaderos) e inorgánicos (papel, envases, vidrio, metales equipos eléctricos, etc). Los residuos orgánicos suponen alrededor del 80% del total de residuos

generados en países desarrollados, por lo que es imprescindible su gestión de manera adecuada para evitar problemas medioambientales y de salud para las personas. Una buena gestión de estos residuos persigue poder aprovechar el valor económico que pueden tener y buscarles una aplicación en lugar de desecharlos.

El aumento de la superficie destinada a la agricultura a nivel mundial, y otros factores como el uso intensivo de pesticidas está acelerando la degradación del suelo y disminuyendo su fertilidad. La disminución en el contenido de materia orgánica que originan modifica a su vez los niveles de nutrientes disponibles en el suelo y su capacidad de retención de agua, debido a una menor porosidad y capacidad de infiltración (FAO, 2017). Por ejemplo, los suelos de Castilla y León presentan un contenido muy bajo en materia orgánica menor del 1% en más del 50% de los suelos (Código de Buenas Prácticas Agrarias de Castilla y León, 1998) y, por tanto, con mayor predisposición hacia fenómenos de degradación y desertización en ellos. Una posible vía de abordar este problema sería la reutilización de residuos orgánicos como enmienda orgánica aplicada en suelos directamente o tras su compostaje. La mejora en las propiedades del suelo debido al contenido en materia orgánica en estos residuos está bien documentada, por lo que su aplicación como enmiendas orgánicas en agricultura es una práctica común (Ferrerías et al., 2006; Tejada and González, 2008; Aranda et al., 2015; Bastida et al., 2015) que ha atraído un interés considerable en los últimos años (Scotti et al., 2015).

Una gran variedad de residuos orgánicos pueden ser aplicados como enmiendas orgánicas en la agricultura entre los que cabe destacar los residuos urbanos (lodos de depuradora), los derivados de la industria agroalimentaria (los residuos generados en el cultivo del champiñón y setas comestibles), o de la producción agrícola y ganadera (restos de cosechas, podas y purines). Los residuos generados en las podas de parques y jardines, o compost vegetal (Figura 4) han experimentado un gran crecimiento en los últimos años en España. En 2015, 229300 toneladas of compost vegetal se generaron en España, lo cual representa un 1.13% de los residuos urbanos (MAPA, 2017). Estos residuos vegetales son biodegradables, potencialmente aprovechables y presentan un contenido en materia orgánica superior al 15% en peso seco tras someterse a un proceso de compostaje. Por ello, pueden considerarse como una fuente de materia orgánica para el suelo más estable que la proporcionada por otros residuos biodegradables, como los biosólidos o los lodos de depuradora.



Figura 4. a) Compost vegetal; b) Parcelas agrícolas enmendadas con compost vegetal.

El uso de este compost vegetal presenta ciertas ventajas al aplicarse como enmienda orgánica: es una alternativa económica y relativamente sencilla logísticamente para dar salida a estos residuos procedentes de las podas de plantas urbanas, disminuye potencialmente la producción de metano por parte de los residuos orgánicos al llevarse a cabo un compostaje aerobio, mejora la fertilidad del suelo al aumentar el contenido de materia orgánica, y disminuye la necesidad de fertilizantes inorgánicos e irrigación. En España, su utilización como fertilizante o enmienda orgánica del suelo se encuentra regulada por el Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes (BOE 296, 6 diciembre 2017).

2.3.2. Efecto de residuos orgánicos en el comportamiento de herbicidas

La aplicación de residuos orgánicos al suelo implica la inclusión de nueva materia orgánica en el mismo para mejorar su calidad. Sin embargo, esta nueva materia orgánica exógena (sólida y líquida) de distinta naturaleza a la presente en el suelo puede influir en el comportamiento de los herbicidas aplicados (Marín-Benito et al., 2012, 2013, 2014). Estos herbicidas pueden ser adsorbidos por los suelos enmendados ya que el aumento de materia orgánica sólida facilitará un aumento de adsorción de los pesticidas no-iónicos, hidrofóbicos, con solubilidad baja o muy baja en agua (Huang et al., 1995), lo que puede tener consecuencias para su degradación, persistencia y movilidad (Rodríguez-Liévana et al., 2014; Marín-Benito et al., 2016; Keren et al., 2017). Estos procesos pueden disminuir la contaminación por parte de estos herbicidas tanto en el suelo como en las aguas subterráneas, pero también pueden afectar a la concentración final que se encuentra biodisponible para su absorción por parte de las malas hierbas a las que van destinados (Barriuso et al., 1997). Sin embargo, el aumento de materia orgánica líquida podría

aumentar la movilidad de estos compuestos, mediante el establecimiento de interacciones hidrofóbicas con la materia orgánica disuelta en el agua facilitando su solubilización y transporte en el suelo, con la consiguiente contaminación de las aguas subterráneas (Kozak, 1996; Cox et al., 2007).

En la actualidad se realizan muchos estudios sobre la influencia de los residuos orgánicos de diferente origen (estiércol, lodos procedentes de aguas residuales, residuos agroindustriales procedentes de la elaboración de vino, aceite o el cultivo del champiñón) en la adsorción, movilidad y degradación de pesticidas en los suelos enmendados (Gámiz et al., 2012; Cheng et al., 2017; James et al., 2019). Algunos abordan también el estudio de la influencia de la materia orgánica disuelta procedente de estos residuos en el comportamiento de los pesticidas en el suelo (Cox et al., 2001; Barriuso et al., 2011) o la influencia en la biodisponibilidad de los residuos en los suelos enmendados (Gevao et al., 2001; Barriuso et al., 2004).

Se han llevado a cabo algunos estudios para evaluar el efecto del compost vegetal en la adsorción y disipación de los herbicidas mesotriona, triasulfuron, petoxamida, flufenacet y clortoluron en suelos agrícolas enmendados con este residuo en condiciones de laboratorio (Marín-Benito et al., 2019; Pose-Juan et al., 2015, 2017, 2018; Rodríguez-Cruz et al., 2019). En estos trabajos se indicó que la disipación de los herbicidas en suelos enmendados con compost vegetal estaba controlada principalmente por el proceso de adsorción que aumenta con la aplicación de la enmienda orgánica al suelo, disminuyendo la biodisponibilidad de los compuestos y la velocidad de degradación de los herbicidas.

2.3.3. Efecto de residuos orgánicos sobre las comunidades microbianas del suelo

La aplicación de residuos orgánicos como enmiendas, con el objetivo de mejorar la fertilidad y estabilidad del suelo, provoca además la estimulación del crecimiento y biomasa microbiana (Bastida et al., 2015). El uso de enmiendas orgánicas puede incluir además nuevos microorganismos al suelo y promover el crecimiento de microorganismos específicos que modifiquen la estructura, actividad, funcionamiento y diversidad microbianas (García-Delgado et al., 2015; Álvarez-Martín et al., 2016; Sun et al., 2017). El tipo de enmienda aplicada determinará este incremento en la biomasa microbiana.

Después de la aplicación de diferentes residuos orgánicos en suelos se ha observado un efecto estimulador en la actividad microbiana determinada por un incremento de la actividad deshidrogenasa (Marín-Benito et al., 2014; Álvarez-Martín et al., 2016; Pose-Juan et al., 2018). Sin embargo, se han observado casos en los que la actividad deshidrogenasa disminuía o aumentaba en el tiempo en presencia de herbicidas y enmiendas orgánicas, según su disipación y / o metabolismo en el suelo enmendado (Pose-Juan et al., 2017).

2.3.4. Efecto de los herbicidas sobre las comunidades microbianas del suelo

La actividad microbiana es un indicador preciso de la calidad del suelo, ya que los microorganismos presentes juegan un papel clave en la descomposición de la materia orgánica y en los ciclos biogeoquímicos que afectan a la fertilidad del suelo (Pascual et al., 2000; García-Orenes et al., 2013; Swarcewicz et al., 2013). En la agricultura intensiva moderna, debido a la aplicación de grandes cantidades de herbicidas durante el periodo de crecimiento del cultivo (Nyamwasa et al., 2018), se han detectado residuos de estos compuestos en suelos de áreas agrícolas en un amplio rango de concentraciones (Li et al., 2014; Pose-Juan et al., 2015), lo que puede provocar cambios en la biodiversidad microbiana del suelo. Estos residuos dependen de su disipación en el suelo, viéndose modificados por diferentes factores ambientales (tipo de suelo, materia orgánica del suelo, régimen de temperatura y precipitaciones, irrigación, etc.), por la formulación de los pesticidas y el método de aplicación (una dosis o dosis repetidas) (Arias-Estévez et al., 2008).

El uso extensivo de los herbicidas puede llevar a una disminución en la biodiversidad microbiana del suelo, con un impacto negativo en el rendimiento de los cultivos (Baxter and Cummings, 2008), lo que puede agravarse por la pérdida de materia orgánica del suelo que se ha detectado en los últimos años (Pascual et al., 2000). Las comunidades microbianas del suelo son sensibles a algunos herbicidas, como las sulfonilureas, que afectan a sus procesos biológicos (Patyka et al., 2016; Wang et al., 2018). Las concentraciones retenidas en el perfil del suelo pueden superar el umbral conocido para las sensibilidades de las especies susceptibles.

Hoy en día, obtener información sobre los efectos que tienen los herbicidas sobre los microorganismos del suelo y la evaluación de la toxicidad de estos compuestos para las comunidades microbianas es un requisito indispensable para mejorar la regulación de la utilización de los herbicidas a corto plazo (Karpouzas et al., 2014). Según la literatura, la presencia de herbicidas y su degradación en suelos puede inhibir, promover, o ser inocua a la diversidad microbiana y sus funciones (Hussain et al., 2009; Imfeld and Vuilleumier, 2012). Por lo tanto, considerando la importancia de la biomasa microbiana, su diversidad y actividad en muchos ciclos del suelo, y por tanto, en su salud, existe un importante interés científico en determinar el impacto que los herbicidas tienen en las comunidades microbianas del suelo (Martin-Laurent et al., 2010).

Algunos trabajos inciden en la capacidad que presentan los microorganismos del suelo para degradar los herbicidas presentes en el suelo (Hussain et al., 2007) utilizando estos compuestos como fuente de energía y nutrientes para incrementar el tamaño de la población microbiana del suelo (Tyess et al., 2006). Más recientemente, estudios sobre los cambios en la composición microbiana y/o estructura y funcionamiento de la comunidad mediante la utilización de técnicas moleculares de extracción de ADN del suelo, amplificación (PCR) y diferenciación por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) (Wang et al., 2009; Sopeña and Bending, 2013), perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos (Cycoń et al., 2013; Pose-Juan et al., 2017), o técnicas similares (Widenfalk et al., 2008) han suscitado un gran interés.

2.3.5. Efecto de la aplicación de residuos orgánicos y herbicidas de manera simultánea sobre las comunidades microbianas del suelo

No existe mucha información en la literatura sobre la respuesta y funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo al aplicar de manera simultánea pesticidas y residuos orgánicos. La mayoría de los estudios publicados al respecto han sido realizados bajo condiciones de laboratorio o invernadero (Cycoń et al., 2013; Karpouzas et al., 2014), mientras que de nuevo los experimentos en condiciones de campo son muy escasos (Spyrou et al., 2009; Petric et al., 2016).

Dado que la aplicación de enmiendas orgánicas afecta al comportamiento de los herbicidas en el suelo, podrán regular su biodisponibilidad a los microorganismos y su concentración, afectando a su posible impacto sobre las comunidades microbianas.

En la última década el creciente interés por conocer estos efectos ha propiciado un aumento de las publicaciones en la bibliografía mundial, tal como se indica en algunas revisiones recientes sobre el tema (Bünemann et al., 2006, Gianfreda y Rao, 2008, 2011; Hussain et al., 2009). Generalmente se determinan parámetros de las comunidades microbianas indicadores de la abundancia, como la biomasa microbiana del suelo (Dutta et al., 2010), o de su actividad o funcionamiento, como la respiración del suelo (Joseph et al., 2010; Cycoñ et al., 2012) o las actividades enzimáticas, siendo las más estudiadas las oxidorreductasas, como la deshidrogenasa, y las hidrolasas, como ureasa y fosfatasa (Romero et al., 2010). Esta aplicación combinada de enmiendas orgánicas y pesticidas puede incrementar o reducir la abundancia relativa de bacterias y hongos durante el tiempo de disipación de los herbicidas en suelos enmendados según el tipo de enmienda y el tiempo de incubación (Pose-Juan et al., 2017).

2.4. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Martín, A., Sánchez-Martín, M.J., Pose-Juan, E., Rodríguez-Cruz, M.S., 2016. *Effect of different rates of spent mushroom substrate on the dissipation and bioavailability of cymoxanil and tebuconazole in an agricultural soil.* Science of the Total Environment, 550, 495-503.

Aranda, V., Macci, C., Peruzzi, E., Masciandaro, G., 2015. *Biochemical activity and chemical-structural properties of soil organic matter after 17 years of amendments with olive-mill pomace co-compost.* Journal of Environmental Management, 147, 278–285.

Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.C., García-Río, L., 2008. *The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources.* Agriculture, Ecosystems & Environment, 123, 247–260.

Bajya, D.R., Parween, T., Lakharan, M.C., Razaaza, S.K., 2015. *Efficacy of new formulations of triasulfuron on weeds in wheat (*Triticum aestivum*) and their residual effects on succeeding maize (*Zea mays*).* Indian Journal of Agronomy, 60, 57–60.

Barriuso, E., Andrades, M.S., Benoit, P., Houot, S., 2011. *Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from composts: experimental data and modelling approach.* Biogeochemistry 106,117–133.

Barriuso, E., Houot, S., Serra-Wittling, C., 1997. *Influence of compost addition to soil on the behavior of herbicides.* Pesticide Science, 49, 65-75.

Barriuso, E., Koskinen, W.C., Sadowsky, M.J., 2004. *Solvent extraction characterization of bioavailability of atrazine residues in soils.* Journal of agricultural and food chemistry, 52, 6552-6556.

