

# DINÁMICA DE PESTICIDAS EN PARCELAS DE CAMPO EXPERIMENTALES ENMENDADAS CON RESIDUOS ORGÁNICOS: SIMULACIÓN DE SU TRANSPORTE EN EL SUELO COMO HERRAMIENTA PARA PREDECIR LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS



María José Carpio Espinosa

TESIS DOCTORAL 2021





**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**  
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**DINÁMICA DE PESTICIDAS EN PARCELAS DE  
CAMPO EXPERIMENTALES ENMENDADAS  
CON RESIDUOS ORGÁNICOS: SIMULACIÓN  
DE SU TRANSPORTE EN EL SUELO COMO  
HERRAMIENTA PARA PREDECIR LA  
CONTAMINACIÓN DE AGUAS**

**María José Carpio Espinosa**

**TESIS DOCTORAL**

**Salamanca, 2021**



**DINÁMICA DE PESTICIDAS EN PARCELAS DE CAMPO  
EXPERIMENTALES ENMENDADAS CON RESIDUOS  
ORGÁNICOS: SIMULACIÓN DE SU TRANSPORTE EN EL  
SUELO COMO HERRAMIENTA PARA PREDECIR LA  
CONTAMINACIÓN DE AGUAS**

Memoria presentada por la Ingeniera en Biotecnología María José Carpio Espinosa para optar al grado de Doctora en Agrobiotecnología, dentro del Programa de Doctorado en Agrobiotecnología de la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 23 de junio de 2021

MARÍA JOSÉ CARPIO ESPINOSA

LOS DIRECTORES

MARÍA JESÚS SÁNCHEZ MARTÍN

Profesora de Investigación del CSIC

MARÍA SONIA RODRÍGUEZ CRUZ

Científica Titular del CSIC

JESÚS MARÍA MARÍN BENITO

Investigador Postdoctoral del CSIC



CARLOS NICOLÁS RODRÍGUEZ, Coordinador del Programa de Doctorado en Agrobiotecnología de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada **“Dinámica de pesticidas en parcelas de campo experimentales enmendadas con residuos orgánicos: simulación de su transporte en el suelo como herramienta para predecir la contaminación de aguas”** ha sido realizada en el Programa de Doctorado en Agrobiotecnología de la Universidad de Salamanca por la Ingeniera MARÍA JOSÉ CARPIO ESPINOSA, bajo la dirección de la Dra. MARÍA JESÚS SÁNCHEZ MARTÍN, la Dra. MARÍA SONIA RODRÍGUEZ CRUZ y el Dr. JESÚS MARÍA MARÍN BENITO, dicha memoria se presenta en la modalidad de compendio de artículos científicos y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca, a 23 de junio de dos mil veinte uno.

CARLOS NICOLÁS RODRÍGUEZ





M<sup>a</sup> JESÚS SÁNCHEZ MARTÍN, Profesora de Investigación del CSIC, M<sup>a</sup> SONIA RODRÍGUEZ CRUZ, Científica Titular del CSIC, y JESÚS MARÍA MARÍN BENITO, Investigador Postdoctoral Contratado del CSIC

CERTIFICAN:

Que la Ingeniera en Biotecnología MARÍA JOSÉ CARPIO ESPINOSA ha 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 su dirección, el trabajo para optar al grado de Doctor en Agrobiotecnología que presenta con el título: **“Dinámica de pesticidas en parcelas de campo experimentales enmendadas con residuos orgánicos: simulación de su transporte en el suelo como herramienta para predecir la contaminación de aguas”**, autorizando a la presentación de dicha memoria en la modalidad de compendio de artículos científicos.

La realización del trabajo ha sido posible gracias a una ayuda a la contratación de personal investigador concedida al amparo de la Orden **EDU/529/2017** (2017– 2021) de la Junta de Castilla y León, y la investigación ha estado asociada al proyecto **MINECO/FEDER UE (Project AGL2015–69485–R)** subvencionado por la Dirección General de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Salamanca, a 23 de junio de dos mil veinte uno.

