CONAMA2014
CONGRESO NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE

Efectos de los filtros vegetales instalados en zonas agrícolas para la lucha contra la eutrofización de las aguas superficiales: estudio de la evolución de las características del suelo y de las aguas de escorrentía en el marco del proyecto LIFE + EUTROMED

eutromed
Prevención de la eutrofización por nitrógeno agrícola

Autor: Chiara Pesciaroli

Institución: Universidad de Granada

Otros autores: Pedro Herrero Alonso (Paisajes del Sur); Antonio Viedma Rodríguez (Paisajes del Sur); Beatriz Fernandez García (Bonterra Ibérica); Valentín Contreras Medrano (Bonterra Ibérica); Caridad Ruiz Valero (Asistencia técnica a la supervisión del proyecto LIFE + EUTROMED); Jesús Gonzalez Martínez (Diputación Provincial de Granada); Francisco Javier García Martínez (Diputación Provincial de Granada); Jesús González López (Universidad de Granada); Francisco Osorio Robles (Universidad de Granada)

Resumen

La eutrofización de las aguas superficiales, debido a la acumulación de nitratos, representa un problema medio-ambiental de enorme importancia. Una de las principales causas de este tipo de contaminación es la aplicación excesiva o inadecuada de fertilizantes nitrogenados minerales u orgánicos. El objetivo principal del presente trabajo ha sido estudiar el efecto que la utilización de filtros vegetales (sistemas buffers) ejerce sobre la reducción de la perdida de nitratos de origen agrario en olivar, como consecuencia de los procesos de escorrentía. Para ello se diseñaron un conjunto de parcelas experimentales en terrenos de elevada pendiente (término municipal de Deifontes, Granada). En las mismas, se llevaron a cabo mediciones de diversos parámetros físicos-químicos (nitratos, nitritos, fosfatos, etc.). Los resultados obtenidos permitieron observar en las parcelas objeto de estudio una reducción de los contaminantes orgánicos superior al 50% con respecto a las parcelas control. También se realizó una caracterización del suelo y se determinó la capacidad de desnitrificación presente en el mismo. Las características físico-químicas de los suelos procedentes de cárcavas tratadas mostraron un elevado índice de semejanza con los suelos control, lo cual descarta la posibilidad de que la intervención modifique de forma significativa las características agronómicas del suelo. Con respeto a la actividad desnitrificante, se alcanzaron altos niveles de esta actividad biológica en todos los suelos analizados, probablemente debido a un elevado uso de fertilizantes químicos nitrogenados. Los resultados obtenidos parecen sugerir que un elevado contenido de nitratos en el suelo produce un incremento de la actividad desnitrificante, originándose un efecto de pérdida de nitrógeno del hábitat que en ningún caso será utilizado por las plantas, así como un incremento significativo en gases de efecto invernadero (N2O). Conjuntamente se realizaron estudios de la microbiota presente en los suelos tratados y controles mediante técnica de tag-pirosecuenciación. Los resultatdos de abundancia relativa a nivel de clase revelaron la presencia, como clase dominante, de Actinobacteria, unos microorganismos altamente representados en suelos agricolas donde desarrollan importantes procesos de biodegradacion de macromoléculas. Además, el estudio a nivel de género reveló que, en todas las muestras, eran presentes los géneros principales responsables de la desnitrificación en el suelo. En general, se pudo observar que la abundancia relativa de los géneros presentes en el microbioma no se ve afectada por la presencia de los sistemas instalados. Además del seguimiento de los parámetros físico-químicos y biológicos, el proyecto se cumplimenta con medidas preventivas (aplicación de buenas prácticas agrícolas, formación y asesoramiento) y correctoras (instalación de filtros vegetales). Este trabajo se ha desarrollado dentro del Proyecto LIFE+ EUTROMED en colaboración con la Diputación de Granada y las empresas Bonterra Ibérica S.L.y Paisajes del Sur S.L.

Palabras clave: eutrofización; contaminantes nitrtogenados; sistemas buffers; desnitrificación.

Introducción

La eutrofización es un proceso de contaminación debido principalmente a un exceso de nutrientes, sobre todo nitratos (Carpenter et al. 1998), en las aguas superficiales y representa un problema ambiental y sanitario creciente en todo el mundo. Como consecuencia de la contaminación, en las aguas se producen problemas graves como pérdida de calidad, sedimentación, degradación para usos recreativos y disminución de la salud de los ecosistemas acuáticos. Las causas a las que básicamente se debe la acumulación de nitratos son principalmente las inadecuadas prácticas agrícolas y ganaderas. En concreto, si nos referimos al ámbito agrícola, el origen de este tipo de contaminación es la aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados minerales u orgánicos. La naturaleza difusa de este tipo de contaminación hace que sea un problema difícil de solucionar.

La calidad de las aguas a nivel europeo es objeto de atención preferente por parte de las autoridades ambientales de la Unión Europea. La Directiva Marco de Aguas y la Directiva de Nitratos canalizan este interés a través de estrategias de prevención y control de la contaminación, dirigidas a garantizar el buen estado químico de estas aguas. En particular la Directiva de Nitratos tiene como objetivos generales reducir la contaminación causada o provocada por los nitratos de origen agrario y por ello obliga a los Estados miembros a declarar las zonas vulnerables a la contaminación por nitratos de origen agrario. En Andalucía, el Decreto 36/2008 designa las Zonas vulnerables definiéndolas como aquellas superficies cuyas escorrentías o filtraciones con aportaciones de nitratos de origen orgánico pueden afectar a las aguas continentales.

En la provincia de Granada, la cuenca del Río Cubillas vierte a la unidad de la Vega de Granada, la cual está designada como “Zona vulnerable a la contaminación por nitratos de origen agrario”. Las áreas de esta cuenca se caracterizan por clima mediterráneo continental, suelos pobres, topografía accidentada y presencia de olivar como cultivo predominante. La combinación de varios factores como lluvias torrenciales, suelo poco consolidado, pendientes considerables, actividad agraria y baja cubierta vegetal acelera los procesos erosivos en el suelo. En suelos como estos, que presentan un contenido reducido de materia orgánica y cubierta vegetal casi ausente, es facilitado el arrastre de la capa superficial por las aguas de escorrentía con consiguiente formación de surcos y cárcavas. Además se produce el arrastre de nitratos en las aguas de escorrentía procedentes de la aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados causando contaminación de aguas superficiales y también de las aguas subterráneas ya que una gran parte de éstas se infiltran en el suelo alcanzando los acuíferos subterráneos, arrastrando contaminantes como los nitratos

En este contexto, la Diputación de Granada, el Instituto del Agua de la Universidad de Granada y dos empresas granadinas, Paisajes del Sur S.L. y Bonterra Ibérica S.L., están llevando a cabo un proyecto en el marco del Programa LIFE+. Este proyecto se titula EUTROMED: Técnica demostrativa de prevención de la eutrofización provocada por nitrógeno agrícola en las aguas superficiales en clima mediterráneo.

El propósito de este proyecto es demostrar, a través de una experiencia piloto, la eficacia de una tecnología para reducir la concentración de nitratos en el flujo superficial de agua en tierras agrícolas con clima mediterráneo.

Después de haber establecido la existencia de un problema potencial de contaminación por nitratos, una pequeña área de la cuenca del Río Cubillas ha sido seleccionada para el desarrollo del presente proyecto. Se trata de un área perteneciente al municipio de Deifontes, Granada, la cual presenta graves problemas de erosión así como de contaminación por nitratos de las aguas superficiales.

Dentro del área seleccionada se han introducido medidas estructurales que actúen principalmente a nivel correctivo, reteniendo muchos de los nitratos trasportados por las aguas de escorrentía procedentes de las actividades agrícolas, evitando así que alcancen las aguas superficiales. Estas estructuras consisten en sistemas de barreras de vegetación (en inglés riparian buffers) que actúan de filtro, reteniendo un alto porcentaje de los sólidos arrastrados, minimizando también los procesos erosivos. Según Yuan et al. (2009), en los últimos años ha ido creciendo la importancia de este tipo de estructuras como zona de amortiguación entre las áreas agrícolas y las masas de agua. En otras experiencias, en las que se utilizaron biorrolllos, se alcanzó la eliminación del 50% de los nutrientes del agua de escorrentía (Blanco-Canqui et al 2006).

Por otro lado, también se han desarrollado una serie de medidas que actúen a nivel preventivo, como la adopción de una serie de buenas prácticas agrarias en relación con el uso de fertilizantes nitrogenados, el fomento del desarrollo de la cubierta vegetal y la aplicación de las recomendaciones derivadas de una herramienta informática sobre fertirrigación. También el proyecto cuenta con un servicio de asesoramiento in situ a los agricultores implicados en el proyecto. Además se han ido realizando toda una serie de manuales prácticos que han sido repartidos entre los agricultores y se han llevado a cabo varias acciones formativas adaptadas a sus necesidades.

1. Materiales y métodos

1.1 Zona de actuación

El área de actuación del proyecto LIFE+ EUTROMED se encuentra en la comarca de Los Montes Orientales, en la provincia de Granada (Andalucía, España) (Figura 1), concretamente en el término municipal de Deifontes.

Esta zona tiene una altitud media sobre el nivel del mar de 735 metros y se encuentra en la Cuenca Hidrográfica del Guadalquivir, subcuenca Cubillas-Colomera. En cuanto a las características climáticas, se encuadra dentro del tipo climático conocido como “mediterráneo continental de inviernos fríos” según clasificación ofrecida por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. En este territorio el aislamiento impuesto por los relieves circundantes y la altitud, determinan la aparición de un clima muy extremo, con veranos calurosos (en torno a los 24°C- 25°C) y, sobre todo, inviernos muy fríos, con temperaturas medias que se sitúan por debajo de los 6°C-7°C, y en los que las heladas son un acontecimiento frecuente. A ello hay que añadir unas precipitaciones bajas, del orden de 400-500 mm y con una distribución a lo largo del año más regular que la que caracteriza al resto de la región. Aquí las precipitaciones primaverales ocupan un papel muy destacado y la sequía estival no es absoluta, registrándose algunas lluvias incluso en los meses de julio y agosto. Durante el invierno no son desconocidas la precipitación en forma de nieve. El promedio anual es de aproximadamente 524 mm. El terreno está compuesto principalmente por arcillas, limos y conglomerados del cuaternario.