- Bastida, F., Selevsek, N., Torres, I.F., Hernández, T., García, C., 2015.** *Soil restoration with organic amendments: Linking cellular functionality and ecosystem processes*. Scientific Reports, 5, 1–12.
- Baxter, J., Cummings, S.P., 2008.** *The degradation of the herbicide bromoxynil and its impact on bacterial diversity in a top soil*. Journal of applied microbiology, 104, 1605–1616.
- Berzins, A., Jansons, M., Kalneniece, K., Shvirksts, K., Afanasjeva, K., Kasparinskis, R., Grube, M., Bartkevics, V., Muter, O., 2019.** *Modeling the mobility of glyphosate from two contrasting agricultural soils in laboratory column experiments*. Journal of environmental science and health Part B, 54, 539-548.
- Boesten, J., van der Pas, L. J. T., 2000.** *Movement of water, bromide and the pesticides ethoprophos and bentazone in a sandy soil: The Vredepeel data set*. Agricultural Water Management, 44, 21-42.
- Bünemann, E.K., Schwenke, G.D., Van Zwieten, L., 2006.** *Impact of agricultural inputs on soil organisms - a review*. Australian Journal of Soil Research, 44, 379-406.
- Cabrera, A., Cox, L., Fernández Hernández, A., C. García-Ortiz Civantos, Cornejo, J., 2009.** *Field appraisalment of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention*. Agriculture, Ecosystems and Environment, 132, 260- 266.
- Calvet, R., 1989.** *Adsorption of organic chemicals in soils*. Environmental Health Perspectives, 88, 145-177.
- Carretta, L., Cardinali, A., Zanin, G., Masin, R., 2019.** *Effect of sewage amendment on the dissipation of terbuthylazine, its degradation compound desethyl-terbuthylazine, and S-metolachlor in a field study*. Journal of Environmental Science and Health Part B, 54, 187-195.
- Cheng, J., Lee, X., Gao, W., Chen, Y., Pan, W., Tang, Y., 2017.** *Effect of biochar on the bioavailability of difenoconazole and microbial community composition in a pesticide-contaminated soil*. Applied Soil Ecology, 121, 185-192.
- Cirujeda, A., Taberner, A., 2010.** *Chemical control of herbicide-resistant Lolium rigidum Gaud. in north-eastern Spain*. Pest Management Science, 66, 1380–1388.
- Cohen, S.Z., Wauchope, R.d., Klein, A.W., Eassforth, C.V., Graney, R., 1995.** *Offsite transport of pesticides in water: mathematical models of pesticides leaching and runoff*. Pure and Applied Chemistry, 67, 2109-2148.
- Cox, L., Cecchi, A., Celis, R., Hermosin, M.C., Koskinen, W.C., Cornejo, J., 2001.** *Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils*. Soil Science Society of America Journal, 65, 1688-1695.
- Cox, L., Velarde, P., Cabrera, A., Hermosin, M. C., Cornejo, J., 2007.** *Dissolved organic carbon interaction with sorption and leaching of diuron in organic-amended soils*. European Journal of Soil Science, 58, 714–21.
- Cycoń, M., Lewandowska, A., Piotrowska-Seget, Z., 2012.** *Mineralization dynamics of chlormequat chloride (CCC) in soils of different textures*. Polish Journal of Environmental Studies, 21, 595-602.
- Cycoń, M., Wójcik, M., Borymski, S., Piotrowska-Seget, Z., 2013.** *Short-term effects of the herbicide napropamide on the activity and structure of the soil microbial community assessed by the multiapproach analysis*. Applied Soil Ecology, 66, 8-18.

Dutta, M., Sardar, D., Pal, R., Kole, R.K., 2010. *Effect of chlorpyrifos on microbial biomass and activities in tropical clay loam soil.* Environmental monitoring and assessment, 160, 385-391.

Early, R., 2018. *Pesticides in agriculture.* Food Science and Technology, 32, 36-38.

Echeverría-Sáenz, S., Mena, F., Pinnock, M., Ruepert, C., Solano, K., de la Cruz, E., Campos, J. Sánchez-Avila, B., Lacorte, S., Barata, C., 2012. *Environmental hazards of pesticides from pineapple crop production in the Río Jiménez watershed (Caribbean Coast, Costa Rica).* Science of the Total Environment, 440, 106-114.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). www.fao.org. Fecha de consulta: septiembre 2019.

Ferreras, L., Gomez, E., Toresani, S., Firpo, I., Rotondo, R., 2006. *Effect of organic amendments on some physical, chemical and biological properties in a horticultural soil.* Bioresource Technology, 97, 635-640.

Fingler, S., Mendaš, G., Dvorščak, M., Stipičević, S., Vasilić, Ž., Drevenkar, V., 2017. *Herbicide micropollutants in surface, ground and drinking waters within and near the area of Zagreb, Croatia.* Environmental science and pollution research international, 24, 11017-11030.

Francisco, J.G., Mendes, K. F., Pimpinato, R. F., Tornisielo, V. L., Guimarães, A. N. D., 2018. *Soil Factors Effects on the Mineralization, Extractable Residue, and Bound Residue Formation of Aminocyclopyrachlor in Three Tropical Soils.* Agronomy, 8.

Gámiz, B., Celis, R., Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J., 2012. *Effect of olive-mill waste addition to soil on sorption, persistence, and mobility of herbicides used in Mediterranean olive groves.* Science of the Total Environment, 429, 292-299.

García-Delgado, C., D'Annibale, A., Pesciaroli, L., Yunta, F., Crognale, S., Petruccioli, M., Eymar, E., 2015. *Implications of polluted soil biostimulation and bioaugmentation with spent mushroom substrate (*Agaricus bisporus*) on the microbial community and polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation.* Science of the Total Environment, 508, 20-28.

García-Orenes, F., Morugán-Coronado, A., Zornoza, R., Scow, K., 2013. *Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a mediterranean agro-ecosystem.* PLOS One, 8, e80522.

Gevao, B., Mordaunt, C., Semple, K.T., Pierce, T.G., Jones, K.C., 2001. *Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues in earthworms.* Environmental science & technology, 33, 501-507.

Gianfreda, L., Rao, M.A., 2008. *Interactions between xenobiotics and microbial an enzymatic soil activity.* Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 38, 269-310.

Gianfreda, L., Rao, M.A., 2011. *The influence of pesticides on soil enzymes.* En: Shukla G., Varma, A., Soil Enzymology, Soil Biology, 22, 293-312.

Gosetti, F., Robotti, E., Bolfi, B., Mazzucco, E., Quasso, F. Manfredi, M., Silvestri, S., Facchi, A., Marengo, E., 2019. *Monitoring of water quality inflow and outflow of a farm in Italian Padana plain for rice cultivation: a case study of two years.* Environmental Science and Pollution Research, 26, 21274-21294.

Guimarães, A.C.D., Mendes, K.F., Campion, T.F., Christoffoleti, P.J., Tornisielo, V.L., 2019. *Leaching of Herbicides Commonly Applied to Sugarcane in Five Agricultural Soils.* Planta Daninha 37.

Haskis, P., Mantzos, N., Hela, D., Patakioutas, G., Konstantinou, I., 2019. *Effect of biochar on the mobility and photodegradation of metribuzin and metabolites in soil–biochar thin-layer chromatography plates.* International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 99, 310-327.

Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Álvarez-Martín, A., Pose-Juan, E., Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J., 2013. *Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region.* Journal of Hydrology, 486, 234–245.

Herrero-Hernández, E., Rodríguez-Cruz, M.S., Pose-Juan, E., Sánchez-González, S., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., 2017. *Seasonal distribution of herbicide and insecticide residues in the water resources of the vineyard region of La Rioja (Spain).* Science of the Total Environment, 609, 161-171.

Huang, P.M., Berthelin, J., Bollag, J.M., McGill, W.B., Page, A.L. 1995. *Environmental Impact of Soil Component Interactions.* Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 450.

Huang, X., He, J., Yan, X., Hong, Q., Chen, K., He, Q., Zhang, L., Liu, X., Chuang, S., Li, S., Jiang, J., 2016. *Microbial catabolism of chemical herbicides: Microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes.* Pesticide Biochemistry and Physiology, 143, 272-297.

Hussain, S., Arshad, M., Saleem, M. Khalid, A., 2007. *Biodegradation of α and β -endosulfan by soil bacteria.* Biodegradation 18, 731-740.

Hussain, S., Siddique, T., Arshad, M., Saleem, M., 2009. *Bioremediation and phytoremediation of pesticides: Recent advances.* Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 39, 843–907.

Imfeld, G., Vuilleumier, S., 2012. *Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review.* European Journal of Soil Biology, 49, 22–30.

James, T.K., Ghanizadeh, H., Harrington, K.C., Bolan, N.S., 2019. *Effect on herbicide adsorption of organic forestry waste products used for soil remediation.* Journal of Environmental Science and Health Part B, 54, 407-415.

Jiang, R., Wang, M., Chen, W., 2018. *Characterization of adsorption and desorption of lawn herbicide siduron in heavy metal contaminated soils.* Chemosphere, 204, 483-491.

Joseph, R., Reed, S., Jayachandran, K., Clark-Cuadrado, C., Dunn, C. 2010. *Endosulfan has no adverse effect on soil respiration.* Agriculture, Ecosystems & Environment, 138, 181-188.

Karpouzias, D.G., Kandeler, E., Bru, D., Friedel, I., Auer, Y., Kramer, S., Vasileiadis, S., Petric, I., Udikovic-Kolic, N., Djuric, S., Martin-Laurent, F., 2014. *A tiered assessment approach based on standardized methods to estimate the impact of nicosulfuron on the abundance and function of the soil microbial community.* Soil Biology and Biochemistry, 75, 282–291.

Keren, Y., Borisover, M., Schaumann, G.E., Diehl, D. Tamimic, N., Bukhanovskya, N., 2017. *Land disposal of olive mill wastewater enhances ability of soil to sorb diuron: Temporal persistence, and the effects of soil depth and application season.* Agriculture, Ecosystems & Environment, 236, 43–51.

Knežević, M., Antunović, M., Baličević, R., Ranogajec, L., 2010. *Weed control in winter wheat as affected by tillage and post-emergence herbicides.* *Herbologia*, 11, 47–55.

Kočárek, M., Kodešová, R., Kozák, J., Drábek, O., 2010. *Field Study of Chlorotoluron Transport and its Prediction by the BPS Mathematical Model.* *Soil and Water Research*, 5, 153–160.

Kozak, J., 1996. *Soil organic matter as a factor influencing the fate of organic chemicals in the soil environment.* A. Piccolo (ED.), En: *Humic substances in terrestrial ecosystem.* Elsevier, Amsterdam, 625-664.

Li, Y., Niu, J., Shen, Z., Zhang, C., Wang, Z., He, T., 2014. *Spatial and seasonal distribution of organochlorine pesticides in the sediments of the Yangtze Estuary.* *Chemosphere* 114, 233–240.

López Piñero, A., Peña, D., Albarrán, A., Sánchez Llerena, J., Becerra, D., 2014. *Long-term effects of olive mill waste amendment on the leaching of herbicides through undisturbed soil columns and mobility under field conditions.* *Soil and Tillage Research*, 144, 195-204.

Lopez, B., Ollivier, P., Togola, A., Baran, N., Ghestem, J.P., 2015. *Screening of French groundwater for regulated and emerging contaminants.* *Science of the Total Environment*, 518-519, 562-573.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente. Gobierno de España) <http://www.magrama.gob.es>.

Malyan, S.K., Singh, R., Rawat, M., Kumar, M., Pugazhendhi, A., Kumar, A., Kumar, V., Kumar, S.S., 2019. *An overview of carcinogenic pollutants in groundwater of India.* *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101288.

Mamy, L., Gabrielle, B., Barriuso, E., 2008. *Measurement and modelling of glyphosate fate compared with that of herbicides replaced as a result of the introduction of glyphosate-resistant oilseed rape.* *Pest management science*, 64, 262-275.

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). www.mapa.gob.es. Fecha de consulta: septiembre 2019.

Marín Benito, J.M., 2011. *Dinámica de fungicidas en suelos de viñedo enmendados con sustratos postcultivo de hongos.* <https://digital.csic.es/handle/10261/43630>. Universidad de Salamanca-CSIC.

Marín Benito, J.M., Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2014. *Effect of different organic amendments on the dissipation of linuron, diazinon and myclobutanil in an agricultural soil incubated for different time periods.* *Science of the Total Environment*, 476-477, 611-621.

Marín-Benito, J. M., Sánchez-Martín, M. J., Rodríguez-Cruz, M. S., 2016. *Impact of spent mushroom substrates on the fate of pesticides in soil, and their use for preventing and/or controlling soil and water contamination: a review.* *Toxics*, 4, 17.

Marín-Benito, J.M., Andrades, M.S., Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J., 2012. *Changes in the sorption-desorption of fungicides over time in an amended sandy clay loam soil under laboratory conditions.* *Journal of Soils and Sediments*, 12, 1111–1123.

Marín-Benito, J.M., Brown, C.D., Herrero-Hernández, E., Arienzo, M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2013. *Use of raw or incubated organic wastes as amendments in reducing pesticide leaching through soil columns.* Science of the Total Environment, 463–464, 589–599.

Marín-Benito, J.M., Brown, C.D., Herrero-Hernández, E., Arienzo, M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2013. *Use of raw or incubated organic wastes as amendments in reducing pesticide leaching through soil columns.* Science of the Total Environment, 463–464, 589–599.

Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Ordax, J.M., Draoui, K., Azejjel, H., Rodríguez-Cruz, M.S., 2018. *Organic sorbents as barriers to decrease the mobility of herbicides in soils. Modelling of the leaching process.* Geoderma, 313, 205–216.

Martin-Laurent, F., Benizri, E., Durand, R., Gianinazzi-Pearson, V., Guilbaut, P., Lauga, B., Leyval, C., Philippot, L., Riveira-Becceril, F., Salducci, X., Soulas, G., 2010. *Bioindicators for the assessment of side effects of pesticides on soil biological status: Report of a collaborative study conducted for the French ministry of the environment.* En: Bufo, S.A., Scrano, L. (Eds.), Pesticides 2010, 6th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment, University of Basilicata, Potenza, Italy, 231-236.