MARÍA JESÚS SÁNCHEZ MARTÍN

MARÍA SONIA RODRÍGUEZ CRUZ

JESÚS MARÍA MARÍN BENITO



La presente memoria titulada **“Dinámica de pesticidas en parcelas de campo experimentales enmendadas con residuos orgánicos: simulación de su transporte en el suelo como herramienta para predecir la contaminación de aguas”**, ha sido redactada en el formato de compendio de artículos originales de investigación publicados en revistas científicas de prestigio internacional e indexadas en la edición científica del *Journal Citation Reports* con cuartil en la categoría Q1 y que se incluyen en el apartado **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN** de esta memoria. Un resumen en español de estos artículos se incluye también en dicho apartado 4.

Y para que así conste se recogen a continuación los seis artículos originales de investigación más dos artículos de revisión derivados de ellos, su título, autores y afiliación de los mismos, junto con la referencia completa de la revista científica donde fueron publicados:

**1. “Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: Effect of the temperature and the organic amendments”**

Jesús M. Marín–Benito, **M. José Carpio**, 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**, 2019, Vol. 653, p. 1301–1310

Disponible on–line desde 05/11/2018

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.015

**2. “Mobility monitoring of two herbicides in amended soils: A field study for modeling applications”**

**María J. Carpio**<sup>a</sup>, M. Sonia Rodríguez–Cruz<sup>a</sup>, Carlos García–Delgado<sup>a,b</sup>, María J. Sánchez–Martín<sup>a</sup>, Jesús M. Marín–Benito<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA–CSIC), C/ Cordel de Merinas 40–52, 37008 Salamanca, España

<sup>b</sup> Departamento de Geología y Geoquímica, Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, España

**Journal of Environmental Management**, 2020, Vol. 260, p. 110161

Disponible on–line desde 24/01/2020

DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.110161

**3. “Modelling herbicides mobility in amended soils: Calibration and test of PRZM and MACRO”**

Jesús M. Marín–Benito <sup>a</sup>, Laure Mamy <sup>b</sup>, **María J. Carpio** <sup>a</sup>, María J. Sánchez–Martín <sup>a</sup>, M. Sonia Rodríguez–Cruz <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA–CSIC), C/ Cordel de Merinas 40–52, 37008 Salamanca, España

<sup>b</sup> Universidad Paris–Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS, 78850 Thiverval–Grignon, Francia

**Science of the Total Environment**, 2020, Vol. 717, p. 137019

Disponible on–line desde 30/01/2020

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137019

**4. “Field measurement and modelling of chlorotoluron and flufenacet persistence in unamended and amended soils”**

Jesús M. Marín–Benito <sup>a</sup>, **M. José Carpio** <sup>a</sup>, Laure Mamy <sup>b</sup>, M. Soledad Andrades <sup>c</sup>, María J. Sánchez–Martín <sup>a</sup>, M. Sonia Rodríguez–Cruz <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA–CSIC), C/ Cordel de Merinas 40–52, 37008 Salamanca, España

<sup>b</sup> Universidad Paris–Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS, 78850 Thiverval–Grignon, Francia

<sup>c</sup> Departamento de Agricultura y Alimentos, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, España

**Science of the Total Environment**, 2020, Vol. 725, p. 138374

Disponible on–line desde 01/04/2020

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138374

**5. “Accelerated dissipation of two herbicides after repeated application in field experiments with organically–amended soil”**

**María José Carpio**, 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

**Agronomy**, 2021, Vol. 11(6), p. 1125

Disponible on–line desde 31/05/2021

DOI: 10.3390/agronomy/11061125

**6. “Soil Microbial Community Changes in a Field Treatment with Chlorotoluron, Flufenacet and Diflufenican and Two Organic Amendments”**

**María José Carpio**<sup>1</sup>, Carlos García–Delgado<sup>1,2</sup>, Jesús María Marín–Benito<sup>1</sup>, María Jesús Sánchez–Martín<sup>1</sup>, María Sonia Rodríguez–Cruz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA–CSIC), C/ Cordel de Merinas 40–52, 37008, Salamanca, España

<sup>2</sup> Departamento de Geología y Geoquímica, Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, España

*Agronomy*, 2020, Vol. 10(8), p. 1166

Disponible on–line desde 08/08/2020

DOI: 10.3390/agronomy10081166

**7. “Effect of Organic Residues on Pesticide Behavior in Soils: A Review of Laboratory Research”**

**María J. Carpio**, María J. Sánchez–Martín, M. Sonia Rodríguez–Cruz, Jesús M. Marín–Benito

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

*Environments*, 2021, Vol. 8(4), p. 32

Disponible on–line desde 14/04/2021

DOI: 10.3390/environments8040032

**8. “Fate of pesticides in soils under different agricultural management practices”**

**María J. Carpio**, M. Sonia Rodríguez–Cruz, María J. Sánchez–Martín, Jesús M. Marín–Benito

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

*Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. “Pesticides in Soils: Occurrence, Fate, Control and Remediation” (Springer)