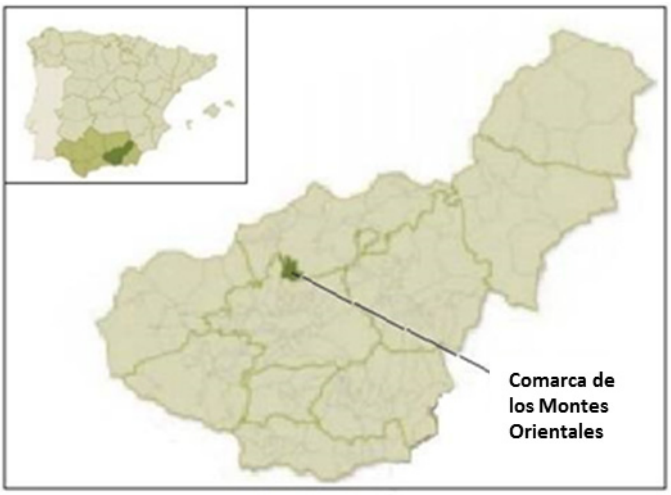

Figura 1. Zona de actuación del proyecto.

El cultivo predominante en la zona es el olivar, y las pendientes máximas de las tierras son del orden del 25%. En estas zonas de cultivo, que presentan una topografía accidentada, el arrastre de la capa superficial del suelo se ve facilitado por las aguas de escorrentía y como consecuencia se produce la formación de surcos y cárcavas. Este fenómeno se puede apreciar incluso en arroyos como el de Juncarón, el cual ha alcanzado una profundidad considerable debido al arrastre del terreno (Figura 2).

La zona de actuación abarca una superficie total de 276 hectáreas (Figura 3), de las cuales alrededor de 5 ha (equivalentes a unos 13.146 metros lineales de cárcavas) situadas a ambas vertientes del arroyo Juncarón (arroyo del río Cubillas), han sido objeto específico de actuación.

Para la introducción de los sistemas de filtros vegetales se seleccionaron parcelas agrícolas próximas y homogéneas en cuanto a pendiente, cultivo, prácticas agrarias, estado de la cubierta vegetal y erosión del suelo.

Figura 2. Arroyo Juncarón, Deifontes.

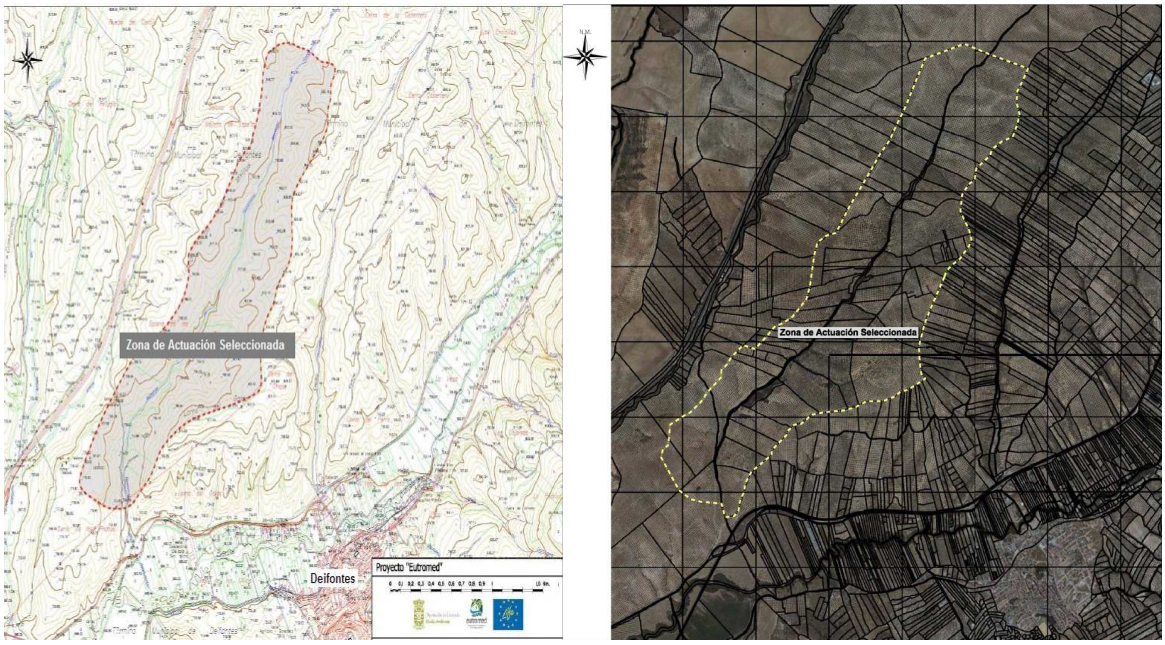

Figura 3. Plano y foto aérea de la zona de actuación seleccionada.

1.2 Medidas correctoras

La tecnología utilizada se basa en la introducción de sistemas prefabricados a base de fibras vegetales (esparto y paja), llamados biorrollos (Figura 4). Estas estructuras rompen las líneas de escorrentía del agua en la ladera y actúan de filtro, reteniendo, en un alto porcentaje, los nitratos del agua que los atraviesa, así como buena parte de los sólidos arrastrados, minimizando así los procesos erosivos y la pérdida de suelo fértil. Constituyen, además, el soporte y el refuerzo necesario para la vegetación en ámbitos semiáridos como es el área objeto de estudio. Los filtros vegetales fijan entre sus intersticios las partículas de suelo y las semillas o plantas, las cuales utilizan estas estructuras como soporte y substrato a la vez. Además, se entrecosen y se anclan a la tierra, formando todo ello una sistema estable y ecológico, que finalmente termina incorporándose al suelo.

Por lo tanto, el sistema es capaz de eliminar nitratos de las aguas de escorrentía por tres mecanismos. Una primera vía de eliminación de nitrógeno, relacionada con el freno de la erosión, es a través de los sedimentos que quedan retenidos en los filtros vegetales, donde se han podido fijar previamente estos compuestos. Además, el crecimiento de vegetación nitrófila sobre estos sistemas (tanto de forma natural como mediante el cultivo) lo cual aumenta la capacidad de asimilación de nitratos. Asimismo, el desarrollo de bacterias desnitrificantes, asociadas a las raíces de las plantas, favorece el proceso de desnitrificación (reducción de los nitratos a nitrógeno gas).

Figura 4. Ejemplo de biorrollos instalados en unas de las parcelas objeto de estudio.

Las cárcavas de la zona designada a la implantación de las medidas correctivas se trataron con distintos modelos de biorrollos, en función de la pendiente del terreno y de la profundidad de la cárcava. Las características de los tres modelos implantados se describen en la figura 5.

Para acelerar el desarrollo de vegetación en estos sistemas y mejorar así su capacidad de retención, se llevó a cabo el cultivo de plantas autóctonas que cumplían las siguientes características: plantas nitrófilas, con buena capacidad para fijar los restos de fertilizantes y buena capacidad para desarrollarse en las condiciones requeridas, que sean de desarrollo rápido y con buena capacidad de propagación, pero no tanto como para convertirse en una posible plaga para el olivar, que tengan abundantes raíces secundarias que puedan actuar como filtro y fijar sólidos pero que no tengan una potencia de raíz tal que se puedan convertir en competencia para los cultivos y que sean disponibles en vivero. En concreto se usaron las siguientes plantas: *Rosmarinum officinalis, Santolina chamaecyparisus y Thymus zyggis*.

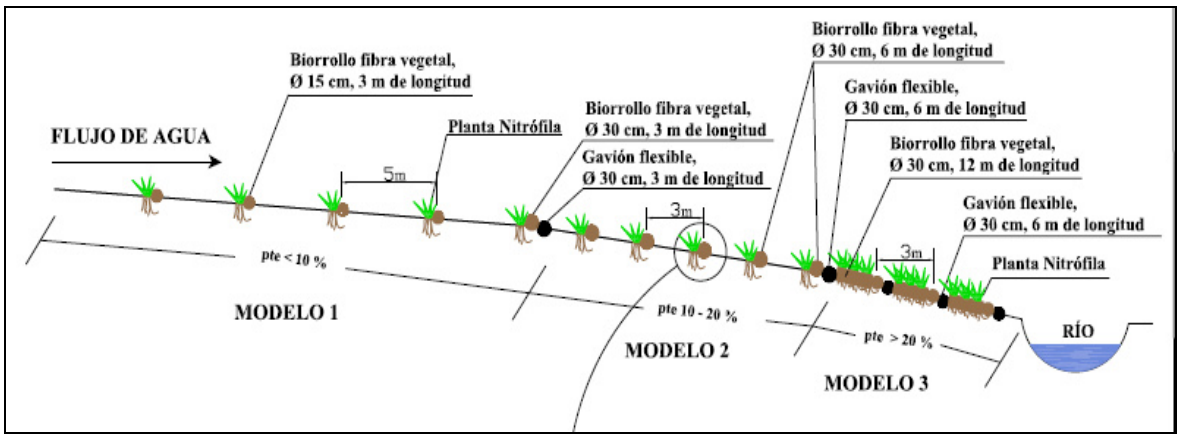

Figura 5. Esquema de los modelos utilizados en las parcelas en función de la pendiente y la profundidad de la cárcava.

1.3 Puntos de muestreo

Para la selección de los puntos de muestreo se realizó un inventario de 57 cárcavas en ambas vertientes del arroyo Juncarón (Figura 6 a)). Finalmente, se seleccionaron 3 parcelas, las 51, 42B y 17, respectivamente al principio, a mitad y al final de la zona de actuación (Figura 6 b)). En cada parcela se señalaron 2 puntos de muestreo: 1 punto en cárcavas tratadas con biorrollos y 1 punto en cárcavas no tratadas, como control. Los dos tipos de cárcavas seleccionadas se muestran en la figura 7 a) y b). Las cárcavas tratadas de las parcelas 51, 42B y 17 tenían las características mostradas en Tabla 1.