Mehmeti, A., Pacanoski, Z., Fetahaj, R., Kika, A., Kabashi, B., 2018. *Weed control in wheat with post-emergence herbicides.* Bulgarian Journal of Agricultural Science, 24, 74–79.

Noshadi, E., Homae, M., 2018. *Herbicides degradation kinetics in soil under different herbigation systems at field scale.* Soil and Tillage Research, 184, 37- 44.

Nyamwasa, I., Li, K., Rutikanga, A., Rukazambuga, D.N.T., Zhang, S., Yin, J., Ya-zhong, C., Zhang, X.X., Sun, X., 2018. *Soil insect crop pests and their integrated management in East Africa: A review.* Crop Protection, 106, 163–176.

Odukkathil, G., Vasudevan, N., 2013. *Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil.* Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 12, 421–444.

Pang, N., Wang, T., Hu, J., 2016. *Method validation and dissipation kinetics of four herbicides in maize and soil using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography tandem mass spectrometry.* Food Chemistry, 190, 793-800.

Pascual, J.A., Garcia, C., Hernandez, T., Moreno, J.L., Ros, M., 2000. *Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes.* Soil Biology and Biochemistry, 32, 1877–1883.

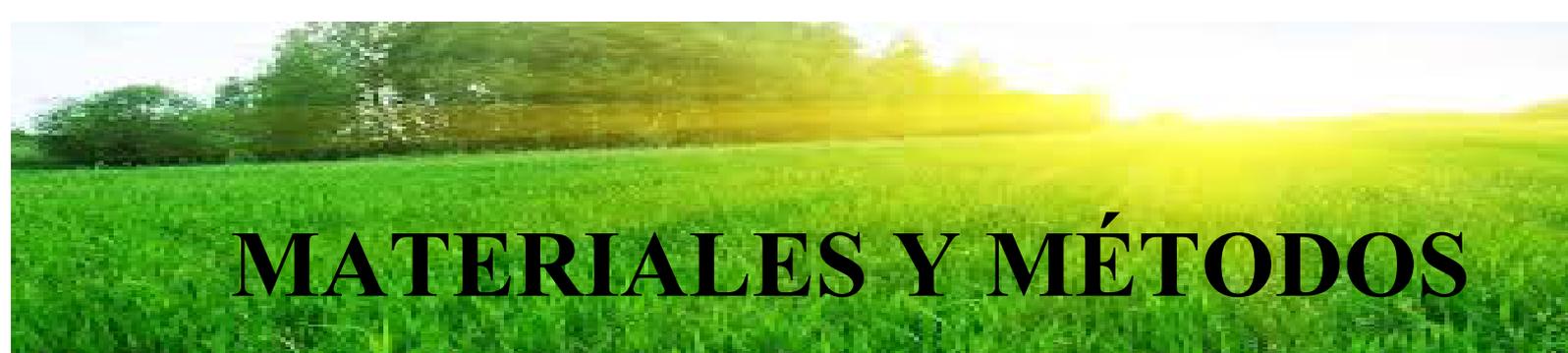
Patyka, V., Buletsa, N., Pasichnyk, L., Zhitkevich, N., Kalinichenko, A., Gnatiuk, T., Butsenko, L., 2016. *Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria.* Ecological Chemistry and Engineering S, 23, 311–331.

Petric, I., Karpouzas, D.G., Bru, D., Udikovic-Kolic, N., Kandeler, E., Djuric, S., Martin-Laurent, F., 2016. *Nicosulfuron application in agricultural soils drives the selection towards NS-tolerant microorganisms harboring various levels of sensitivity to nicosulfuron.* Environmental science and pollution research international, 23, 4320–4333.

Pose-Juan, E., Igual, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2017. *Influence of herbicide triasulfuron on soil microbial community in an unamended soil and a soil amended with organic residues.* Frontiers in microbiology, 8, 378.

- Pose-Juan, E., Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2018.** *Dissipation of herbicides after repeated application in soils amended with green compost and sewage sludge.* Journal of Environmental Management, 223, 1068-1077.
- Pose-Juan, E., Sánchez-Martín, M.J., Andrades, M.S., Rodríguez-Cruz, M.S., Herrero-Hernández, E., 2015.** *Pesticide residues in vineyard soils from Spain: Spatial and temporal distributions.* Science of the Total Environment. 514, 351–358.
- Rodríguez Cruz, M. S.; Pose Juan, E.; Marín Benito, J. M.; Igual, J. M.; Sánchez Martín, M. J., 2019.** *Pethoxamid dissipation and microbial activity and structure in an agricultural soil: Effect of herbicide rate and organic residues.* Applied Soil Ecology, 140, 135-143.
- Rodríguez-Liébana, J.A., El Gouzi, S., Mingorance, M.D., Castillo, A., Peña, A., 2014.** *Irrigation of a Mediterranean soil under field conditions with urban wastewater: Effect on pesticide behavior.* Agriculture, Ecosystems & Environment, 185, 176–185.
- Romero, E., Fernández-Bayo, J., Castillo Díaz, J.M., Nogales, R., 2010.** *Enzyme activities and diuron persistence in soil amended with vermicompost derived from spent grape marc and treated with urea.* Applied Soil Ecology, 44, 198-204.
- Schuhmann, A., Klammler, G.b, Weiss, S., Gans, O., Fank, J., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H., 2019.** *Degradation and leaching of bentazone, terbuthylazine and S-metolachlor and some of their metabolites: A long-term lysimeter experiment.* Plant, Soil and Environment, 65, 273-281.
- Scotti, R., Bonanomi, G., Scelza, R., Zoina, A., Rao, M.A., 2015.** *Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems.* Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 15, 333-352.
- Silva, T.S., de Freitas Souza, M., Maria da Silva Teófilo, T., Silva dos Santos, M, Formiga Porto, M.A., Martins Souza, C.M., Barbosa dos Santos, J., Silva, D.V., 2019.** *Use of neural networks to estimate the sorption and desorption coefficients of herbicides: A case study of diuron, hexazinone, and sulfometuron-methyl in Brazil.* Chemosphere, 236, 124333.
- Sopeña, F., Bending, G., 2013.** *Impacts of biochar on bioavailability of the fungicide azoxystrobin: A comparison of the effect on biodegradation rate and toxicity to the fungal community.* Chemosphere, 91, 1525-1533.
- Spuler, M.J., Briceño, G., Duprat, F., Jorquera, M., Céspedes, C., Palma, G., 2019.** *Sorption Kinetics of 2,4-D and Diuron Herbicides in a Urea-Fertilized Andisol.* Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 19, 313-320.
- Spyrou, I.M., Karpouzas, D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., 2009.** *Do botanical pesticides alter the structure of the soil microbial community?* Microbial Ecology, 58, 715–727.
- Sun, D., Li, K., Bi, Q., Zhu, J., Zhang, Q., Jin, C., Lu, L., Lin, X., 2017.** *Effects of organic amendment on soil aggregation and microbial community composition during drying-rewetting alternation.* Science of the Total Environment, 574, 735–743.
- Swarcewicz, M., Gregorczyk, A., Sobczak, J., 2013.** *Comparison of linuron degradation in the presence of pesticide mixtures in soil under laboratory conditions.* Environmental monitoring and assessment, 185, 8109–8114.
- Tejada, M., Concepción, B., 2017.** *Flazasulfuron behavior in a soil amended with different organic wastes.* Applied Soil Ecology, 117-118, 81-87.

- Tejada, M., Gonzalez, J.L., 2008.** *Influence of two organic amendments on the soil physical properties, soil losses, sediments and runoff water quality.* Geoderma, 145, 325–334.
- Tyess, D.L., Shea, P.J., Parkhurst, A.M., 2006.** *Mineralization potential of atrazine and degradation intermediates from clustered characteristics in inoculated soils.* Soil and Sediment Contamination, 15, 87-102.
- Ulrich, U., Hörmann, G., Unger, M., Pfannerstill, M., Steinmann, F., Fohrer, N., 2018.** *Lentic small water bodies: Variability of pesticide transport and transformation patterns.* Science of the Total Environment, 618, 26–38.
- Vasilakoglou, I. B., Eleftherohorinos, I. G., Dhima, K. B., 2000.** *Activity, adsorption and mobility of three acetanilide and two new amide herbicides.* Weed Research, 41, 535-546.
- Voutsas, E., Vavaa, C. Magoulas, K., Tassios, D., 2005.** *Estimation of the volatilization of organic compounds from soil surfaces.* Chemosphere 58, 751-758.
- Walker, A., Rodriguez-Cruz, M.S., Mitchell, M.J., 2005.** *Influence of ageing of residues on the availability of herbicides for leaching.* Environmental Pollution, 133, 43-51.
- Wang, X., Sun, S.-Y., Zhang, H.-W., 2018.** *Advances in the research on microbial degradation of sulfonylurea herbicides.* Chinese Journal of Ecology, 37, 3449-3457.
- Wang, Y-S., Huang, Y-J., Chen, W-C., Yen, J-H., 2009.** *Effect of carbendazim and pencycuron on soil bacterial community.* Journal of Hazardous Materials, 172, 84-91.
- Whitford, F., Wolt, J., Nelson, H., Barret, M., Brichford, S., Turco., R., 1995.** *Pesticides and water quality principles, policies and programs.* Purdue University Cooperative Extension Service, West Lafayette.
- Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I., Goedkoop, W., 2008.** *Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes-Responses at various levels of microbial community organization.* Environmental Pollution, 152, 576-584.
- Zhao, Y., Wendling, L.A., Wang, C, Pei, Y., 2017.** *Behavior of chlorpyrifos and its major metabolite TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol) in agricultural soils amended with drinking water treatment residuals.* Journal of Soils and Sediments, 17, 889-900.
- Zheng, S., Chen, B., Qiu, X., Chen, M., Ma, Z., Yu, X., 2016.** *Distribution and risk assessment of 82 pesticides in Jiulong River and estuary in South China.* Chemosphere, 144, 1177-1192.
- Zimdahl, R.L., 2007.** *Fundamentals of Weed Science.* 5ª edición. Academic Press, Estados Unidos.



MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Compost vegetal

Se han utilizado dos tipos de compost vegetal (GC) como enmiendas orgánicas en los estudios realizados. Ambos proceden del compostaje de residuos de origen vegetal procedentes de la poda de plantas y árboles en parques y jardines. El primero (GC1) fue suministrado por el Ayuntamiento de Salamanca y el segundo (GC2) por los viveros “El Arca S.L.” en Salamanca (Figura 5). Sus principales características fisicoquímicas referidas a materia seca se recogen en la Tabla 1.



Figura 5. Compost vegetales (GC1 y GC2).

Tabla 1. Características de los compost vegetales

Propiedades	GC1	GC2
pH	7.33	7.58
^a CO (%)	9.80	24.1
^b COD (%)	0.35	0.70
N (%)	1.04	1.10
C/N	9.42	21.9
Cenizas (%)	74.5	54.0

^a carbono orgánico; ^b carbono orgánico disuelto

3.1.2. Suelo

Los experimentos de campo y laboratorio se llevaron a cabo en un suelo franco arcillo-arenoso (58% arena, 17% limo, 25% arcilla, 0.21% CaCO₃) (Typic Haploxerept) (Soil Survey Staff, 2010) situado en la finca experimental Muñovela perteneciente al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC). Se diseñaron parcelas experimentales en este suelo sin enmendar (S) y enmendado con los dos compost vegetales indicados en el apartado anterior (S+GC1; S+GC2) (Figura 6). Las principales características de este suelo sin enmendar y enmendado se incluyen en la Tabla 2.



Figura 6. Fotografía aérea de las parcelas experimentales diseñadas en la finca experimental Muñovela (Barbadillo, Salamanca).

Tabla 2. Características del horizonte superficial del suelo (0-10 cm) sin enmendar y enmendado.

Suelo	pH	CO (%)	COD (%)	N (%)	C/N	Mineralogía ^a
S	7.35	1.30	0.006	0.12	10.8	K, I, M
S+GC1	7.77	1.98	0.007	0.19	10.6	
S+GC2	7.30	4.66	0.027	0.42	11.0	

^a K, Caolinita; I, Iilita; M, Montmorillonita.

3.1.3. Herbicidas

Los diferentes estudios realizados se han llevado a cabo con dos herbicidas pertenecientes a dos grupos químicos distintos: triasulfuron y prosulfocarb. Estos herbicidas presentan diferentes características químicas y se aplican habitualmente en cultivos de cereal de Castilla y León.

Triasulfuron

Triasulfuron (2-(2-cloroetoxi)-N-(((4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il) amino) carbonil) bencenosulfonamida) es una sulfonilurea con actividad herbicida selectiva para el control en pre- y post-emergencia de especies de hoja ancha en cultivos de cebada, avena y trigo.

El triasulfuron es un ácido débil (pKa 4.8) que se presenta de manera predominante en forma de anión a pH alto. Su peso molecular es 401.8 g mol^{-1} . Tiene una elevada solubilidad en agua (815 mg L^{-1} a 20°C) y baja hidrofobicidad por lo que presenta una alta movilidad en suelos. Este herbicida actúa inhibiendo la actividad de la enzima acetolactato sintasa, responsable de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) en plantas y bacterias. Su estructura química y algunas de sus características se incluyen en la Tabla 3.

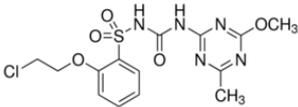
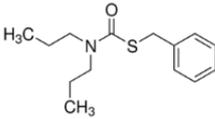
Prosulfocarb

Prosulfocarb (S- (fenilmetil) dipropilcarbamoato) es un tiocarbamato sistémico con actividad selectiva al aplicarse de manera temprana en pre- y post-emergencia contra hierbas y malezas de hoja ancha en cultivos como la cebada y el trigo de ciclo largo.