Enviado (31/05/2021). Prevista publicación 31/07/2021



## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo: la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Sánchez Martín, Profesora de Investigación del CSIC, la Dra. M<sup>a</sup> 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 haberme dado la gran oportunidad de realizar este trabajo y crecer profesionalmente, por su confianza depositada en mí y por su continua dedicación, acertada orientación y constante estímulo en el desarrollo de esta tesis. Gracias por la experiencia y conocimiento que me supieron transmitir en este proceso de aprendizaje para que esta tesis llegue a buen término.

A la Dra. Laure Mamy del Institut National de Recherche pour l’Agriculture, l’alimentation et l’Environnement (INRAE) por sus enseñanzas y valiosos aportes científicos en la modelización del destino medioambiental de los pesticidas, y por su cálida hospitalidad y amistad brindada durante mi estancia predoctoral en su centro de investigación en Versailles, Francia.

Al Dr. Carlos García Delgado, Profesor Ayudante Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid, por todo su trabajo, interés y conocimiento científico aportado durante su periodo postdoctoral en el IRNASA, que enriquecieron esta tesis.

A la Dra. M<sup>a</sup> Soledad Andrades, Prof. Titular del Dpto. de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja, por su colaboración y contribuciones científicas para la realización de este trabajo.

A todo el personal del IRNASA, en particular, al Grupo de Contaminación de Suelos y Aguas por pesticidas del Departamento de Procesos de Degradación del Medio Ambiente y su Recuperación, especialmente a José Manuel Ordax por todo el trabajo y ayuda constante en la realización de este trabajo, así como por su paciencia y amistad brindada. También quiero agradecer al Dr. Eliseo Herrero, y a todos los becarios y pasantes, pasados y presentes, por su colaboración y dinamismo demostrado durante el desarrollo de esta tesis.

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.

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 esta tesis.

¡A mi familia por su apoyo y cariño permanente a pesar de la distancia!



# ÍNDICE





---

**ÍNDICE**

<b>1. OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
2.1 Pesticidas.....	7
2.1.1 Producción y uso actual .....	7
2.1.2 Características de los pesticidas .....	10
2.1.3 Tipos de pesticidas .....	11
2.1.4 Herbicidas .....	11
2.1.5 Contaminación de suelos y aguas por herbicidas.....	14
2.2 Dinámica de los herbicidas en los suelos.....	16
2.2.1 Procesos de acumulación: adsorción–desorción de herbicidas en los suelos.....	17
2.2.2 Procesos de eliminación: degradación de herbicidas en los suelos.....	18
2.2.3 Procesos de movimiento: lixiviación, escorrentía, volatilización y absorción por plantas de herbicidas en los suelos .....	20
2.3 Residuos orgánicos .....	22
2.3.1 Producción, problemática ambiental y uso como enmienda en agricultura .....	22
2.3.2 Sustrato postcultivo de hongos.....	25
2.3.2.1 Producción del cultivo del champiñón y setas .....	25
2.3.2.2 Problemática medioambiental de la generación de sustrato postcultivo de hongos.....	26
2.3.3 Compost vegetal.....	27
2.4 Efecto de los residuos orgánicos aplicados al suelo en el comportamiento de los herbicidas .....	29

---

2.4.1 Efecto sobre la adsorción–desorción de herbicidas .....	29
<i>Modelización de la adsorción–desorción de los herbicidas en los suelos</i>	
2.4.2 Efecto sobre la degradación / disipación / persistencia de herbicidas .....	31
<i>Modelización de las cinéticas de degradación de los herbicidas en los suelos</i>	
2.4.3 Efecto sobre la lixiviación de herbicidas .....	35
<i>Modelización de la lixiviación de herbicidas en suelos</i>	
2.4.4 Efecto sobre las comunidades microbianas del suelo .....	38
2.5 BIBLIOGRAFÍA .....	41
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
3.1 MATERIALES .....	59
3.1.1 Enmiendas orgánicas.....	59
3.1.2 Herbicidas e ion trazador .....	60
3.1.3 Suelo.....	65
3.1.4 Modelos matemáticos de destino medioambiental de pesticidas: PRZM y MACRO .....	66
3.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES .....	70
3.2.1 Caracterización de las enmiendas orgánicas .....	70
3.2.2 Preparación de parcelas experimentales, aplicación de residuos orgánicos, herbicidas e ion trazador .....	70
3.2.3 Caracterización del suelo sin enmendar y enmendado .....	74
3.2.4 Evaluación de la adsorción de los herbicidas en los distintos horizontes del suelo sin enmendar y enmendado en campo: Experimento de laboratorio .....	75
3.2.5 Evaluación de la degradación de los herbicidas y de la formación de sus principales metabolitos en el suelo sin enmendar y enmendado en campo: Experimento de laboratorio.....	76