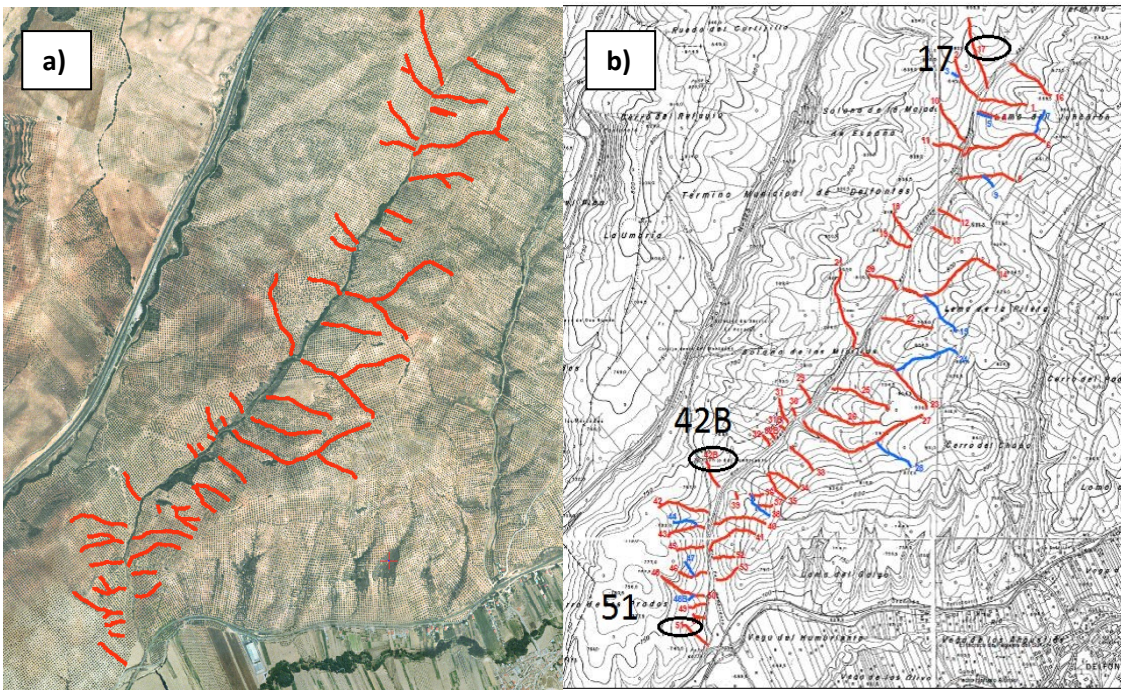

Figura 6. a) Cárcavas inventariadas en la zona de actuación. **b)** Parcelas seleccionadas como puntos de muestreo.

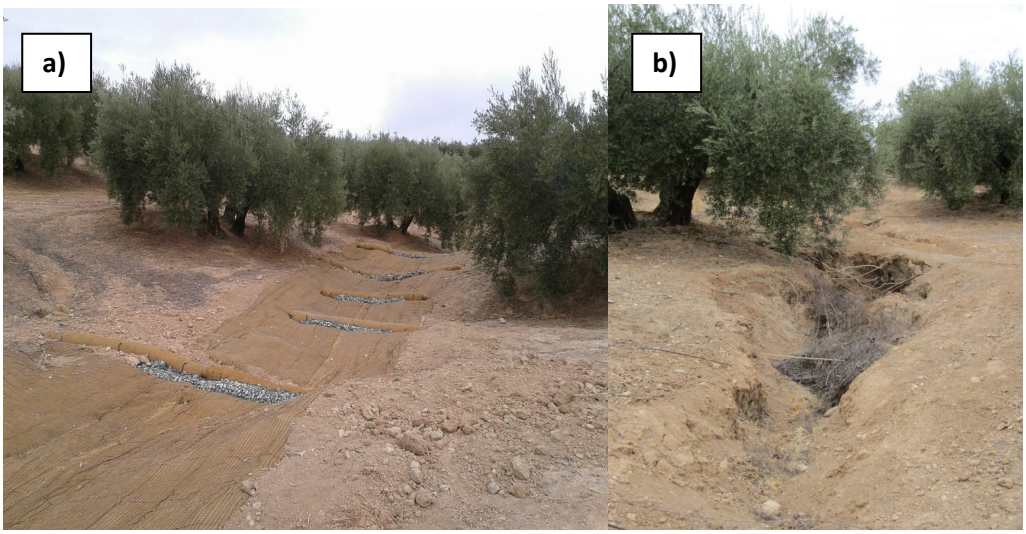

Figura 7. a) Cárcavas tratada **b)** Cárcava control

Tabla 1. Características de las cárcavas tratadas de las parcelas objeto de estudio.

Número de parcela	Posición según Arroyo Juncarón	Longitud total de cárcava (m)	Longitud total de biorrollo Modelo 1,(m)	Longitud total de biorrollo Modelo 2,(m)
42B	Al oeste	173	133	40
51	Al oeste	189	0	189
17	Al oeste	256	156	100

1.4 Recogida de muestras y análisis físico-químicas

En las parcelas designadas como puntos de muestreo, se llevó a cabo la recogida de muestras, tanto de suelo como de aguas, y se realizó el seguimiento de distintos parámetros físico-químicos y biológicos en las parcelas tratada y sin tratar (control) de la zona de instalación.

1.4.1 Muestras de agua

Para la obtención de las muestras de agua, se diseñaron unos sistemas de retención de agua de escorrentía tal y como se muestra en la Figura 8. Dichos sistemas constan de una placa metálica colocada al final de las cárcavas. En el caso de las cárcavas tratadas las mismas se posicionaron detrás de los biorrollos (Figura 9). Estas placas, a manera de dique, producen la retención de elementos sólidos y la evacuación del agua hacia unos depósitos de recogida. Las placas presentan un total de 20 orificios de 10 cm de diámetro, de los cuales uno presenta una conexión plástica con unos cubos de almacenamiento. Los otros orificios permiten la salida del exceso de agua, sin afectar a las chapas.

A través de la conexiones plásticas (tubos, Figura 10), una parte del agua de escorrentía que se vehiculiza por las cárcavas es dirigida a los contenedores plásticos donde se procede a su almacenamiento (Figura 11). Al objeto de poder recoger una fracción representativa de la escorrentía, independientemente de la cantidad de lluvia producida, se utilizaron dos contenedores conectados en serie para cada parcela. Estos sistemas de recogida se colocaban al final de cada cárcava, tanto tratada como control, de manera que el agua recogida fuese representativa del total de longitud de escorrentía y el agua haya atravesado, en el caso de las cárcavas tratadas, todos los sistemas de filtros instalados

Figura 8. Sistemas de retención de muestras de agua.

Figura 9. Placa metálica.

Figura 10. Tubo de conexión.

Figura 11. Depósito de almacenamiento.

La toma de muestras se realizó teniendo en cuenta los periodos de lluvia, por lo que los días de muestreo dependieron de que se produjeran niveles de precipitación adecuados, realizándose la toma de muestras entre 2 y 3 días después de las precipitaciones registradas.

Las muestras se recogían en envases estériles de 100 ml de capacidad. En laboratorio, se procedía a la filtración de muestras para eliminar con ello la turbidez y la posible presencia de microorganismos, factores que pueden producir modificaciones en las concentraciones de los parámetros físico-químicos a analizar. Los análisis se realizaron

justo después de la toma de muestras y se realizaron tres repeticiones por muestra para obtener unos resultados fiables.

Se procedió al análisis de los parámetros analíticos más importantes que permiten verificar la capacidad de retención de nutrientes de los sistemas ensayados.

En este contexto se incluyeron los siguientes parámetros: nitritos, nitratos, fosfatos, amonio, carbono orgánico, pH, conductividad.

Las determinaciones de los diferentes iones se llevaron a cabo con los kits Spectroquant® (Merck Millipore, Alemania) siguiendo la instrucciones del fabricante.

Para la determinación de materia orgánica presente en las muestras, se utilizó el método de Carbono Orgánico Total (TOC) mediante oxidación catalítica a alta temperatura utilizando el aparato FormarcsHT/TN Total Organic Carbon Analyzer (Skalar, Analytical B.V., Países Bajos). Por ello siguieron las recomendaciones de Costa et al. (2013), realizando pequeños ajustes volumétricos.

Las determinaciones de pH y conductividad se realizaron con un conductímetro portátil modelo PCE-PHD 1, de PCE Iberica S.L.

1.4.2 Muestras de suelo

Al igual que por las muestras de aguas, los muestreos de suelo se realizaron entre 2 y 3 días después de las precipitaciones registradas.

La recogida de muestras se efectuó por encima de las placas metálicas de los sistemas de recogida de agua. La capa superficial del suelo era eliminada con un rastrillo ya que por la insolación recibida, el suelo formaba costras. La cantidad de suelo recogida era aproximadamente de 0.5 kg de suelo por cada punto de muestreo. Las muestras se tomaban con un muestreador estéril y se depositaban en bolsas transparentes de cierre hermético. Una vez en laboratorio las muestras se tamizaban y se guardaban en nevera para la sucesiva utilización para las analíticas correspondientes.

Para las muestras se realizaron analíticas de toda una serie de parámetros que representan de forma directa la fertilidad de los suelos agrícolas sometidos a restauración en relación a los suelos controles no tratados.

En el contexto anteriormente mencionado, las diversas muestras de suelo se sometieron a los siguientes análisis: determinación de nitrógeno total, determinación de fósforo asimilable, determinación de potasio, determinación de materia orgánica oxidable, determinación de pH, clasificación del suelo, textura arena, limo y arcilla.

Las análisis de la textura de los suelos se realizó siguiendo la metodología descrita por Natural Resources Conservation Service (1999), mientras que las determinaciones de nitrógeno, fósforo y potasio se establecieron mediante las técnicas descritas por Bremmmer (1965), Olsen y Dean (1965) y Pratt (1954), respectivamente.

1.5 Estudio de la desnitrificación por parte de los microorganismos del suelo

Para la determinación experimental de la actividad desnitrificante se llevó a cabo una adaptación del método descrito por Hardy et al. (1968). Por ello se realizó la construcción

de sistemas de microcosmos edáficos. Por cada muestra de suelo, se preparaban viales de 10 ml de volumen con 3 ml de medio de cultivo para bacterias desnitrificantes con la siguiente composición: 2 g/l de sacarosa, 2 g/l de NaNO3, 0,5 g/l MgSO4(H2O)7, 1 g/l HK2PO4, 5 g/l KCl, 0,02 g/l FeSO4(H2O)2, 1.000 ml de agua destilada. A continuación, a cada vial se añadían 2 g de suelo previamente tamizado y se cerraban herméticamente. Todas las muestras se preparaban por triplicado. Después de la preparación, los viales se trataban con helio durante 5 minutos para eliminar todo el oxígeno presente. Finalmente, se introducía un 10% del volumen de acetileno, dejando posteriormente las muestras a incubar a 28°C durante 24 horas. Como control analítico se preparaba igualmente un vial inyectado sólo con N_2O para obtener un área de pico estándar para calcular la concentración del producto. Trascurridas las 24 horas, se procedía a medir en el cromatógrafo de gases la producción de N_2O como área del pico producido por este gas. Para calcular la cantidad de N_2O producida se procedió a la construcción de curvas de calibración (curvas patrón) con concentraciones molares conocidas de N_2O. Esta metodología fue reproducida en cada una de las analíticas realizadas. Los resultados obtenidos se expresaron como nanomoles por gramo de suelo por hora (nm/g/h). La cuantificación se realizó a través de un equipo de cromatografía de gases Varian 3300 (Varian, Inc., USA).