El prosulfocarb es un herbicida hidrófobo con alta adsorción, baja movilidad y moderada persistencia en suelo. Su peso molecular es $251.39 \text{ g mol}^{-1}$. Este herbicida actúa inhibiendo la enzima elongasa. Por ello su principal efecto es la inhibición de las síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga (lípidos), aunque también afectan a los tejidos meristemáticos. Además, actúa inhibiendo la síntesis del ácido shikímico como efecto secundario, lo que conlleva una disminución del contenido de flavonoides y una variación de la composición y contenido de aminoácidos. Su estructura química y algunas de sus características se incluyen en la Tabla 3.

El estándar analítico de ambos compuestos fue de PESTANAL[®] (pureza > 98.9%) y suministrado por Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, España). El prosulfocarb se utilizó además marcado en ¹⁴C (actividad específica 3.16 MBq mg⁻¹, pureza 94.8%) y fue suministrado por IZOTOP Co. Ltd (Budapest, Hungría). Para el estudio de campo se utilizaron las formulaciones comerciales individuales de triasulfuron (Logran[®] 20% p/p) y prosulfocarb (Auros[®] 80% p/v) y además se utilizó la formulación combinada de ambos herbicidas (Auros Plus[®]). Estos productos comerciales fueron suministrados por Syngenta Agro S.A (Madrid, España).

Tabla 3. Características de los herbicidas (PPDB, 2019).

	Triasulfuron	Prosulfocarb
Nombre (IUPAC)	1-[2-(2-chloroethoxy) phenylsulfonyl]-3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl) urea	<i>S</i> -benzyl dipropyl(thiocarbamate)
Estructura química		
Solubilidad agua (mg L ⁻¹)	815 (20°C, pH 7)	13.0 (20°C, pH 6.1)
log K _{ow}	-0.59 (20°C, pH 7)	4.48 (20°C, pH 7)
DT ₅₀ (laboratorio) (días)	59.1	12.4
DT ₅₀ (campo) (días)	38.5	9.8
pKa	4.64 (25°C)	-
Índice GUS	5.12	0.84

3.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.2.1. Caracterización del compost vegetal y del suelo sin enmendar y enmendado

Las características del compost vegetal se determinaron en muestras molidas y tamizadas en un tamiz de malla con luz < 2 mm. Su pH se midió en una suspensión del compost en agua destilada en una proporción 1:2.5 (peso:volumen). Su humedad se determinó mediante diferencia de peso tras secar 5 g de los residuos a una temperatura de 110 °C durante 24 h. El contenido en cenizas se determinó por diferencia de peso después

de calcinar 5 g de los residuos a una temperatura de 540°C. El carbono orgánico disuelto (COD) se determinó en una suspensión del residuo en agua ultrapura Milli-Q con una relación 1:100 (peso:volumen) tras someterse a una agitación durante 24 h a 20°C. La suspensión se centrifugó durante 20 min a 10000 rpm y posteriormente se filtró a través de filtros de nylon de 0.45 µm (Sartorius Stedim Biotech, Alemania). La determinación se realizó en un analizador de carbono Shimadzu TOC-VCSH (Shimadzu, Columbia, MD, Estados Unidos) a partir de rectas de calibrado de disoluciones patrón preparadas con ftalato potásico de diferentes concentraciones (entre 1 y 1000 µg mL⁻¹). El contenido en carbono orgánico total (CO) y de nitrógeno (N) se determinó en un analizador elemental LECO CN628 (LECO Corporation, Saint Joseph, USA).

Las características de los suelos se determinaron siguiendo los métodos habituales de análisis de suelos en muestras tamizadas utilizando un tamiz de malla de 2 mm (Sparks, 1996). La composición granulométrica de los suelos se determinó mediante el método de la pipeta de Robinson. El CO y N se determinaron con el analizador elemental LECO CN628. El COD se determinó mediante el mismo procedimiento indicado para el compost vegetal pero utilizando una relación 1:2 (peso:volumen). El carbono inorgánico, expresado como CaCO₃, se determinó mediante el Calcímetro de Bernard. Los minerales de arcilla se identificaron cualitativamente por difracción de rayos X usando un difractómetro Philips PW 1710 (Eindhoven, Países Bajos) (Robert, 1975).

3.2.2. Estudio de disipación y movilidad de los herbicidas triasulfuron y prosulfocarb en el suelo sin enmendar y enmendado: Experimentos de campo

Se estudió la disipación y movilidad de los herbicidas triasulfuron y prosulfocarb aplicados en las parcelas experimentales como formulaciones comerciales de los herbicidas en forma individual y conjunta. Se realizaron dos experimentos para estudiar la influencia de diferentes factores en los procesos indicados. En ambos experimentos se analizó la variación de la concentración de los herbicidas en función del tiempo, bien en la capa superficial del suelo (0-10 cm) para estudiar su cinética de disipación o a lo largo del perfil del suelo (0-50 cm) para estudiar su movilidad. En ambos procesos se estudió:

- i) La influencia de la aplicación del GC como enmienda del suelo y de la aplicación individual o conjunta de los herbicidas

Para este estudio se establecieron 24 parcelas experimentales de 9 m² de superficie (3m × 3m) de manera aleatoria con tres réplicas por tratamiento. De dichas parcelas, 12 estaban compuestas por suelo sin enmendar y 12 estaban compuestas por suelo enmendado con GC1 con una dosis de 120 t ha⁻¹ en peso seco (~ 11.6 t C ha⁻¹). Previamente a la enmienda, el suelo fue labrado y el GC incorporado en la capa superficial del suelo (0-20 cm) de cada parcela. Tres parcelas sin enmendar y enmendadas fueron tratadas con las formulaciones comerciales individuales de cada uno de los herbicidas (Logran[®] y Auros[®]) y con la formulación comercial combinada de ambos (Auros Plus[®]). Los herbicidas fueron aplicados como soluciones acuosas (5 L) de forma manual usando una mochila acoplada a un pulverizador (8 salidas) poco después de la enmienda. Las dosis aplicadas, tanto en las formulaciones individuales como en la conjunta, fueron de 100 g i.a. ha⁻¹ para el triasulfuron y de 4.5 kg i.a. ha⁻¹ para el prosulfocarb (dosis recomendadas). Otras tres parcelas, tanto sin enmendar como enmendadas, fueron utilizadas como controles y no fueron tratadas con los herbicidas.

- ii) La influencia de la dosis de GC aplicado como enmienda del suelo, riego y dosis repetidas de herbicidas

El diseño experimental para este estudio consistió en 6 parcelas de suelo sin enmendar y 12 parcelas de suelo enmendado con GC. Se utilizaron dos GC (GC1 y GC2) para conseguir diferente contenido de materia orgánica en las parcelas. Seis de las parcelas fueron enmendadas con una dosis de 120 t ha⁻¹ en peso seco (~ 12 t C ha⁻¹, S+GC1) y otras 6 parcelas con una dosis de 180 t ha⁻¹ en peso seco (~ 40 t C ha⁻¹, S+GC2). Las parcelas experimentales se dispusieron de manera aleatoria. Los residuos orgánicos fueron incorporados a la capa superficial del suelo (0-20 cm). En cada tratamiento, tres parcelas recibieron riego adicional de 2.8 mm por semana (123.2 mm en total), mientras que las otras sólo recibieron agua por medio de la lluvia. Las parcelas fueron tratadas con la formulación comercial conjunta de ambos herbicidas (Auros Plus[®]) de manera similar al estudio anterior. Las dosis aplicadas fueron de 250 g i.a. ha⁻¹ para el triasulfuron y 11.25 kg i.a. ha⁻¹ para el prosulfocarb (2.5 veces la dosis agronómica de los mismos). Se realizó una segunda aplicación de los herbicidas en las parcelas cuando la disipación de los herbicidas superó el 50% de la cantidad inicialmente aplicada (68 días).

3.2.3. Toma de muestras de suelos

Para estudiar la disipación de los herbicidas se tomaron muestras de suelo del tramo superficial (0-10 cm) de las parcelas experimentales a diferentes tiempos después de su aplicación. El primer muestreo tuvo lugar 24 h después de la aplicación de los herbicidas para determinar la concentración inicialmente aplicada. Se tomaron 5 submuestras de cada parcela que fueron mezcladas antes de ser transportadas en contenedores de polipropileno (Figura 7a).

Para estudiar la movilidad de los herbicidas se tomaron columnas de suelo hasta 50 cm de profundidad (5 en cada parcela). Cada columna fue dividida en 5 tramos de 10 cm cada uno y se prepararon muestras medias mezclando la muestra correspondiente a cada tramo de las 5 columnas de cada parcela. Las muestras mezcladas correspondientes a cada uno de los tramos se transportaron en contenedores de polipropileno (Figura 7b).



Figura 7. Toma de muestra superficial (a) y en profundidad (b) en las parcelas experimentales.

3.2.4. Extracción y análisis cuantitativo de los herbicidas

La extracción de los herbicidas se llevó a cabo en el laboratorio a partir de 6 g de muestra de suelo, por duplicado, tratadas con 12 mL de metanol. La mezcla se sometió a un proceso de agitación (sonicación) durante 1 h y posteriormente se mantuvo en agitación mecánica intermitente durante 24 h en cámara termostaticada a 20°C.

Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min y se filtró mediante filtros de nylon de 0.45 μm . Se tomó un volumen de 8 mL y se evaporó hasta sequedad bajo flujo de nitrógeno en un evaporador EVA-EC2-L (VLM GmbH, Bielefeld, Alemania). Los residuos se disolvieron en 0.75 mL de metanol con ácido fórmico (1%) y se transfirieron a viales de HPLC para su posterior análisis. La determinación cuantitativa de los herbicidas se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de masas (HPLC-MS).

El análisis de los herbicidas se llevó a cabo en un cromatógrafo Waters (Waters Assoc., Milford, MA, Estados Unidos) equipado con un sistema de bombeo multisolvente modelo e2695 y un inyector automático acoplado a un espectrómetro de masas Micromass ZQ (MS) equipado con una interfaz de electrospray (ESI) y un sistema para la adquisición y procesamiento de datos Empower Pro (Waters Technologies) (Figura 8). Se utilizó una columna Luna[®] 3 μm PFP(2) 100 Å (150 \times 4.6 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos) a temperatura ambiente.



Figura 8. Equipo de cromatografía líquida HPLC-MS.

Se utilizó una fase móvil compuesta por un 70% de acetonitrilo de grado HPLC y un 30% de agua ultrapura Milli-Q (millipore) con 1% de ácido fórmico. La velocidad de flujo de la fase móvil fue 0.4 mL min^{-1} y el volumen de inyección fue 10 μL . Se utilizó una temperatura de 120 $^{\circ}\text{C}$ para la fuente y se fijó la temperatura de desolvatación en 300 $^{\circ}\text{C}$. Se aplicó un voltaje de cono de 20V, un voltaje del capilar de 3.08 kV, un voltaje del extractor de 5 V y un voltaje de las lentes de 0.3 V.

Para la detección del triasulfuron, se buscó la relación m/z de 402.8 correspondiente al ion molecular positivo $[M+H]^+$. Su tiempo de retención bajo las condiciones anteriormente descritas fue de 6.1 min y sus límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron $0.018 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.059 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. En el caso del prosulfocarb, su ion molecular positivo presentó una relación m/z de 252.4 y su tiempo de retención fue 14.1 min. Su LOD y LOQ fueron $0.005 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.017 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

El análisis cuantitativo de las cantidades de los herbicidas presentes en las disoluciones se llevó a cabo a partir del área bajo el pico de cada compuesto en modo SIM. El equipo determinó automáticamente las rectas de calibrado considerando las áreas de los picos eluidos correspondientes a los patrones de diferentes concentraciones. Las rectas de calibrado utilizadas se prepararon en soluciones de extractos de los adsorbentes para evitar un posible efecto matriz.

3.2.5. Determinación de parámetros indicadores de la estructura, abundancia y actividad de las comunidades microbianas durante el proceso de disipación de los herbicidas

Análisis del perfil de ácidos grasos de fosfolípidos del suelo

La composición o estructura de las comunidades microbianas del suelo de las parcelas experimentales se llevó a cabo a partir del análisis del perfil de ácidos grasos de fosfolípidos (Frostegård et al., 1993) en las muestras superficiales (0-10 cm) de suelo sin enmendar y enmendado, y tratadas o sin tratar con los herbicidas. Las muestras de suelo fueron liofilizadas inmediatamente después de ser tomadas. Posteriormente, se pesaron 2 g de material seco por duplicado y se utilizaron para la extracción de los lípidos. Los lípidos fueron extraídos con una disolución tampón de cloroformo-metanol-fosfato. Los fosfolípidos se separaron de otros lípidos no polares y se transformaron en ésteres metílicos de ácidos grasos antes de su análisis. La cuantificación de los fosfolípidos se llevó a cabo usando un cromatógrafo de gases modelo Agilent 7890 (Agilent technologies, Wilmington, DE, Estados Unidos) equipado con una columna de 25 m Ultra 2 (5% fenil)-metilpolisiloxano (J&W Scientific, Folsom, CA, Estados Unidos) y un detector de ionización de llama. Los fosfolípidos fueron identificados utilizando estándares de ácidos grasos bacterianos y un software de sistema de identificación

microbiano (Microbial ID, Inc., Newark, DE, Estados Unidos). Se utilizaron algunos ácidos grasos específicos como biomarcadores (Zelles, 1999) para cuantificar la abundancia relativa de bacterias Gram negativas (ácidos grasos monosaturados y ciclopropil 17:0) y Gram positivas (ácidos grasos ramificados saturados iso y anteiso), Actinobacterias (ácidos grasos 10-metil) y hongos (18:2 ω6 cis).

Biomasa microbiana del suelo

La biomasa del suelo se determinó a partir del contenido en nitrógeno presente en la biomasa. El nitrógeno de la biomasa fue extraído del suelo mediante la técnica de fumigación-extracción con cloroformo durante 7 días (Vance et al., 1987). El contenido del citoplasma fue extraído con una disolución de K₂SO₄ (Figura 9a) y el amonio presente fue analizado por colorimetría con un autoanalizador de flujo segmentado modelo AutoAnalyzer 3 (Bran+Luebbe GmbH, Norderstedt, Alemania). Los resultados se expresaron como mg C kg⁻¹ de suelo seco, convirtiendo las concentraciones de nitrógeno a carbono con un factor de 21 (García-Izquierdo, 2003).