1.6 Estudio de las comunidades bacterianas presentes en los suelos

Para estudiar las comunidades bacterianas presentes en el suelo se decidió realizar un análisis mediante técnicas de tag-pirosecuenciación. Por ello, se procedió a la extracción de DNA total microbiano de cada parcela objeto de estudio. Se realizaron extracciones de DNA en razón de 3 réplicas por muestra de suelo utilizando el FastDNA® SPIN Kit for Soil usando un equipo FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals, France) según las recomendaciones del productor. Una vez extraído el DNA total, se determinó la concentración en ng/µl mediante lectura en espectrofotómetro Nanodrop ND 2000c (Thermo Scientific, USA). A continuación, se realizaron mezclas equimolares de cada muestra para garantizar la fiabilidad de los datos conseguidos. Las muestras así obtenidas, se enviaron al laboratorio Research and Testing Laboratory (Lubbock, Texas, Estados Unidos) para ser sometidas a pirosecuenciación con la plataforma en titanio de Roche 454 (Vera et al., 2008) según protocolos estándares (Engelbrektson et al., 2010).

2. Resultados y discusión

El proyecto EUTROMED preveía toda una serie de acciones de medición y seguimiento tanto de parámetros físico-químicos como de los biológicos. Estas acciones tenían como objetivo final lo de monitorear dichos parámetros para así poder evaluar la eficacia de la tecnología propuesta.

Con respecto a los análisis a realizar en las aguas, el objetivo principal era el seguimiento de los parámetros de contaminación físico-química, considerándose como meta principal alcanzar unos rendimientos medios esperados del 70% en Nitratos, 50% en Nitrógeno total y 30% en Fósforo total.

En el caso de los suelos, por un lado se midió la evolución de los parámetros agronómicos por fijación de nutrientes y materia orgánica al suelo.

Por otro lado, las muestras de suelo se analizaron también para realizar un seguimiento de la producción de gases debido al proceso de desnitrificación.

Por último, también se efectuó un seguimiento de la población microbiana en los filtros vegetales. La meta principal fue determinar composición de las comunidades microbianas presentes en las parcelas objeto de estudio. Por ello, se llevaron a cabo test de biología molecular con el objeto de medir la presencia, composición y biodiversidad de las mismas.

Con respecto a las parcelas objeto de estudio, hay que señalar que en la cárcava 17, tras unas lluvias muy intensas que se produjeron a principio del periodo de estudio, el sistema de recogida de aguas se vio afectado. Además, se descubrió que la base donde se apoyaban las tierras de esta parcela eran restos vegetales proveniente del tratamiento de los olivos que producían una falta de consistencia de esta base provocando la perdida de gran parte de los materiales instalados. Por lo tanto, se decidió quitar ese punto de muestreo, considerándose no apropiado.

Todas las analíticas se llevaron a cabo con muestras que se iban recogiendo después de cada evento de lluvia.

2.1 Muestras de agua: parámetros físico-químicos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el primer trimestre de 2014, después de 2 años de implantación de los sistemas de filtros vegetales.

Durante este periodo de tiempo, las abundantes lluvias que se produjeron llegaron a originar una escorrentía superficial muy importante. Por lo tanto fue posible recolectar aguas en tres diferentes ocasiones: el 23 de Enero, 17 de Febrero y 11 de Marzo

Los resultados que se muestras en las tablas 3, 4 y 5 son media de 5 muestreos independientes y tres replicas analíticas por muestra.

Tabla 3. Resultados de analíticas de parámetros físicos-químicos sobre muestras de aguas recogidas en las parcelas (con cárcavas tratadas y control) del área de actuación de EUTROMED con fecha 23 de Enero de 2014.

Parcela	Nitritos (mg/l)	Nitratos (mg/l)	Fosfatos (mg/l)	Amonio (mg/l)	Carbono orgánico (mg/l)	pH	Conductividad (µS)
51 Control	0,12	2,7	7,52	2,69	79,52	8.57	218
51 Tratada	0,85	0,87	2,33	0,14	39,61	8.30	153
42B Control	0,1	1,15	8,36	0,38	27,34	8.38	130
42B Tratada	0,09	0,4	2,65	0,26	19,53	7.60	83

Tabla 4. Resultados de analíticas de parámetros físicos-químicos sobre muestras de aguas recogidas en las parcelas (con cárcavas tratadas y control) del área de actuación de EUTROMED con fecha 17 de Febrero de 2014.

Parcela	Nitritos (mg/l)	Nitratos (mg/l)	Fosfatos (mg/l)	Amonio (mg/l)	Carbono orgánico (mg/l)	pH	Conductividad (µS)
51 Control	0,11	2,44	1,30	0,14	44,53	7.33	192
51 Tratada	0,08	1,38	0,38	0,37	34,62	7.21	153
42B Control	0,07	1,12	8,80	0,33	27,77	7.30	124
42B Tratada	0,5	0,89	4,55	0,10	35,50	7.40	256

Tabla 5. Resultados de analíticas de parámetros físicos-químicos sobre muestras de aguas recogidas en las parcelas (con cárcavas tratadas y control) del área de actuación de EUTROMED con fecha 11 de Marzo de 2014.

Parcela	Nitritos (mg/l)	Nitratos (mg/l)	Fosfatos (mg/l)	Amonio (mg/l)	Carbono orgánico (mg/l)	pH	Conductividad (µS)
51 Control	0,19	4,45	2,4	4,6	10,32	7.62	129
51 Tratada	0,09	1,17	1,5	0,4	19,14	7.56	340
42B Control	0,13	2,64	6,2	0,2	17,65	7.43	186
42B Tratada	0,08	1,68	2,6	0,18	12,85	7.58	195

El estudio realizado de las aguas de escorrentía en cárcavas tratadas con medidas correctoras y cárcavas control (representativas de la situación inicial), parece sugerir que la instalación de los filtros vegetales reduce la pérdida de nitratos en los suelos agrícolas como consecuencia de la acción de lavado por el agua, lo que en definitiva determina una reducción en la contaminación final del arroyo Juncarón.

Aunque los resultados presentan alguna disparidad entre las tandas de muestreo, en general los datos relativos a las parcelas tratadas resultan siempre menores con respecto a los controles. Estos resultados, son no obstante reflejo de la situación de experimentación en condiciones de “campo”, donde un control estricto de las condiciones

ambientales no es totalmente posible. Es por ello que una cierta variabilidad entre muestreos es razonable. De ahí, la necesidad de múltiples repeticiones en el tiempo.

No obstante, los valores analíticos y especialmente los encontrados en relación a la concentración de nitrato, principal nutriente objeto de estudio, parecen demonstrar la eficacia del tratamiento llegando en algunos casos a registrarse una disminución de su concentración de hasta un 70% menos en las parcelas tratadas con respecto a los controles.

Cabe señalar que esta reducción habia sido detectada ya en un estadio inicial del proyecto y se ha seguido manteniendo constante durante toda su actuación.

2.2 Muestras de suelo: parámetros agronómicos.

La analítica efectuada sobre muestras de suelos ha comprendido toda una serie de parámetros que representan la fertilidad de los suelos agrícolas sometidos a restauración en relación a los suelos controles no tratados, con el objetivo de establecer las posibles alteraciones a causa de la implantación de las medidas correctoras.

Se presentan a continuación los datos texturales y físico-químicos de las muestras de suelo tomadas durante el primer trimestre de 2014.

Los análisis incluyeron el estudio textural y la cuantificación de las concentraciones de fósforo asimilable, materia orgánica oxidable, nitrógeno total, pH y potasio asimilable. Conjuntamente con los análisis mencionados se realizó la clasificación de las parcelas para su mejor comprensión edafológica. Se tomaron cinco muestras de forma aleatoria y a su vez cada determinación analítica fue repetida 3 veces para garantizar la fiabilidad de las medidas. Los resultados se muestran en las tablas 6, 7 y 8.

Tabla 6. Caracterización de suelos recogidos en las parcelas (con cárcavas tratadas y control) del área de actuación de EUTROMED con fecha 23 de Enero de 2014.

Parcelas	Clasificación	P asimilable (ppm)	Materia orgánica oxidable (%)	N total (%)	pH	K asimilable (ppm)	Textura arcilla (%)	Textura arena (%)	Textura limo (%)
51 Control	Franco limoso	7	0,89	0,077	8.3	280	32.80	18.85	48.35
51 Tratada	Franco arcilloso limoso	6	0,53	0,049	8.4	270	32.60	16.16	47.64
42B Control	Franco limoso	5	0,57	0,055	8.4	172	18.95	11.79	69.26
42B Tratada	Franco arcilloso limoso	12	0,60	0,055	8.3	360	33.80	14.16	52.04

Tabla 7. Caracterización de suelos recogidos en las parcelas (con cárcavas tratadas y control) del área de actuación de EUTROMED con fecha 17 de Febrero de 2014.

Parcelas	Clasificación	P asimilable (ppm)	Materia orgánica oxidable (%)	N total (%)	pH	K asimilable (ppm)	Textura arcilla (%)	Textura arena (%)	Textura limo (%)
51 Control	Franco arcilloso limoso	7	0,89	0,077	8.3	280	32.80	18.85	48.35
51 Tratada	Limoso	6	0,53	0,049	8.4	270	32.60	16.16	47.64
42B Control	Franco arcilloso limoso	5	0,57	0,055	8.4	172	18.95	11.79	69.26
42B Tratada	Franco arcilloso limoso	12	0,60	0,055	8.3	360	33.80	14.16	52.04

Tabla 8. Caracterización de suelos recogidos en las parcelas (con cárcavas tratadas y control) del área de actuación de EUTROMED con fecha 11 de Marzo de 2014.

Parcelas	Clasificación	P asimilable (ppm)	Materia orgánica oxidable (%)	N total (%)	pH	K asimilable (ppm)	Textura arcilla (%)	Textura arena (%)	Textura limo (%)
51 Control	Franco arcilloso limoso	7	1.07	0.079	7.8	260	30.95	18.84	50.21
51 Tratada	Limoso	5	0.62	0.045	7.9	255	7.00	12.89	80.11
42B Control	Franco arcilloso limoso	3	0.53	0.041	7.9	210	35.95	10.80	53.25
42B Tratada	Franco arcilloso limoso	27	1.37	0.092	7.8	490	28.45	11.68	59.87

Si se analizan los resultados obtenidos, en estos últimos muestreos, como se había notado ya en veces anteriores, se puede apreciar como no hay una diferencia destacable entre los valores registrados en las parcelas tratadas con biorrollos y en las parcelas control.

Parece ser que los suelos analizados mantienen las mismas características a lo largo del tiempo sin que la presencia de los biorrollos modifique o afecte de ninguna manera la riqueza mineral y la estructura de los mismos.

También resulta evidente que en las zonas tratadas se está desarrollando una cubierta edáfica de características estables, y las ligeras modificaciones observadas en algunas cárcavas tratadas no suponen ninguna alteración negativa del hábitat. Además, los valores de riqueza mineral de los suelos tratados continúan siendo respetuosos con los valores existentes en la zona.

Por lo tanto, siempre en base a los estudios realizados hasta el momento, se puede establecer que las medidas correctoras no determinan cambios significativos en las características texturales y físico-químicas del suelo. Al contrario, parece posible afirmar que se mantienen inalteradas la estabilidad y fertilidad de los suelos.

2.3 Estudio de la desnitrificación por parte de los microorganismos del suelo.

De forma paralela a los análisis texturales y físico-químicos en las muestras de suelo, se procedió al estudio de la actividad desnitrificante mediante la técnica de inhibición de la enzima óxido nitroso reductasa. Los resultados se expresan como cantidad de N_2O producido en nanomoles por gramo de suelo y hora. De cada parcela analizada se tomaron cinco muestras (con carácter aleatorio) y de cada una de las medidas se realizaron tres determinaciones para posteriores análisis estadísticos.

Los datos obtenidos se muestran en Tabla 9.

Tabla 9. Actividad desnitrificante de la microbiota presente en los suelos de las parcelas (con cárcavas tratadas y control) del área de actuación de EUTROMED expresada como producción de N_2O (nm/g/h).

Parcela	23/01/2014 (nm/g/h)	17/02/2014 (nm/g/h)	11/03/2014 (nm/g/h)
51 Testigo	565,4	1061,5	1576,5
51 Tratada	621,6	509,47	672,1
42B Testigo	541,4	536,3	680,7
42B Tratada	359,7	380,6	746,4

Según los resultados alcanzados en esta tanda de muestreo, realizada en un estado avanzado del proyecto, parece ser que en los suelos analizados, tanto en las parcelas tratadas como en los controles, existe una elevada actividad biológica que produce una alta capacidad de desnitrificación, la cual ya se había observado en muestreos anteriores. Esto puede sugerir que los suelos tratados no modifican de forma significativa esta actividad biológica.

Este resultado, comparado con los resultados de las analíticas de otros parámetros físico-químicos, podría indicar que, muy probablemente, los biorrollos actúan más reteniendo los nutrientes contaminantes del agua, que por modificaciones de la actividad biológica en los suelos tratados.

En el caso específico de los nitratos, se puede afirmar que los mismos pueden ser eficientemente biotransformados por las comunidades microbianas presentes en el suelo. Es por tanto evidente que a un mayor contenido de nitratos en el suelo se producirá un incremento de la actividad desnitrificante, originándose un efecto de perdida de nitrógeno del hábitat que en ningún caso será utilizado por las plantas. Además, considerando que aproximadamente el 50% de los microorganismos desnitrificantes no culminan el proceso con la generación de nitrógeno molecular sino que generan óxido nitroso (gas con alto efecto invernadero), resulta evidente que la adecuación de un sistema de fertilización con concentración de nitrógeno apropiada a las necesidades de la planta es de máxima importancia.

No obstante, parece ser que la utilización de los sistemas filtrantes, estaría ayudando el proceso de asimilación de los nitratos por parte de las plantas evitando su pérdida mediante desnitrificación. En ese sentido, la actuación determinaría no solo una menor pérdida de nitrógeno por escorrentía sino al mismo tiempo una menor perdida de este nutriente por procesos de desnitrificacion.

La confirmación de este hecho, cabe señalar que, con respecto a datos obtenidos precedentemente, en las parcelas tratadas se detecta una menor actividad desnitrificante en relación a los controles. Esto resulta de especial interés ya que determinaría una menor perdida de nitrato en los suelos tratados (incrementando la fertilidad) y una menor emisión de óxido nitroso, contaminante atmosférico gaseoso con claro efecto invernadero.

En conclusión estos resultados se deben de considerar de un gran interés agronómico y ambiental.

2.4 Estudio de las comunidades bacterianas presentes en los suelos

Para estudiar las comunidades bacterianas presentes en el suelo se utilizaron técnicas de biología molecular de última generación que permiten el análisis metagenómico de un hábitat. Estas técnicas constan esencialmente de extracción de DNA de las muestras de suelo y análisis mediante técnicas de tag-pirosecuenciación. La pirosecuenciación es una tecnología de determinación de secuencia de ADN a gran escala, es decir un método de secuenciación masiva del DNA que permite obtener análisis de comunidades complejas.

Al igual que para los resultados presentados anteriormente, a continuación se muestran los resultados obtenidos de muestras recogidas en el primer trimestre de 2014.

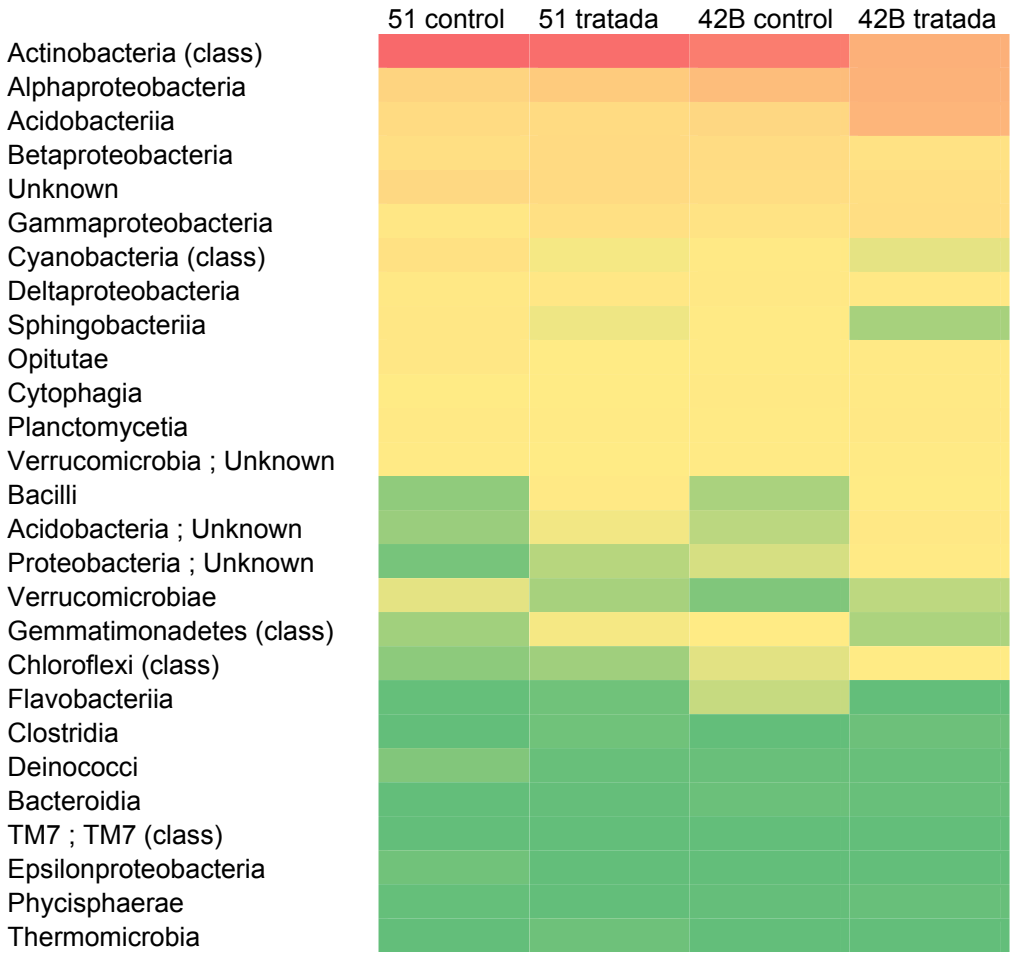

Figura 12. Análisis de la biodiversidad de Clases presentes en el microbioma mediante Heat-map. Las celdas degradan del rojo al verde al bajar el porcentaje de clases presentes en cada muestra.

Los resultados analizados aquí presentados nos sugieren que en las muestras estudiadas se observa una grande complejidad y biodiversidad (Figura 12).

Dado que la comunidad bacteriana, presente en las muestras analizadas, resultaba bastante compleja, se ha decidido representar en este estudio las clases presente con un porcentaje superior al 1%. Las demás clases se han unido en el grupo definido “Minor”.

Los porcentajes de clases presentes en cada muestra se pueden apreciar en la figura 13: en este grafico se muestra un promedio de los porcentajes registrados en cada muestra recogida en el primer trimestre de 2014.