Respiración del suelo

La respiración del suelo es un indicador del nivel de estrés que una perturbación puede provocar en los microorganismos del suelo. Este parámetro se determinó a partir de la depresión originada por el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos. La absorción de oxígeno por parte de los microorganismos del suelo se cuantificó en muestras de 50 g de suelo durante un periodo de 4 días utilizando un equipo OxiTop Control OC 110 (WTW, Weilheim, Alemania) (Figura 9b). El CO₂ producido por el metabolismo de los microorganismos del suelo fue retenido en una disolución de 10 mL de NaOH 1M. Aplicando la ecuación de los gases ideales se obtienen los moles de oxígeno y los resultados se expresan como mg O₂ g⁻¹ de suelo seco.

Actividad deshidrogenasa del suelo

Se determinó la actividad deshidrogenasa del suelo como un indicador de la actividad microbiana total. Se llevó a cabo siguiendo el método de Tabatabai (1994) a los distintos tiempos de muestreo. Se pesaron 6 g de muestra de suelo por duplicado y se mezclaron con 0.06 g de CaCO₃, 1 mL de una disolución acuosa de cloruro de 2,3,5-trifeniltretrazolio (TTC) al 3% y 2.5 mL de agua ultrapura Milli-Q (Millipore). La reacción se incubó a 37°C en oscuridad y condiciones anaerobias durante 24 h. Tras este

tiempo se extrajo el compuesto 1,3,5-trifenilformazan (TPF) originado en el proceso mediante tres extracciones seguidas con 7 mL de metanol. Las tres fracciones fueron mezcladas y diluidas hasta 25 mL con metanol. Los reactivos TTC y TPF fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España). La actividad deshidrogenasa se determinó a partir de la medida de la absorbancia del compuesto TPF a la longitud de onda de 485 nm en un espectrofotómetro UV-visible modelo Cary 100 Conc (Varian Optical Spectroscopy Instruments) (Figura 9c). Los valores se expresan en $\mu\text{g TPF g}^{-1}$ de suelo seco.



Figura 9. Determinación de: a) biomasa microbiana; b) respiración; y c) actividad deshidrogenasa del suelo.

3.2.6. Estudios de la disipación y movilidad de prosulfocarb en el suelo sin enmendar y enmendado: Experimentos de laboratorio

Disipación del herbicida

Se estudió la disipación del herbicida prosulfocarb en muestras de suelo sin enmendar y enmendado con compost vegetal GC2 en condiciones de laboratorio utilizando prosulfocarb no marcado y marcado en ^{14}C . El suelo sin enmendar procedía del horizonte superficial (0-30 cm) de la parcela experimental de la Finca Muñovela (parcelas control sin enmienda y sin tratar con los herbicidas). El suelo enmendado se preparó incorporando el compost vegetal GC2 de manera uniforme en una proporción de 20% p/p ($\sim 180 \text{ t ha}^{-1}$). El suelo y el GC se tamizaron ($< 2 \text{ mm}$) previamente a su mezcla. Los suelos enmendados se incubaron durante 10 días a una temperatura de 20°C en cámara termostatizada para estabilizar el suelo enmendado. Se determinó la humedad y la capacidad de campo de las muestras de suelo sin enmendar y enmendado con GC2.

Se estudió la influencia de la concentración de prosulfocarb presente en el suelo en la disipación del herbicida. Para ello el herbicida se añadió a muestras de suelo duplicadas (700 g) en un volumen de agua desionizada y esterilizada con una concentración adecuada para alcanzar una concentración en suelo de 4 mg kg^{-1} (dosis agronómica) y de 10 mg kg^{-1} (2.5 veces la dosis agronómica). Posteriormente, se añadió agua desionizada suficiente para incrementar la humedad a un 40% de la capacidad de campo. Esta humedad se mantuvo constante durante todo el experimento mediante el aporte de pequeñas cantidades de agua desionizada para compensar las pérdidas. Las muestras se incubaron en recipientes de polipropileno a 20°C en cámara termostatazada y en condiciones de oscuridad.

Además, se prepararon muestras de 300 g de suelo esterilizadas utilizando una autoclave a una temperatura de 120°C durante 1 h tres días seguidos. Estas muestras se prepararon en matraces Erlenmeyer con tapón de algodón estéril envuelto en gasa y cubierto con papel de aluminio para minimizar las pérdidas de humedad. El herbicida se aplicó a estas muestras estériles alcanzando una concentración de 4 mg kg^{-1} . Estos suelos estériles se utilizaron como controles para comprobar la degradación química del herbicida. Todo el manejo de las muestras estériles se realizó en cámara de flujo laminar y todo el material de manipulación y muestreo fue esterilizado previamente con etanol.

Por otra parte, se realizó un experimento paralelo utilizando el compuesto marcado en ^{14}C . Se incubaron al mismo tiempo muestras por duplicado de suelo sin enmendar y enmendado con GC2 para estudiar el mecanismo de disipación de prosulfocarb y su biodisponibilidad. Un volumen de 10 mL de solución acuosa del herbicida no marcado se marcó con ^{14}C -prosulfocarb y se añadió a muestras de 500 g de suelo sin enmendar y enmendado con GC2 para alcanzar concentraciones de 4 mg kg^{-1} y 10 mg kg^{-1} en suelo seco y una actividad de aproximadamente 100 Bq g^{-1} . Al igual que con el herbicida no marcado, la humedad de las muestras se ajustó y mantuvo al 40% de la capacidad de campo durante todo el experimento. En los recipientes contenedores de estas muestras se dispuso un vial de centelleo con 1 mL de disolución acuosa de NaOH 1M mediante un clip de acero inoxidable a modo de trampa para retener el $^{14}\text{CO}_2$ (Reid et al., 2002).

Movilidad del herbicida

La movilidad del prosulfocarb se llevó a cabo utilizando columnas de suelo empaquetadas. Se utilizaron columnas de vidrio de 3 cm de diámetro interno y 25 cm de largo rellenas con 100 g de suelo sin enmendar o enmendado con GC2 en una proporción de 20% p/p. Estas columnas se saturaron con agua destilada introduciéndolas verticalmente en un recipiente con agua permitiendo que ascendiera por capilaridad. A continuación, se dejó drenar el exceso de agua durante 24 h para que la humedad fuera equivalente a la capacidad de campo. Se estimó el volumen de poro de las columnas de suelo por la diferencia de peso entre las columnas saturadas con agua y las columnas secas. El herbicida se añadió sobre la superficie de las columnas mediante la adición de 1 mL de una disolución en metanol de 1 mg mL^{-1} para alcanzar una concentración de 10 mg kg^{-1} en el suelo (2.5 veces la dosis agronómica) y una actividad aproximada de 10 kBq mL^{-1} .

La movilidad del herbicida se estudió en diferentes condiciones de lavado de las columnas y de envejecimiento del herbicida. Un grupo de columnas se lavaron inmediatamente después de la aplicación del herbicida mientras que en otro grupo el herbicida se incubó durante 28 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad para analizar la influencia de la incubación o envejecimiento del herbicida en el suelo sobre su movilidad. El lavado de las columnas se realizó con una disolución de CaCl_2 0.01M en lugar de agua para minimizar la disrupción del balance mineral del suelo (Figura 10).

Se estudiaron dos flujos diferentes de lavado: flujo saturado y flujo saturado-no saturado. Bajo flujo saturado, se bombearon 500 mL de la disolución de CaCl_2 de manera continua a una velocidad de 1 mL min^{-1} manteniendo siempre la superficie de la columna en contacto con la disolución. Bajo flujo saturado-no saturado, se bombeó el mismo volumen total de disolución de CaCl_2 pero distribuido a lo largo de 25 días (20 mL / día). Para medir la mineralización del herbicida se dispuso una trampa en la parte alta de la columna con 1 mL de una disolución de NaOH 1M para atrapar el $^{14}\text{CO}_2$, de manera similar al indicado en el estudio de disipación en laboratorio. Para mantener un flujo constante de lavado se utilizó una bomba peristáltica modelo Gilson MINIPULS 3 (Gilson Inc. Middleton, WI, Estados Unidos). Las fracciones lixiviadas de 20 mL se recogieron con un colector automático de fracciones modelo Gilson F203. Una vez finalizado el lavado de las columnas, éstas se cortaron en tres segmentos (0-5 cm, 5-10 cm y 10-15 cm), se secó el suelo y se pesó para su posterior análisis.

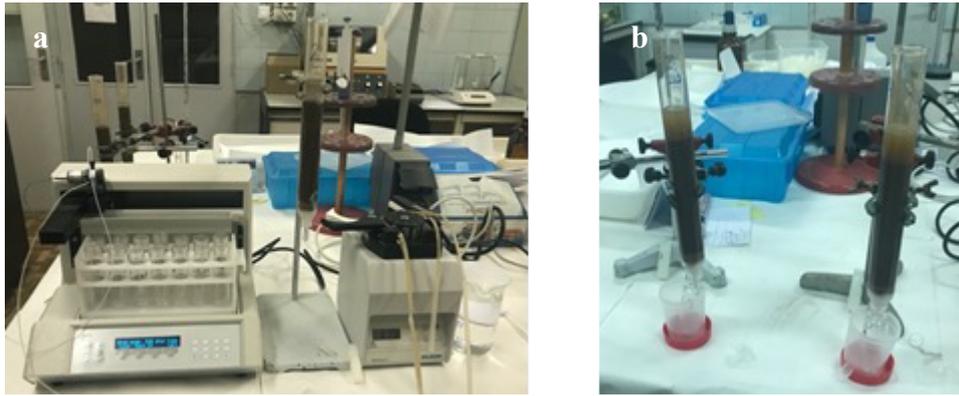


Figura10. Columnas empaquetadas y lavadas bajo flujo saturado (a) y flujo saturado-no saturado (b).

Extracción del herbicida y determinación analítica

Para la determinación del herbicida no marcado en el estudio de disipación se tomaron muestras de suelo por duplicado a diferentes tiempos. Los métodos utilizados para la extracción del herbicida desde las muestras de suelo y para su determinación mediante HPLC-MS son los indicados anteriormente para los experimentos de campo (Apartado 2.2.4).

El ^{14}C -prosulfocarb se extrajo de las muestras de suelo mediante un proceso secuencial. En primer lugar, se extrajeron 5 g de suelo por duplicado con 10 mL de solución acuosa de CaCl_2 0.01 M mediante agitación durante 24 h. A continuación, se realizó una segunda extracción con 10 mL de metanol mediante agitación durante 24 h.

La determinación del ^{14}C -prosulfocarb se llevó a cabo mediante la medida de la actividad del ^{14}C de las soluciones en un contador de centelleo líquido modelo Beckman LS 6500 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA) (Figura 11). La actividad del compuesto se midió en desintegraciones por minuto (dpm) y se llevó a cabo por duplicado tomando 1 mL de extracto en un vial de centelleo y añadiendo 4 mL de líquido de centelleo (Ecoscint TMA, National Diagnostics, Atlanta, GA). Se preparó un blanco por duplicado para cada suelo (utilizando agua como control) para medir las dpm que corresponden al fondo y corregir así interferencias que podría distorsionar la medida debido a los extractos solubles de los suelos. La determinación cuantitativa de la mineralización de prosulfocarb se realizó añadiendo 4 mL de líquido de centelleo al vial que contenía la disolución de NaOH 1M y midiendo la actividad en contador de centelleo líquido.



Figura 11. Contador de centelleo líquido.

Finalmente, se determinó el ^{14}C residual en el suelo a partir de la combustión de la muestra. La actividad remanente en las muestras debida al herbicida no extraíble o enlazado al suelo tras las extracciones se determinó por triplicado mediante combustión de 1 g de muestra previamente secada utilizando un horno de combustión Biological Oxidizer OX500 (R.J. Harvey Instrument Corporation, NJ, Estados Unidos) en corriente de oxígeno a 900 °C (Figura 12).



Figura 12. Horno de combustión para muestras marcadas con ^{14}C .

El $^{14}\text{CO}_2$ generado fue atrapado en una mezcla de 1 mL de etanolamina y 15 mL de líquido de centelleo (Oxysolve C-400, Zinsser Analytic, Berkshire, Reino Unido) y analizado en contador de centelleo como se ha indicado anteriormente. Finalmente, se calculó el balance de masa de ^{14}C como porcentaje de la cantidad total de la actividad medida en las diferentes fracciones (líquidas y sólidas).

Determinación cuantitativa del ion trazador cloruro

Las características dispersivas de las columnas de suelo utilizadas en el estudio se describieron a partir del comportamiento de movilidad del ion trazador cloruro (Cl^-). Se

añadieron 47 g de ion cloruro a cada columna correspondientes a 1 mL de una disolución de KCl de concentración 100 g L⁻¹. La movilidad del ion cloruro se estudió bajo los mismos flujos aplicados a las demás columnas (flujo saturado y flujo saturado-no saturado). La concentración del ion cloruro se determinó mediante cromatografía iónica utilizando un sistema modular de cromatografía iónica Metrohm (Metrohm Ltd., Herisau, Suiza) con supresión química (Figura 13).

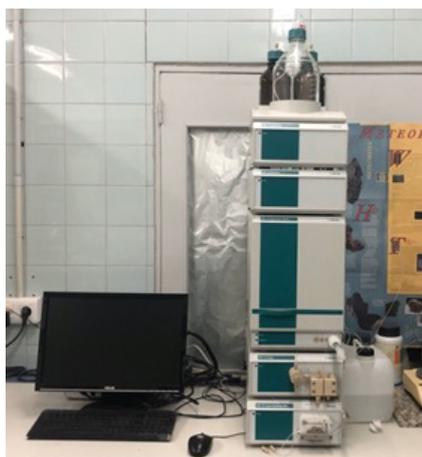


Figura 13. Cromatógrafo iónico para la determinación del ion trazador.

Este sistema está compuesto por un módulo de bombeo para el eluyente (Metrohm 709 IC Pump), una bomba peristáltica para el bombeo de las disoluciones de lavado y regeneración del supresor (Metrohm 752 Pump Unit), el centro de separación, donde se encuentra la columna y el módulo supresor (Metrohm 733 IC Separation Center), y el detector de conductividad (Metrohm 732 IC Detector). El sistema de adquisición y procesamiento de datos que se utilizó fue el IC Metrodata 714 para Windows 95. La columna usada fue 6.1006.520 Metrosep A Supp5 (Metrohm), formada por alcohol polivinílico con grupos amonio cuaternario, de un tamaño de 150 mm x 5 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula. La fase móvil estaba compuesta por una disolución en agua ultrapura Milli-Q (Millipore) con 3.2 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃, 1 mmol L⁻¹ de NaHCO₃ y 100 mL de acetona. Se utilizó agua ultrapura Milli-Q (Millipore) y una disolución acuosa de ácido sulfúrico 20 mM como soluciones de lavado y de regeneración del supresor, respectivamente. La velocidad de flujo del equipo se fijó en 0.6 mL min⁻¹ y el volumen de inyección fue 100 μL . Las muestras previamente filtradas a través de filtros GHP acrodiscs (Waters Corporation) de 0.2 μm de tamaño de poro, se inyectaron de modo manual.

3.2.7. Análisis de los resultados obtenidos

Las curvas de disipación para los herbicidas se ajustaron a dos modelos cinéticos (cinética de primer orden (SFO) y cinética de primer orden multicompartimental (FOMC)) utilizando la herramienta Solver del software Excel de Microsoft Office 2016. Se siguieron las recomendaciones del grupo de trabajo FOCUS (FOCUS, 2016) para elegir el modelo cinético que mejor describía los resultados experimentales. Se calculó el coeficiente de determinación (r^2) y la bondad de ajuste mediante el test de chi-cuadrado (χ^2). Para validar el modelo, los valores de χ^2 calculados deben ser iguales o menores al 15% para un número determinado de grados de libertad y un nivel de significación del 5%. Se calcularon los valores de vida media (DT_{50}) para caracterizar las curvas de disipación y comparar las variaciones en las velocidades de disipación para los diferentes tratamientos.

En algunos casos, la degradación de los herbicidas puede presentar una etapa inicial en la que la concentración inicial se mantenga constante durante un periodo determinado de tiempo, seguida de una etapa marcada por un descenso en la concentración de herbicida siguiendo un modelo monofásico o bifásico. Esta etapa inicial se denomina fase *lag* o de latencia y es debida al tiempo que necesitan los microorganismos para adaptarse al medio y poder comenzar a degradar el herbicida. Cuando esta fase *lag* está presente, el tiempo de vida media real del herbicida sería la suma de la fase inicial y del valor de DT_{50} calculado en la segunda fase.

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos en la disipación y movilidad de los herbicidas en los experimentos de campo y de laboratorio. La desviación estándar (SD) fue usada como indicador de la variabilidad entre réplicas de un mismo tratamiento. La diferencia mínima significativa (LSD) a un intervalo de confianza del 95% fue determinada para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos en los tiempos de vida media de los herbicidas o en su persistencia en el perfil del suelo. En los estudios de la actividad deshidrogenasa y del perfil de ácidos grasos se utilizó el test post-hoc de Games-Howell a un valor de $p < 0.05$ para determinar diferencias significativas entre valores medios y evaluar los efectos de los diferentes tratamientos tanto a un tiempo de muestreo determinado como para todos los tiempos dentro de un mismo tratamiento. La relación entre la estructura y actividad microbianas y el porcentaje remanente de herbicida y humedad del suelo se determinó

mediante los coeficientes de correlación de Pearson. Se realizaron análisis de componentes principales (PCA) para determinar las variables más influyentes y el impacto global de los herbicidas y compost vegetal sobre las comunidades microbianas del suelo. Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el software IBM SPSS Statistics v24 (SPSS Inc. Chicago, Estados Unidos) y Past v3.15.

3.3. BIBLIOGRAFÍA

FOCUS, 2006. *Guidance document on estimating persistence and degradation kinetics from environmental fate studies in EU registration.* Report of the FOCUS Work Group on degradation kinetics. EC Document Reference Sanco/10058/2005 version 2.0.

Frostegård, Å., Bååth, E., Tunlid, A., 1993. *Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis.* Soil Biology and Biochemistry, 25, 723–730.

García-Izquierdo, C., 2003. *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana.* Mundi-Prensa, Madrid.

PPDB, 2019. *Pesticide Properties Data Base.* University of Hertfordshire. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>.

Reid, B. J., Fervor, T. R., Semple, K. T., 2002. *Induction of PAH-catabolism in mushroom compost and its use in the biodegradation of soil phenanthrene.* Environmental Pollution, 118, 65-73.

Robert, M., 1975. *Principes de détermination qualitative des minéraux argileux à l'aide des rayons X.* Annales Agronomiques, 26, 7339-7346.

Soil Survey Staff, 2010. *Keys to Soil Taxonomy, 11th ed.* USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington, DC.

Sparks, D. L., 1996. *Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical Methods.* Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI.

Tabatabai, M.A, 1994. *Soil enzymes.* En: Weaver, R.W. (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties.* Soil Science society of America, Madison, WI, 903-947.

Vance, E. D., Brookes, P.C., Jenkinson, D. S., 1997. *An extraction method for measuring soil microbial biomass C.* Soil Biology and Biochemistry, 19, 703-707.

Zelles, L., 1999. *Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review.* Biology and Fertility of Soils, 29, 11-129.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

NOTA: Tesis presentada en formato de artículos. Con el fin de respetar los derechos



CAPÍTULO 1



CAPÍTULO 1: Application of green compost as amendment in an agricultural soil: effect on the behaviour of triasulfuron and prosulfocarb under field conditions

RESUMEN

Los herbicidas son compuestos esenciales en sistemas agrícolas para mantener el rendimiento de los cultivos, ya que permiten controlar la aparición y/o crecimiento de malas hierbas que dan lugar a pérdidas en las cosechas. Por otra parte, la aplicación de residuos orgánicos al suelo como enmiendas se considera hoy día una práctica agrícola de interés ya que contribuye a aumentar el contenido en materia orgánica (MO) del suelo evitando su degradación. El empobrecimiento del suelo en MO es cada vez más evidente lo que hace necesario actuar para evitar la pérdida de fertilidad. Sin embargo, la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo puede modificar el comportamiento de los herbicidas aplicados simultáneamente, influyendo en la efectividad de estos compuestos frente a las malas hierbas o incluso, de forma no prevista, en su persistencia o movilidad en el suelo dando lugar a problemas de contaminación ambiental.

En este trabajo se ha llevado a cabo un experimento de campo para estudiar la disipación, persistencia y movilidad de dos herbicidas (triasulfuron y prosulfocarb) aplicados en un suelo franco arcillo-arenoso como formulaciones comerciales individuales, Logran[®] (triasulfuron) y Auros[®] (prosulfocarb), o conjunta, Auros Plus[®]. Se estudió en un suelo sin enmendar y enmendado con compost vegetal (GC), residuo procedente de la poda de plantas en parques y jardines. Para realizar el experimento se establecieron parcelas experimentales de 9 m² de superficie en la finca experimental Muñovela del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC). Se diseñaron, de manera aleatoria, parcelas sin enmendar y enmendadas con GC a la dosis de 120 t ha⁻¹ en peso seco, y se dividieron en parcelas sin tratar con herbicidas y tratadas con las formulaciones comerciales Logran[®], Auros[®] y Auros Plus[®] a las dosis de 4.5 kg i.a. ha⁻¹ y 100 g i.a. ha⁻¹ de prosulfocarb y triasulfuron, respectivamente. El experimento en campo tuvo una duración de 100 días.

Los resultados de disipación de los herbicidas mostraron que la aplicación de GC aumentó el tiempo de vida media (DT₅₀) del triasulfuron (46.7 días) respecto al suelo sin enmendar (19.4 días) cuando se aplicó como formulación individual. Este incremento fue debido a una mayor adsorción del herbicida por el suelo enmendado (con mayor contenido en MO) y no se observó cuando el triasulfuron se aplicó como una formulación

conjunta con prosulfocarb. Los coeficientes de adsorción (K_d) del triasulfuron por el suelo cuando se aplicó como formulación individual o conjunta indicaron un efecto competitivo por los lugares de adsorción. Estos coeficientes podrían explicar el aumento en su persistencia en suelos sin enmendar (aumento de K_d) y la disminución de su persistencia en el suelo enmendado (disminución de K_d) cuando se aplicó la formulación conjunta en comparación con la formulación individual. El herbicida prosulfocarb presentó una velocidad de disipación mayor que triasulfuron en todas las condiciones estudiadas. Los valores de DT_{50} variaron entre 13.9 y 18.5 días en suelos sin enmendar y enmendados aplicado como formulación individual o conjunta. A pesar del aumento de adsorción de prosulfocarb por el suelo enmendado, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes condiciones estudiadas probablemente debido a que la disipación de prosulfocarb, más hidrofóbico que triasulfuron, estaría controlada por una adsorción irreversible por el suelo independientemente del tratamiento.

El estudio de la movilidad de los herbicidas a diferentes profundidades en el perfil del suelo (0-50 cm) puso de manifiesto la lixiviación de ambos herbicidas a capas más profundas del suelo en todos los tratamientos, aunque la mayor cantidad de residuos se detectaron siempre en el tramo 0-10 cm. Se observó la presencia de concentraciones relevantes de triasulfuron en el tramo 10-20 cm en todos los tratamientos estudiados, y de pequeñas concentraciones de prosulfocarb en el suelo modificado con GC. La aplicación de la enmienda orgánica aumentó la persistencia de ambos herbicidas provocando un descenso de la lixiviación de triasulfuron cuando se aplicó como una formulación individual, pero no cuando se aplicó como una formulación conjunta con prosulfocarb, movilizándose en ese caso hasta una profundidad de 40-50 cm. La lixiviación del prosulfocarb no se vio inhibida por el GC detectándose el compuesto a lo largo de todo el perfil del suelo a 100 días después de su aplicación tanto en el suelo sin enmendar como enmendado. La movilidad del prosulfocarb no se vio afectada por el tipo de formulación aplicada a pesar de que los coeficientes de partición K_d cuando se aplicó bajo la formulación conjunta con triasulfuron en el suelo enmendado (21.6 g mL^{-1}) y en el suelo sin enmendar (30.7 g mL^{-1}) disminuyeron en comparación a los valores observados para la aplicación individual (24.1 y 37.2 g mL^{-1} , respectivamente). La movilidad de ambos herbicidas en todo el perfil del suelo podría haber estado influenciada por el carbono orgánico disuelto (COD) derivado del GC. Los resultados mostraron además la estrecha

relación entre el contenido de agua en el perfil del suelo y la lixiviación del triasulfuron, pero no la del prosulfocarb.

Estos resultados resaltan el interés de obtener datos de campo para poder optimizar la aplicación conjunta de GC y herbicidas, y así prevenir la disminución de su efectividad contra las malas hierbas y el riesgo de contaminación de las aguas.



CAPÍTULO 2



CAPÍTULO 2: Simultaneous application of two herbicides and green compost in a field experiment: Implications on soil microbial community

RESUMEN

La aplicación simultánea de herbicidas y enmiendas orgánicas es una práctica agrícola común que puede modificar el comportamiento de los herbicidas y afectar a la comunidad microbiana en los suelos. Hay poca información sobre los cambios en la comunidad microbiana del suelo como consecuencia de esta práctica agrícola en condiciones reales de campo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de dos herbicidas (triasulfuron y prosulfocarb) sobre la abundancia, actividad y estructura de la comunidad microbiana del suelo. Se llevó a cabo un experimento de campo aplicando dichos herbicidas en un suelo franco arcillo-arenoso en forma de formulaciones comerciales individuales, Logran[®] (triasulfuron) y Auros[®] (prosulfocarb), o conjunta, Auros Plus[®] (triasulfuron+prosulfocarb). Se establecieron parcelas experimentales de 9 m² en la finca experimental Muñovela del IRNASA-CSIC en un suelo sin enmendar y enmendado con un compost vegetal (GC) (120 t ha⁻¹ ~ 11.6 t C ha⁻¹) procedente de la poda de árboles y plantas en parques y jardines. Se establecieron parcelas sin tratamiento de herbicidas y parcelas tratadas con las formulaciones comerciales Logran[®], Auros[®] y Auros Plus[®] a las dosis de 4.5 kg i.a. ha⁻¹ y 100 g i.a. ha⁻¹ de prosulfocarb y triasulfuron, respectivamente. Se estudió la biomasa microbiana, la respiración, la actividad deshidrogenasa (DHA) y el perfil de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) del suelo a diferentes tiempos durante el periodo de disipación de los herbicidas (100 días).

La aplicación del GC produjo un aumento en la biomasa de los suelos enmendados con respecto al suelo sin enmendar desde el principio del experimento. La aplicación de las formulaciones individuales de herbicidas no produjo diferencias significativas en los valores de biomasa de los suelos sin enmendar después de 30 días de tratamiento, aunque después de 100 días, aumentaron para todas las formulaciones de herbicidas. Sin embargo, los valores de biomasa disminuyeron en los suelos enmendados con la aplicación individual o combinada de triasulfuron en comparación con el control. Este efecto tóxico del herbicida triasulfuron sobre la biomasa microbiana fue temporal, ya que ésta se recuperó con la disipación del compuesto.

También la aplicación de GC aumentó los valores de respiración del suelo enmendado con respecto al suelo no enmendado pero en los suelos sin enmienda disminuyó en presencia de triasulfuron aplicado de manera individual o conjunta con prosulfocarb. Sin embargo, la aplicación individual de prosulfocarb no produjo una disminución significativa de la respiración. La enmienda GC inicialmente amortiguó el efecto del triasulfuron aplicado de manera individual, pero esta capacidad amortiguadora no resultó efectiva cuando se aplicó la formulación conjunta de los herbicidas.