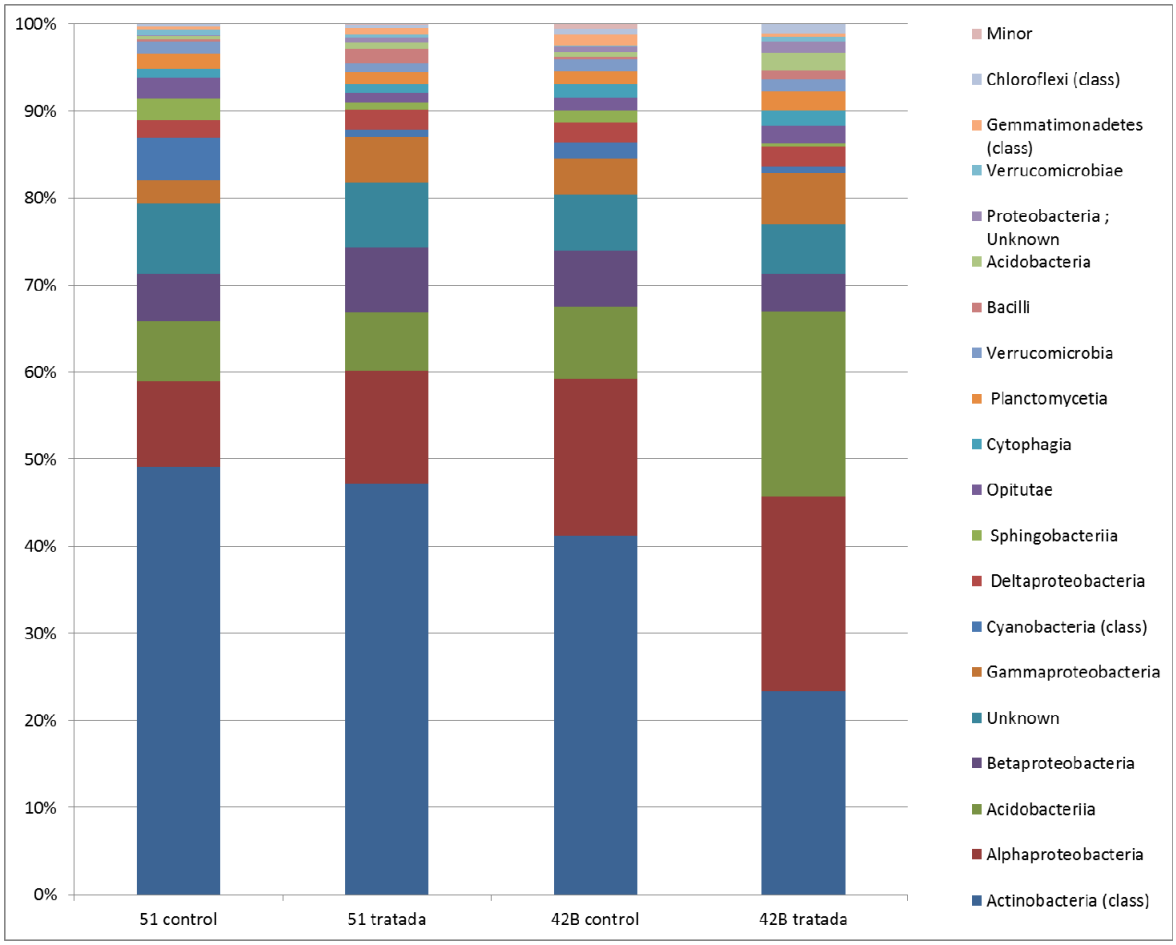

Figura 13. Análisis de la biodiversidad de Clases presentes en el microbioma de los suelos agrícolas estudiados. Porcentaje de cada clase encontrado en cada muestra.

Los microbiomas de las parcelas control y tratadas presentan una alta diversidad bacteriana en la que destacan de forma cuantitativa la presencia de Actinobacterias, Proteobacterias y Acidobacterias. Estas características son típicas de suelos agrícolas fértiles y en consecuencia estos resultados son esperables en nuestro caso. Estas clases bacterianas predominantes, especialmente las Actinobacterias, constituyen el grupo más frecuentemente encontrado en suelos agrícolas donde realizan una importante actividad de biodegradación y biotransformación de macromoléculas. En el mismo sentido el resto de los microorganismos detectados constituyen un amplio abanico de diversidad que determina una funcionalidad biológica de los suelos aparentemente muy satisfactoria. En el caso concreto de las Proteobacterias, la clase más abundante ha resultado ser la de las Alphaproteobacterias. Este resultado ha sido también detectado por otros autores y demuestra la funcionalidad de este amplio grupo de bacterias de elevada capacidad de biotransformación de moléculas hidrosolubles. Esta clase de microrganismos son típicos de ambiente marino (Bazylinski et al., 2012) aunque se pueden encontrar también en suelos, debido a que muchos de ellos son fijadores de nitrógeno y por ello capaces de crecer en simbiosis con plantas. En concreto, muchas especies de *Rhizobium* viven en nódulos de las raíces de leguminosas, donde realizan la fijación de nitrógeno (Andam & Parker, 2007).

Un análisis comparado de la biodiversidad en los suelos de parcelas tratadas y control, nos sugieren que los microbiomas son semejantes en todas las condiciones analizadas (Figuras 14, 15, 16 y 17). Estos resultados son de especial importancia ya que demuestran que la intervención en las cárcavas no determina cambios en la estabilidad de las comunidades microbianas del suelo. En consecuencia los microbiomas no sufren ninguna alteración tras la intervención en los suelos agrícolas con los sistemas "buffers", garantizándose a priori que el establecimiento de estos sistemas no altera el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos que aportan la fertilidad de un suelo.

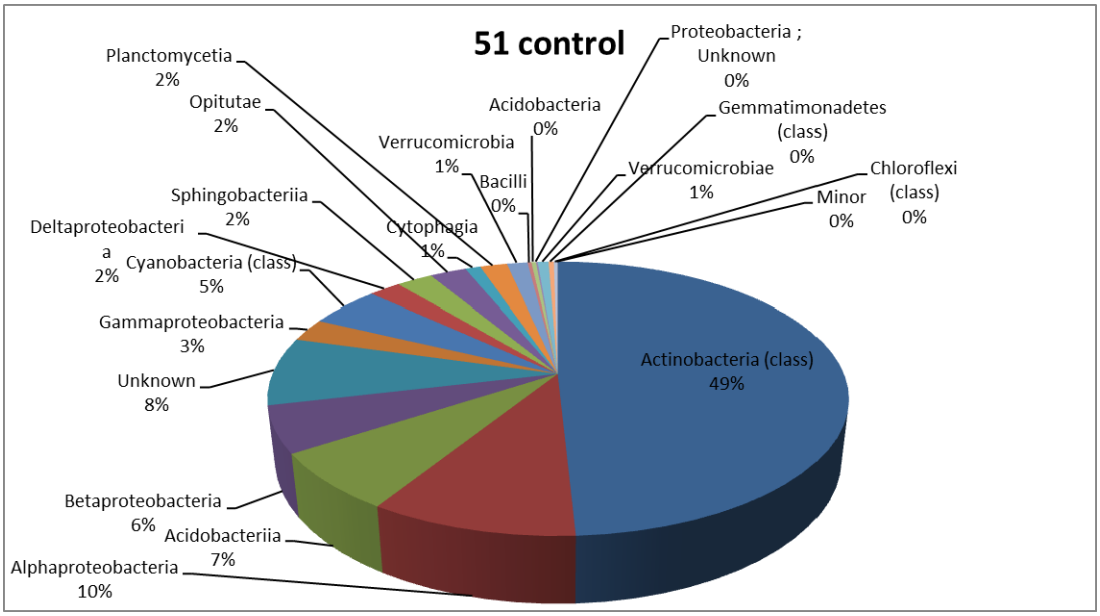

Figura 14. Porcentaje de clases de bacteria en la parcela 51 control.

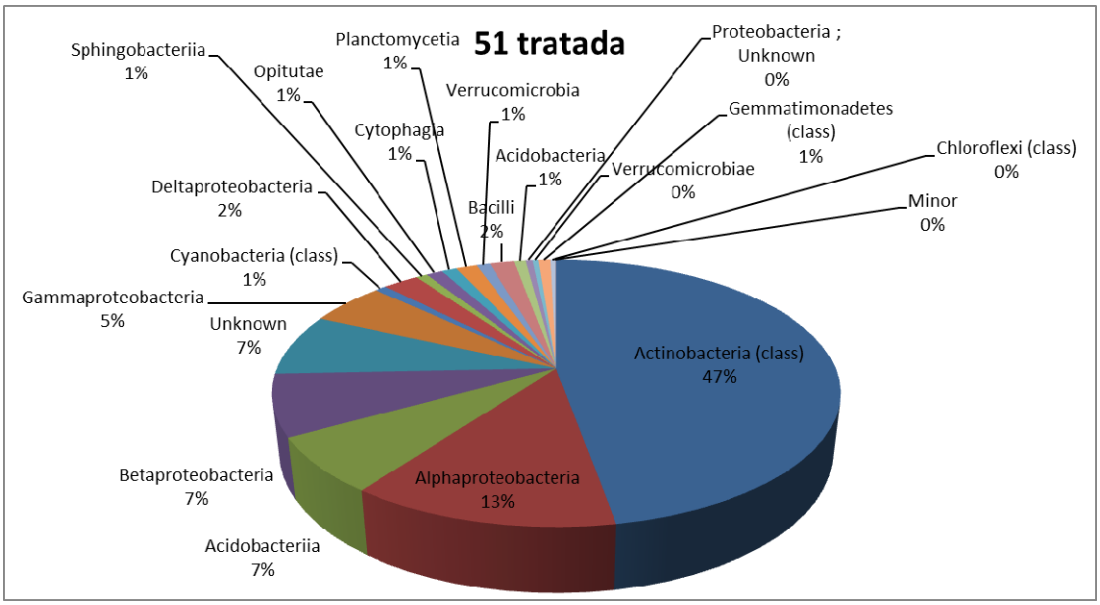

Figura 15. Porcentaje de clases de bacteria en la parcela 51 tratada.

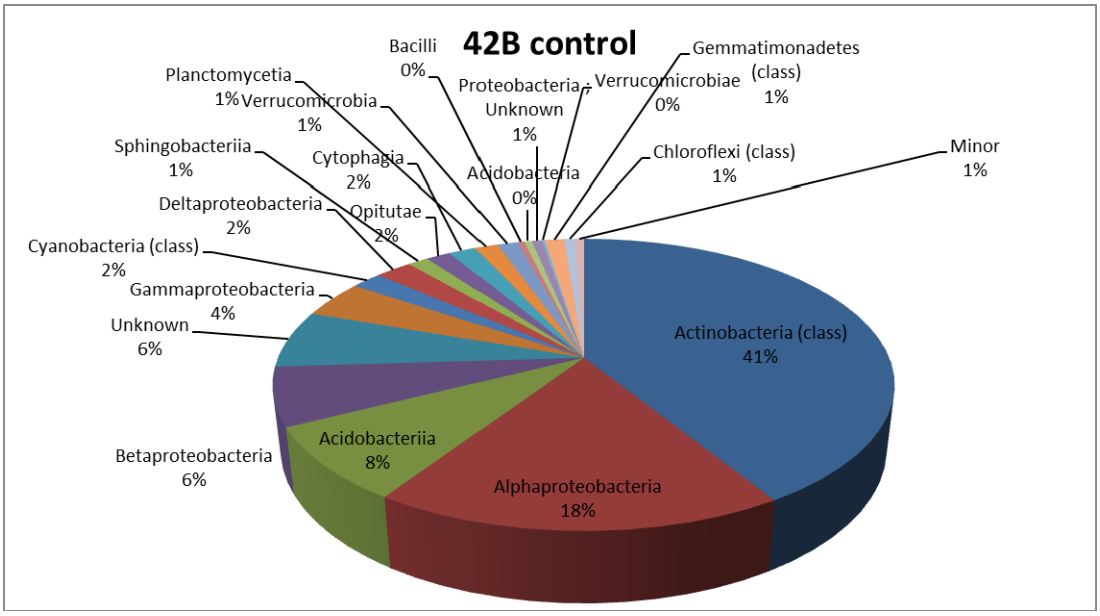

Figura 16. Porcentaje de clases de bacteria en la parcela 42B control.

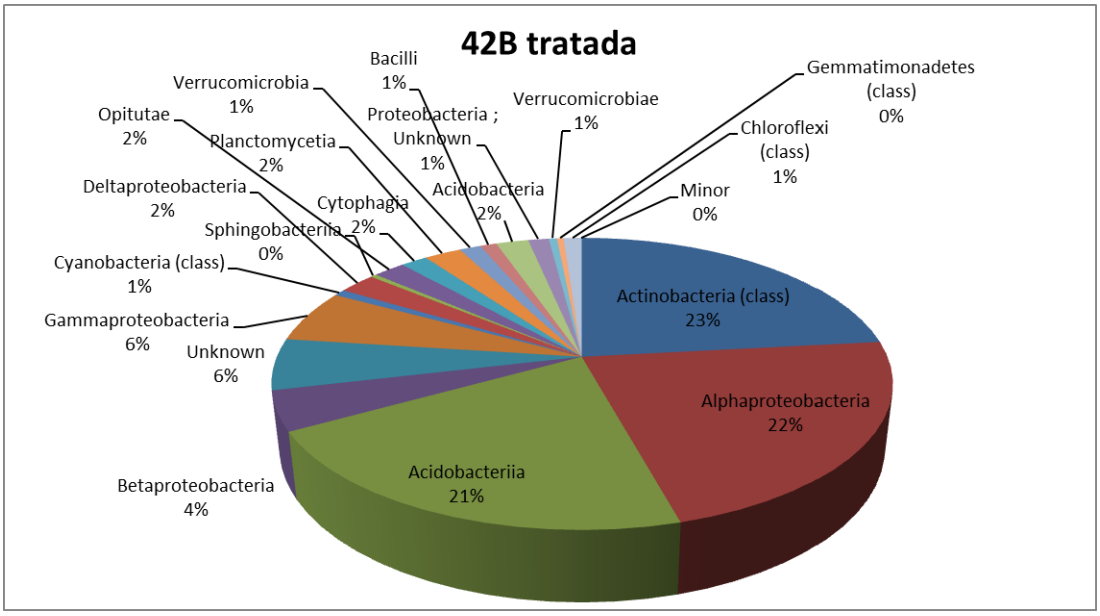

Figura 17. Porcentaje de clases de bacteria en la parcela 42B tratada.

El análisis llevado a cabo a nivel de clase también se realizó a nivel de género.

A continuación se presentan los datos porcentuales de los géneros principales detectados en cada una de las parcelas objeto de estudio. En general, considerando los géneros más abundante presentes en las muestras, se puede observar que, aunque se hayan presentado ligeras diferencias en algún porcentaje con respecto a una muestra u otra, la abundancia relativa de los géneros presentes en el microbioma parece no verse afectada por la presencia de los sistemas instalados (Figuras 18-21). De hecho, los microorganismos detectados muestran una distribución muy parecida en todas las

muestras y en las diferentes tandas de muestreos. Este resultado parece confirmar lo que ya se ha detectado a nivel de clase. De hecho corrobora la hipótesis que la intervención en las cárcavas no determina cambios en la estabilidad de las comunidades microbianas del suelo. Además, este tipo de microbioma representa la típica comunidad bacteriana que se suele encontrar en los suelos agrícolas de la zona estudiada.

Es llamativa la presencia, en todas las muestras, de los que se consideran como géneros principales responsables de la desnitrificación en el suelo cuales son por ejemplo Pseudomonas, Alcaligenes, Paracoccus, Thiobacillus, Rhizobium, Bradyrhizobium. Estos resultados confirman los importantes niveles de desnitrificacion que han sido observados en estos suelos y además sugieren que un exceso de fertilizantes nitrogenados incrementara dicha actividad biológica, con una pérdida neta de nitrógeno en forma de N_2 y N_2O.

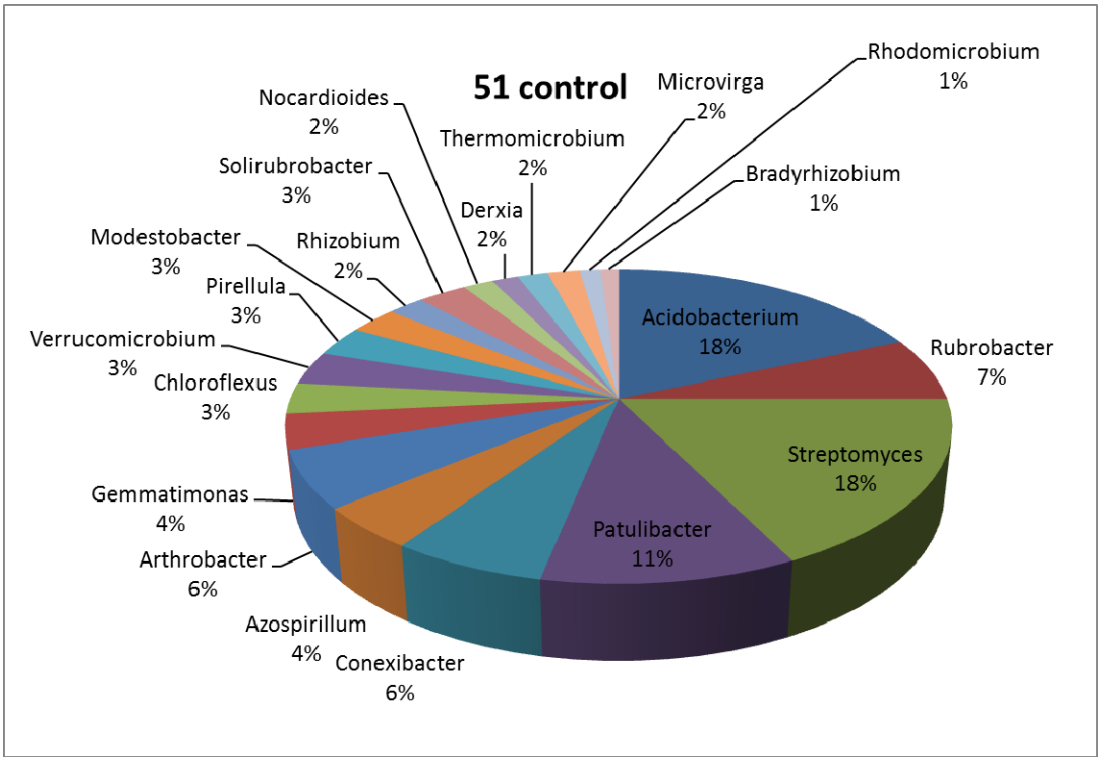

Figura 18. Porcentaje de géneros de bacteria en la parcela 51 control.

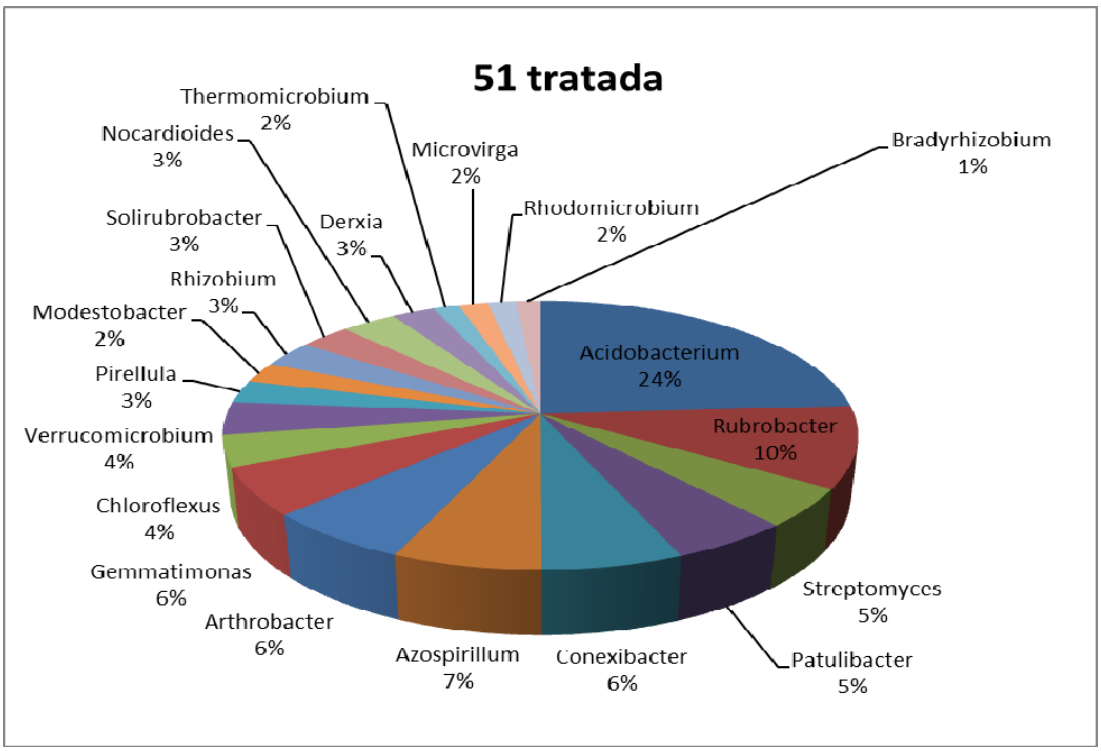

Figura 19. Porcentaje de géneros de bacteria en la parcela 51 tratada.