La DHA del suelo no se vio afectada por la aplicación de GC o herbicidas después de 30 días desde su aplicación. Los valores de DHA disminuyeron con el tiempo en los suelos sin enmendar y tratados con los herbicidas de manera individual o conjunta, pero esta disminución no fue observada en los suelos enmendados. En presencia del herbicida triasulfuron aplicado de manera individual o conjunta los valores de DHA fueron constantes durante el periodo de estudio. Sin embargo, en el suelo tratado con prosulfocarb de manera individual la DHA aumentó de manera significativa después de 100 días.

La estructura microbiana cambió de manera clara durante la duración del experimento bajo las diferentes condiciones estudiadas. Después de 100 días desde la aplicación simultánea del triasulfuron y prosulfocarb hubo un aumento significativo de la población de bacterias Gram positivas y un descenso significativo en la población de bacterias Gram negativas y *Actinobacterias* en los suelos sin enmendar. El GC aplicado al suelo como enmienda mitigó el efecto de los herbicidas y sólo la abundancia relativa de *Actinobacterias* aumentó a los 100 días.

Según los resultados obtenidos, las comunidades microbianas en el suelo sin enmendar y enmendado con GC se comportaron de manera diferente con la aplicación de los herbicidas; además, la aplicación combinada de los compuestos alteró la actividad microbiana y su estructura en comparación con su aplicación individual o no aplicación. El uso del GC disminuyó el impacto del triasulfuron y del prosulfocarb en la biomasa y la actividad microbiana, y redujo las variaciones en la estructura microbiana del suelo.



CAPÍTULO 3



Resumen

CAPÍTULO 3: Recycling organic residues in soils as amendments: Effect on the mobility of two herbicides under different management practices

RESUMEN

La aplicación de residuos orgánicos en suelos para aumentar su contenido en materia orgánica (MO) es una buena opción para asegurar la producción sostenible de cultivos. La MO tiene una influencia directa en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de los suelos y, por lo tanto, en su fertilidad y en el desarrollo de las plantas por lo que su aumento en suelos sensibles a la degradación y a la erosión presenta un gran interés. Sin embargo, es necesario evaluar diferentes factores para optimizar el reciclaje de residuos orgánicos en suelos agrícolas, ya que pueden alterar el comportamiento de herbicidas cuando se aplican de manera conjunta en suelos agrícolas.

En este trabajo se ha estudiado la influencia de la dosis de enmienda aplicada en el suelo ($\sim 12 \text{ t C ha}^{-1}$ y 40 t C ha^{-1}), diferentes condiciones de riego (sin riego y con riego adicional de 2.8 mm por semana), y aplicación repetida de herbicidas en la movilidad y persistencia de triasulfuron y prosulfocarb. Los herbicidas se aplicaron como una formulación comercial conjunta, Auros Plus[®], en un suelo sin enmendar (S) y enmendado con compost vegetal (GC1 y GC2) en un experimento de campo. El diseño del experimento consistió en 24 parcelas de $3 \text{ m} \times 3 \text{ m}$ y las dosis de los herbicidas aplicados fueron $11.25 \text{ kg i.a. ha}^{-1}$ de prosulfocarb y $250 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ de triasulfuron (2.5 veces la dosis agronómica en ambos casos). La misma dosis se aplicó de nuevo cuando se alcanzó aproximadamente el 50% de su disipación (68 días).

Inicialmente, de acuerdo con las concentraciones residuales medidas en el perfil del suelo después de la primera aplicación de los compuestos, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y condiciones de irrigación en la movilidad del triasulfuron. El efecto del riego fue evidente un mes después de añadir los herbicidas y el efecto del tratamiento del suelo fue significativo dos meses después porque la persistencia de triasulfuron en S+GC2, con mayor dosis de enmienda, fue mantenida hasta el 50% de la cantidad aplicada. A este tiempo, las mayores cantidades residuales de triasulfuron observadas a lo largo del perfil del suelo se encontraron en los suelos enmendados a los que se añadió riego adicional.

En el caso del prosulfocarb, la influencia del GC fue significativa en su persistencia inicial en S+GC2, siendo mayor que en S+GC1 y S. Su presencia pudo

observarse en el perfil del suelo 13 días después de su aplicación, especialmente en S y S+GC1 al mismo tiempo que se registró una disipación cercana al 50% en S y S+GC1, y sólo de un 10% en S+GC2. Un mes después de su aplicación, el porcentaje de disipación aumentó en los suelos sin enmendar y enmendados, y dos meses después el porcentaje de prosulfocarb detectado fue <3% en los suelos enmendados y no se detectó en los suelos sin enmendar.

Un mes después de la segunda aplicación de los herbicidas, se observó un aumento de la disipación del triasulfuron con respecto a la primera aplicación. El aumento de la disipación puede ser debido a una degradación acelerada por parte de los microorganismos ya adaptados permitiendo un metabolismo más rápido del herbicida. Además, el incremento de temperatura media registrado (~10°C) tras la segunda aplicación podría también haber acelerado el proceso de disipación. La movilidad del herbicida aumentó de igual manera después de la segunda aplicación. Se observaron concentraciones residuales del herbicida en el perfil del suelo S+GC2 debido a su adsorción por el suelo. La persistencia del triasulfuron (en superficie) se mantuvo cinco meses después de su aplicación repetida en suelos enmendados, aunque disminuyó con respecto a la observada tras la primera aplicación.

De manera similar al triasulfuron, la disipación del prosulfocarb después de la segunda aplicación fue más rápida que después de la primera y esto estuvo también relacionado con la adaptación previa de los microorganismos después de la primera aplicación y con las temperaturas más altas registradas durante el segundo periodo que favorecieron además una mayor volatilización del herbicida. Las cantidades registradas en el perfil del suelo indicaron la presencia del herbicida en todos los suelos alcanzando una profundidad de 40-50 cm, especialmente en el caso del suelo sin enmendar a pesar de la baja cantidad de agua recibida durante la segunda aplicación. Las concentraciones residuales remanentes en la superficie del suelo indican que la disipación disminuyó con el tiempo, pero no se alcanzó la desaparición total del compuesto en ningún suelo tras la segunda aplicación.

Los resultados indicaron que la aplicación de diferentes dosis de GC al suelo ofrece la posibilidad de lograr un balance entre las concentraciones residuales y el efecto sobre el suelo agrícola.



CAPÍTULO 4



Resumen

CAPÍTULO 4: Influence of different agricultural management practices on soil microbial community over dissipation time of two herbicides

RESUMEN

En la actualidad se generan residuos orgánicos de diferente origen en grandes cantidades que son aplicados como enmiendas al suelo para mejorar su fertilidad. Sin embargo, la aplicación combinada de herbicidas y residuos orgánicos puede modificar el comportamiento fisicoquímico de los herbicidas en el suelo, lo cual puede tener un gran impacto en la diversidad y actividad de las comunidades microbianas del suelo.

En este trabajo se ha estudiado la influencia de diferentes prácticas agrícolas sobre la cinética de disipación de los herbicidas triasulfuron y prosulfocarb aplicados como una formulación comercial conjunta, Auros Plus[®], en un suelo sin enmendar y enmendado con compost vegetal (GC) en condiciones de campo, así como los cambios que producen en la estructura de las comunidades microbianas durante el tiempo de disipación de los herbicidas.

Se estudiaron diferentes factores tales como la dosis de enmienda aplicada (~ 12 t C ha⁻¹, GC1 y 40 t C ha⁻¹, GC2), las condiciones de riego (sin riego y con riego adicional de 2.8 mm por semana) y el efecto de la aplicación repetida de los herbicidas. La dosis de herbicidas aplicada fue de 250 g i.a. ha⁻¹ y 11.25 kg i.a. ha⁻¹ para el triasulfuron y el prosulfocarb, respectivamente (2.5 veces la dosis recomendada) y la misma dosis se aplicó de nuevo cuando se alcanzó aproximadamente el 50% de disipación (68 días).

La velocidad de disipación del trisulfuron fue más lenta que la del prosulfocarb en el suelo y aumentó después de la segunda aplicación. Los valores de vida media (DT₅₀) fueron entre 1.3 y 3 veces menores que en la primera aplicación, mientras que los valores de DT₅₀ para prosulfocarb no se modificaron después de la segunda aplicación. Los valores de DT₅₀ de ambos herbicidas fueron más elevados en el suelo con el mayor porcentaje de GC debido a un aporte de carbono orgánico más elevado. La aplicación de riego adicional disminuyó los valores de DT₅₀ de prosulfocarb pero no los de triasulfuron a pesar de su mayor solubilidad en agua.

La población microbiana total se comportó de manera similar con respecto a la presencia de los herbicidas en los suelos con y sin riego. Hubo un descenso de dicha población con la disipación de los herbicidas. La aplicación de los herbicidas no tuvo ningún efecto significativo en la población relativa de bacterias Gram negativas y Gram

positivas durante el experimento, pero la abundancia relativa de *Actinobacterias* aumentó en todos los suelos tratados. Al final del experimento (215 días), el efecto negativo de los herbicidas sobre la población de hongos fue significativo ($p < 0.05$) en todos los tratamientos. Estos cambios microbiológicos fueron detectados en suelos con y sin riego adicional, y fueron más evidentes después de la segunda aplicación de los herbicidas. Los cambios microbiológicos de los suelos durante la segunda aplicación pueden ser los responsables del cambio en la velocidad de disipación de los herbicidas, que fue más rápida cuando la población de *Actinobacterias* se vio favorecida.

Este estudio contribuye de forma útil a la evaluación del efecto de la aplicación repetida de herbicidas a largo plazo bajo diferentes prácticas agrícolas de manejo del suelo y sus comunidades microbianas.



CAPÍTULO 5



Resumen

CAPÍTULO 5: Assessment of ^{14}C -pro sulfocarb dissipation mechanism in soil after amendment and its impact on the microbial community

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos de disipación y el balance de masa de pro sulfocarb en un suelo sin enmendar y enmendado con compost vegetal (GC) en condiciones de laboratorio con el fin de ampliar la información obtenida sobre la disipación de pro sulfocarb en los ensayos de campo previamente estudiados. El uso de enmiendas orgánicas en suelos para mejorar su contenido en carbono orgánico (CO) es una práctica usada de manera global en la agricultura moderna. Sin embargo, este aporte de CO al suelo introducido por la aplicación de las enmiendas puede modificar el comportamiento fisicoquímico y la biodisponibilidad de los herbicidas en esos suelos. Estos cambios en su biodisponibilidad junto a la presencia de nuevos microorganismos procedentes de las enmiendas pueden afectar a la disipación del herbicida.

En este trabajo, el herbicida pro sulfocarb sin marcar y marcado en ^{14}C ($\sim 100 \text{ Bq g}^{-1}$) se aplicó en dos concentraciones (4 y 10 mg kg^{-1}) en un suelo sin enmendar y enmendado con GC a una dosis de 180 t ha^{-1} (20% en peso seco). Se determinó la disipación y el balance de masa de ^{14}C -pro sulfocarb aplicado a partir de las extracciones secuenciales con solución acuosa (0.01M CaCl_2) y solución orgánica (metanol) (fracciones extraíbles) y la determinación de las fracciones mineralizada y remanente o no extraíble de ^{14}C -pro sulfocarb por combustión. Además, se evaluó la actividad deshidrogenasa (DHA) y el perfil de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) del suelo para conocer el efecto de los residuos del herbicida sobre la actividad y estructura de las comunidades microbianas durante el periodo de disipación del mismo.

La cinética de degradación del pro sulfocarb no marcado registró una fase *lag* inicial de 9 días en el suelo enmendado y sin enmendar cuando se aplicó a la dosis alta, y una fase *lag* de 14 días en el suelo enmendado cuando se aplicó a la dosis baja. A esta fase *lag* le siguió una degradación más rápida que se ajustó a un modelo cinético de primer orden (SFO). La velocidad de disipación de pro sulfocarb disminuyó en el suelo enmendado debido a una mayor adsorción del herbicida. Los valores de vida media (DT_{50}) fueron más elevados en el suelo enmendado (16.2-21.6 días) que en el suelo sin enmendar (8.0-13.9 días) y estos valores aumentaron al aumentar la concentración de pro sulfocarb en el suelo sin enmendar, pero disminuyeron en los suelos enmendados.

También se ha observado un aumento o disminución de los valores de DT_{50} para otros compuestos con un aumento de la concentración aplicada, siendo este comportamiento explicado por las diferentes fases *lag* implicadas en el proceso de disipación. La disipación de prosulfocarb fue mucho más lenta en el suelo esterilizado indicando que la degradación microbiana es relevante en este proceso.

El balance de masa total fue $> 80\%$ cuando la disipación del herbicida marcado fue próxima al 50% en el suelo enmendado y sin enmendar, y disminuyó hasta un 60%-70% al final del experimento. Esta disminución puede atribuirse a procesos paralelos que contribuyen a la disipación de compuesto como la volatilización. Estos resultados se corresponden con los elevados porcentajes resultantes de la suma de las fracciones extraíbles en agua y en metanol obtenidos en el periodo transcurrido hasta alcanzar el 50% de disipación del herbicida. A partir de este periodo la fracción mineralizada del ^{14}C -prosulfocarb aumentó en el rango 11%-31% así como la fracción residual o no extraíble del compuesto (hasta un 35%-44%) en suelos sin enmendar y enmendados con GC. Los resultados pusieron de manifiesto una mayor biodisponibilidad de prosulfocarb en el suelo sin enmendar que en el enmendado de acuerdo con la fracción extraíble más elevada en agua. Por otra parte, la disminución en las cantidades extraíbles de herbicida desde el suelo sin enmendar y enmendado con el tiempo fue consecuencia del envejecimiento del herbicida en el suelo, aumentando la fracción residual del compuesto fuertemente enlazado en el suelo. Estos residuos podrían ser inmovilizados mediante interacciones fisicoquímicas entre el compuesto y los componentes del suelo, especialmente el CO al aumentar el periodo de incubación.