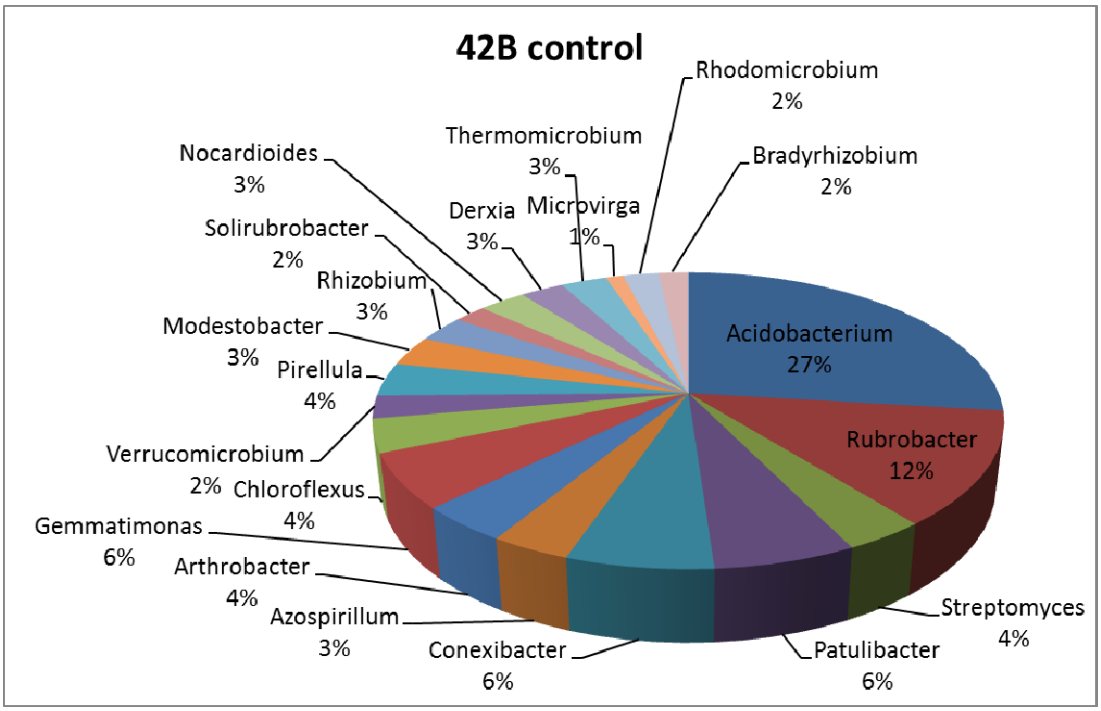

Figura 20. Porcentaje de géneros de bacteria en la parcela 42B control.

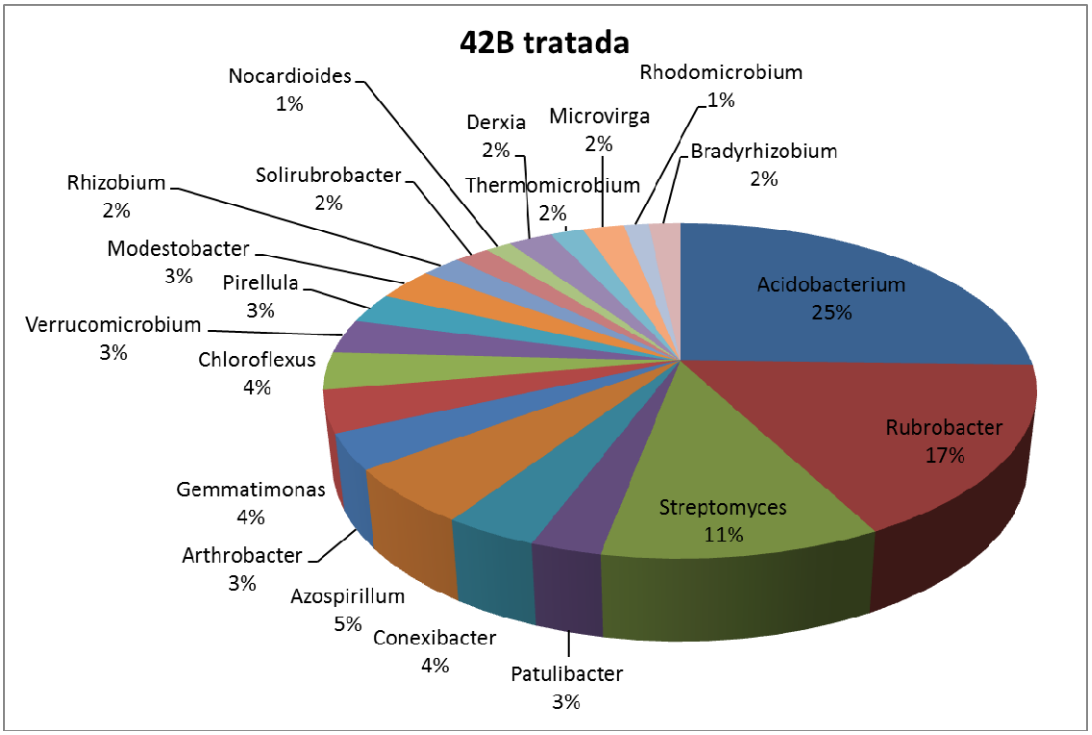

Figura 21. Porcentaje de géneros de bacteria en la parcela 42B tratada.

3. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el primer trimestre del 2014, después de dos años de instalación de los sistemas de filtros vegetales, parecen sugerir que éstos retienen una buena parte de los nutrientes arrastrados en las aguas de escorrentía, reduciendo por tanto la contaminación de las aguas superficiales.

En concreto, los análisis de los contaminantes presentes en las aguas de escorrentía y en particular el nitrato, muestran como la presencia de los biorrollos determina una disminución de las concentraciones de este compuesto si se comparan las cárcavas tratadas con las controles. En algunos casos esta disminución puede llegar hasta a un 70% menos gracias a la presencia de los filtros.

Las medidas correctoras no provocan cambios significativos en la fertilidad de los suelos y en sus características físico-químicas, relevándose un elevado índice de semejanza entre suelos tratados y suelos control.

Por otro lado, el estudio de la actividad microbiana del suelo muestra una elevada capacidad desnitrificante en la zona de actuación en general. Los filtros no actúan modificando la actividad biológica sino más bien reteniendo los nutrientes contaminantes presentes en el agua. Aun así, su instalación podría ayudar el proceso de asimilación de los nitratos por parte de las plantas evitando su pérdida mediante desnitrificación.

Con el estudio de la composición de la microbiota presente en las cuatro parcelas, se ha demostrado que las comunidades bacterianas presentes en los suelos objeto de estudio presentan una alta biodiversidad. Comparando los suelos tratados y sin tratar, se puede

apreciar que, tanto a nivel de clase como a nivel de género, las poblaciones más abundantes no sufren diferenciaciones debido al tratamiento y a la cárcava en estudio,

Por lo tanto, se puede concluir que los filtros vegetales producen un efecto positivo sobre la contaminación por nitrato de origine agrario sin comprometer las características principales de los suelos que se someten a tratamiento.

4. Agradecimientos

El proyecto EUTROMED (LIFE 10 ENV/ES/511) ha sido financiado por la Comisión Europea en el marco de los proyectos LIFE+.

5. Bibliografía.

Andam, C. P., & Parker, M. A. (2007). Novel alphaproteobacterial root nodule symbiont associated with Lupinus texensis. Applied and environmental microbiology, 73(17), 5687-5691.

Bazylinski DA, Williams TJ, Lefèvre CT, Berg RJ, Zhang CL, Bowser SS, Dean AJ, Beveridge TJ. (2012) Magnetococcus marinus gen. nov., sp. nov., a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (Magnetococcaceae fam. nov.; Magnetococcales ord. nov.) at the base of the Alphaproteobacteria. Int J Syst Evol Microbiol. doi: 10.1099/ijs.0.038927-0

Blanco-Canqui H, Gantzer, CJ and Anderson SH (2006). Performance of Grass Barriers and Filter Strips under Interrill and Concentrated Flow. J. Environ. Qual. 35:1969–1974.

Bremner, J. M. (1965). Inorganic forms of nitrogen. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, (methodsofsoilanb), 1179-1237.

Carpenter, S. et al. (1998) Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. Issues in Ecology 3, Ecological Society of America.

Costa, J. A., Farias, N. C., Queirós, Y. G., & Mansur, C. R. (2013). Determination of oil-in-water using nanoemulsions as solvents and UV visible and total organic carbon detection methods. Talanta, 107: 304–311.

Engelbrektson, A., Kunin, V., Wrighton, K. C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., & Hugenholtz, P. (2010). Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. The ISME journal, 4: 642-647.

Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K. and Burns R. C. (1968). The Acetylene - Ethylene Assay for N2 Fixation: Laboratory and Field Evaluation. Plant Physiology, 43: 1185-1207.

Natural Resources Conservation Servive, 1999. Soil taxonomy, a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. Agricultural Hadbook, vol. 436, second ed. Washington DC, USA, 869 pp.

Olsen S.R. Dean L.A. 1965. Phosphorous. In: Page A.I., Miller R.H., Keeney D.R. (Eds). Methods of Soil Analysis:Part 2 Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison WI, USA pp. 1035-1049.

Pratt P.F. Potassium release from exchangeable and non-exchangeable forms in soils. Ohio Agricultural Experiment Station Resource Bolletin 47, 747.

Vera, J.C., Wheat, C.W., Fescemyer, H.W., Frilander, M.J., Crawford, D.L., Hanski, I., Marden, J.H. (2008). Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454pyrosequencing. Mol. Ecol. 17: 1636-1647.

Yuan, Y., Bingner, R. L., & Locke, M. A. (2009). A review of effectiveness of vegetative buffers on sediment trapping in agricultural areas. Ecohydrology, 2: 321-336.