La DHA del suelo disminuyó en los suelos sin enmendar y se mantuvo en los suelos enmendados hasta el final del ensayo. La estructura microbiana apenas fue alterada durante el proceso de degradación del prosulfocarb. Al final del ensayo, el herbicida no tuvo ningún efecto significativo en la abundancia relativa de bacterias Gram negativas y Gram positivas y hongos independientemente de la enmienda o la dosis de herbicida. Sólo en el caso del suelo sin enmendar tratado con la dosis más alta de herbicida (10 mg kg^{-1}) se observó un descenso de la población relativa de *Actinobacterias*. En el suelo enmendado este efecto fue amortiguado por el GC.



CAPÍTULO 6



Resumen

CAPÍTULO 6: Transport of ^{14}C -prosulfocarb through soil columns under different amendment, irrigation and incubation regimes

RESUMEN

La aplicación de enmiendas orgánicas al suelo es una práctica común en agricultura para aumentar el contenido de nutrientes y de materia orgánica (MO). Esta práctica puede impedir la posible contaminación de agua por pesticidas debido a la modificación de su biodisponibilidad o de su retención por el suelo. Los estudios previos sobre la disipación y movilidad del prosulfocarb en un suelo con dos enmiendas de compost vegetal (GC) diferentes y diferentes regímenes de riego en condiciones de campo indicaron un aumento de la persistencia del herbicida en el suelo enmendado y la influencia del contenido de agua del suelo y de carbono orgánico disuelto (COD) en la movilidad de prosulfocarb a través del perfil del suelo. Con el fin de ampliar nuestro conocimiento sobre la influencia de estos factores en la movilidad de prosulfocarb en el suelo cuando se aplica simultáneamente con el GC, se llevó a cabo este estudio para evaluar el efecto de diferentes flujos de agua en la movilidad del herbicida prosulfocarb sometido a diferentes estados de envejecimiento en el suelo.

En el experimento de laboratorio se utilizaron columnas empaquetadas con suelo sin enmendar y enmendado con GC (20% en peso seco). El herbicida se añadió marcado en ^{14}C con una concentración de 10 mg kg^{-1} (2.5 veces la dosis agronómica) y una actividad de 10 kBq mL^{-1} . Se evaluó el lavado del herbicida después de añadir un volumen de agua (0.1M de CaCl_2) de 500 mL de forma continua con una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} (flujo saturado) o de forma discontinua (20 mL diarios durante 25 días) (flujo saturado-no saturado). El lavado de las columnas comenzó un día después de añadir el herbicida a la superficie de éstas o después de un periodo de envejecimiento del herbicida en el suelo de 28 días en oscuridad a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Se determinaron las fracciones lixiviada, mineralizada y retenida en cada columna. El ion cloruro (KCl) se utilizó como ion trazador y la movilidad de este ion se estudió aplicando los mismos flujos de lavado que en las columnas tratadas con herbicida.

La cantidad total de prosulfocarb lixiviada en las columnas de suelo sin enmendar fue del 13.0% y 26.7% de la cantidad añadida inicialmente para el flujo saturado y saturado-no saturado, respectivamente. Estos valores fueron similares bajo flujo saturado (12.2%) y ligeramente mayores bajo flujo saturado-no saturado (32.5%) en el suelo

enmendado. Cuando el herbicida fue incubado en las columnas, las cantidades lixiviadas disminuyeron 2.1 y 1.9 veces en el suelo sin enmendar, y 2.9 y 1.6 veces en el suelo enmendado bajo flujo saturado y saturado-no saturado, respectivamente. Las pérdidas del herbicida durante el proceso de envejecimiento o procesos de adsorción del herbicida dependientes del tiempo podrían explicar estos resultados.

Por otra parte, las mayores cantidades de prosulfocarb retenidas en las columnas de suelo enmendado (77.4%-85.2%) que en las columnas de suelo sin enmendar (57.1%-60.8%) bajo flujo saturado pusieron de manifiesto una fuerte interacción entre el herbicida y el suelo enmendado. Este comportamiento no se observó bajo flujo saturado-no saturado, donde las cantidades retenidas fueron similares a las determinadas en suelos sin enmendar. Una cinética de lavado más lenta de prosulfocarb podría tener lugar en ambos suelos bajo flujo saturado-no saturado favoreciendo posiblemente la formación de productos de degradación con capacidad de lixiviación más elevada. La distribución del herbicida en las columnas indicó la mayor retención en el primer tramo en todas las condiciones estudiadas.

Las cantidades de herbicida mineralizado fueron bajas en columnas no incubadas ($\leq 0.40\%$) para los suelos enmendados y sin enmendar bajo flujo saturado. Sin embargo, estas cantidades mineralizadas aumentaron hasta 19 veces bajo flujo saturado en las columnas incubadas en comparación con las columnas no incubadas. En las columnas bajo flujo saturado-no saturado las cantidades lixiviadas no se vieron afectadas por la incubación del herbicida.

Los balances totales de ^{14}C fueron $> 73\%$ y $> 80\%$ en las columnas de suelo sin enmendar y enmendado con GC, respectivamente. La posible pérdida de herbicida por volatilización se observó en columnas de suelo sin enmendar tras su incubación, y en menor extensión en columnas de suelo enmendado.

Los resultados obtenidos demostraron la importancia de diversos factores (la enmienda orgánica, el flujo de agua y el envejecimiento de los herbicidas) en el control de la lixiviación del herbicida prosulfocarb a través del perfil del suelo y completan la información obtenida de los estudios de campo realizados anteriormente.

A photograph of a lush green field, possibly a meadow or a field of wildflowers, with a bright sun flare on the horizon. The sun is low in the sky, creating a strong lens flare effect that illuminates the scene. The background shows a line of trees under a clear sky.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Estudios bajo condiciones de campo

1. La aplicación de compost vegetal disminuyó la disipación del herbicida triasulfuron en el suelo enmendado respecto al suelo sin enmendar cuando se aplicó como formulación individual, aunque este efecto no se observó en la formulación conjunta. La disipación de prosulfocarb fue más rápida que la de triasulfuron, y no se encontraron diferencias significativas con las diferentes formulaciones aplicadas. La disipación de prosulfocarb, más hidrofóbico que triasulfuron, estuvo posiblemente controlada por una adsorción irreversible por el suelo independientemente del tratamiento.

2. El estudio de movilidad de triasulfuron a través del perfil del suelo inicialmente indicó la retención del herbicida en el tramo superficial del suelo, aunque también se determinaron concentraciones relevantes en el tramo 10-20 cm en todas las condiciones ensayadas. En presencia del compost vegetal, se detectó un descenso de la lixiviación de triasulfuron cuando se aplicó como formulación individual, pero no cuando se hizo bajo formulación combinada con prosulfocarb movilizándose en ese caso hasta una profundidad de 50 cm. Se constató una estrecha relación entre el contenido de agua en el perfil del suelo y la lixiviación de triasulfuron.

3. Para prosulfocarb, la mayor retención también se detectó siempre en el tramo superficial mientras que pequeñas concentraciones del herbicida se determinaron en el tramo 10-20 cm en el suelo enmendado con compost vegetal. No se observó el efecto de la formulación individual o combinada en la movilidad de prosulfocarb. Tampoco se constató influencia del contenido de agua en el perfil del suelo en la lixiviación. La movilidad de este herbicida hidrofóbico detectada hasta 50 cm en el perfil del suelo podría estar influenciada por el carbono orgánico disuelto derivado del compost vegetal.

4. La aplicación de los herbicidas triasulfuron y prosulfocarb modificó la actividad y estructura microbiana del suelo, especialmente en los suelos sin enmendar. Individualmente, triasulfuron registró un mayor impacto en la biomasa microbiana y respiración del suelo que prosulfocarb. La aplicación combinada de ambos herbicidas en el suelo sin enmendar produjo un cambio en su estructura microbiana mientras que el compost vegetal amortiguó el impacto de los herbicidas aplicados conjuntamente en la biomasa y actividad, y redujo los cambios en la estructura microbiana. Sin embargo, a

pesar del efecto amortiguador del compost, la aplicación combinada de los herbicidas tuvo mayor impacto en la biomasa y actividad microbiana del suelo que la aplicación individual de los mismos.

5. El aumento de la dosis de compost vegetal aplicado en el suelo dio lugar a una disipación más lenta de los herbicidas y a un aumento de la persistencia de ambos compuestos. Este comportamiento fue consecuencia de la mayor adsorción de estos compuestos por los suelos debido a su mayor contenido en carbono orgánico.

6. La aplicación de riego adicional incrementó la movilidad de ambos herbicidas, viéndose además potenciada por el incremento del carbono orgánico disuelto, especialmente para prosulfocarb. Sin embargo, la mayor capacidad de retención de agua del suelo enmendado con la dosis mayor de compost vegetal podría reducir la movilidad de los herbicidas.

7. La aplicación repetida de los herbicidas produjo un aumento de su velocidad de disipación especialmente para el triasulfuron, aunque en el caso del prosulfocarb las cantidades residuales persistieron durante más tiempo tras la segunda aplicación. Una degradación acelerada de los herbicidas por parte de los microorganismos ya adaptados podría ocurrir, permitiendo un metabolismo más rápido de los mismos. Además, el incremento de temperatura registrado ($\sim 10^{\circ}\text{C}$) durante la segunda aplicación podría haber acelerado el proceso de disipación de los herbicidas y/o una mayor volatilización en el caso del prosulfocarb.

8. La aplicación repetida de los herbicidas produjo cambios en la estructura microbiana de los suelos sin enmendar y enmendados. Se encontró una correlación positiva entre las cantidades de residuos de herbicidas y la población microbiana total, indicando una disminución de esta población durante la disipación de herbicidas y una cierta toxicidad de los herbicidas para la comunidad microbiana. Los herbicidas aumentaron la población relativa de *Actinobacterias* y redujeron la población relativa de hongos en comparación con la situación inicial en todas las condiciones estudiadas. La población de *Actinobacterias* parece ser responsable del incremento de la degradación de triasulfuron después de la segunda aplicación.

Estudios bajo condiciones de laboratorio

9. Los estudios de disipación, movilidad y efecto en las comunidades microbianas del prosulfocarb llevados a cabo en condiciones de laboratorio apoyaron los resultados obtenidos en condiciones de campo. La disipación y biodisponibilidad del herbicida fueron, al igual que en el experimento de campo, más elevadas en el suelo sin enmendar que en el suelo enmendado, independientemente de la concentración aplicada. Sin embargo, se observó una *fase lag* en la disipación de prosulfocarb aplicado a dos dosis en el suelo enmendado con compost vegetal que retrasó su biodegradación.

10. El estudio del mecanismo de disipación de ^{14}C -prosulfocarb indicó una disminución de las cantidades extraíbles del compuesto con el tiempo indicando un envejecimiento del herbicida en el suelo. Por otra parte, las fracciones mineralizadas y no extraíbles aumentaron lentamente con el tiempo de incubación. El balance de masa total de ^{14}C -prosulfocarb indicó la pérdida de parte del herbicida por volatilización u otros procesos no controlados en el experimento.

11. La presencia del prosulfocarb no mostró efectos negativos en la actividad deshidrogenasa, lo que indica que no presenta un impacto negativo significativo sobre la actividad microbiana. Por el contrario, el herbicida estimuló esta actividad en el suelo enmendado con el tiempo debido a la mayor cantidad de herbicida extraíble en comparación con el suelo sin enmendar. Además, éste tuvo un impacto limitado sobre la estructura microbiana, pero sí estuvo claramente influenciada por la aplicación del compost vegetal.

12. La movilidad del herbicida prosulfocarb en columnas de suelo empaquetadas indicó que el compost vegetal sólo modificó la lixiviación de prosulfocarb en el suelo bajo flujo saturado-no saturado. La enmienda orgánica sí tuvo efecto para aumentar la cantidad de herbicida retenido bajo los dos regímenes de flujo estudiados y disminuyó además su pérdida vía otros procesos como la volatilización. La cantidad de herbicida lixiviado bajo los dos tipos de flujo disminuyó en los suelos sin enmendar y enmendados cuando el compuesto fue previamente incubado. Sin embargo, la cantidad de herbicida mineralizado aumentó para el flujo saturado-no saturado, pero fue similar en el caso de flujo saturado.

13. Prosulfocarb sería un herbicida recomendable para el control de malas hierbas debido a su rápida degradación y a su baja toxicidad para la microbiología del suelo. Factores como la enmienda, el flujo de agua y el envejecimiento del herbicida, que están íntimamente relacionados con el clima y factores agronómicos, han resultado ser importantes en el control de la lixiviación de este herbicida a través del perfil del suelo.

En resumen, a partir de los resultados obtenidos se podría concluir que:

i) La movilidad de los herbicidas por debajo del horizonte superficial del suelo podría acortar la duración del control residual de las malas hierbas a las que van destinados y dar lugar a contaminaciones de las aguas subterráneas. Por otro lado, las cantidades retenidas en el perfil del suelo podrían exceder el umbral de sensibilidad registrado para cultivos susceptibles con el consiguiente daño en cosechas posteriores.

ii) Es necesario llevar a cabo estudios por un período de tiempo más largo que permitan establecer la influencia de las nuevas prácticas agrícolas basadas en la aplicación de residuos orgánicos al suelo sobre el comportamiento de los herbicidas y sobre la estructura microbiana.

iii) Es necesario evaluar las características de los residuos orgánicos previamente a su aplicación, especialmente su contenido en carbono orgánico total y soluble, así como los cambios estructurales en los agregados del suelo con el fin de mejorar su fertilidad sin aumentar el impacto ambiental cuando su aplicación coincida con la de los herbicidas.

iv) La aplicación de compost vegetal como enmienda orgánica podría ser optimizada previamente a su uso para reducir el riesgo de contaminación de aguas subterráneas por lixiviación de herbicidas y minimizar el impacto de los herbicidas sobre la microbiota del suelo.