---

3.2.6 Evaluación de la movilidad y distribución de los herbicidas, ion trazador y metabolitos en el perfil del suelo sin enmendar y enmendado en campo: Experimento de campo.....	77
3.2.7 Evaluación de las cinéticas de disipación de los herbicidas y cinéticas de formación de sus principales metabolitos en el suelo sin enmendar y enmendado en campo: Experimento de campo .....	78
3.2.8 Determinación cuantitativa de los herbicidas y metabolitos.....	79
3.2.9 Determinación cuantitativa del ion trazador .....	83
3.2.10 Modelización del comportamiento de los herbicidas y el ion trazador en el campo .....	85
<i>Estrategia de modelización</i>	
<i>Parametrización de los modelos matemáticos</i>	
3.2.11 Evaluación de parámetros bioquímicos indicadores de la actividad, abundancia y estructura de las comunidades microbianas del suelo durante el proceso de disipación de los herbicidas en campo.....	87
<i>Determinación de la actividad deshidrogenasa del suelo (DHA)</i>	
<i>Determinación del perfil de ácidos grasos de fosfolípidos del suelo (PLFAs)</i>	
3.2.12 Análisis estadístico de resultados obtenidos en los distintos procesos estudiados.....	91
3.3 BIBLIOGRAFÍA .....	94
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>99</b>
4.1 CAPÍTULO 1: Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: Effect of the temperature and the organic amendments	
4.1.1 RESUMEN.....	101
4.1.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	107
4.2 CAPÍTULO 2: Mobility monitoring of two herbicides in amended soils: A field study for modeling applications	

---

4.2.1 RESUMEN.....	119
4.2.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	125
4.2.3 MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	139
4.3 CAPÍTULO 3: Modelling herbicides mobility in amended soils: Calibration and test of PRZM and MACRO	
4.3.1 RESUMEN.....	153
4.3.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	159
4.3.3 MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	175
4.4 CAPÍTULO 4: Field measurement and modelling of chlorotoluron and flufenacet persistence in unamended and amended soils	
4.4.1 RESUMEN.....	191
4.4.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	197
4.4.3 MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	207
4.5 CAPÍTULO 5: Accelerated dissipation of two herbicides after repeated application in field experiments with organically–amended soil	
4.5.1 RESUMEN.....	219
4.5.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	225
4.6 CAPÍTULO 6: Soil microbial community changes in a field treatment with chlorotoluron, flufenacet and diflufenican and two organic amendments	
4.6.1 RESUMEN.....	239
4.6.2 ARTÍCULO PUBLICADO.....	245
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>263</b>

# OBJETIVOS







## 1. OBJETIVOS

El **objetivo principal del trabajo** fue estudiar el efecto de la aplicación simultánea de tres herbicidas ampliamente utilizados en cultivos de cereales y/o frecuentemente encontrados en las aguas superficiales y/o subterráneas, clortoluron (CTL), flufenacet (FNC) y diflufenican (DFN); y dos residuos orgánicos, sustrato postcultivo de hongos (SMS) y compost verde (GC), añadidos a un suelo cultivado con trigo de invierno como enmiendas orgánicas, en el transporte de estos compuestos en el suelo en parcelas experimentales bajo condiciones de campo, a partir de: i) la evaluación de la **disipación, persistencia, distribución y/o movilidad de los herbicidas** en el perfil del suelo sin enmendar y enmendado, ii) la modelización de su comportamiento a partir de la utilización de los modelos matemáticos **PRZM** (Pesticide Root Zone Model) y **MACRO** (Water and solute transport in macroporous soils) parametrizados y validados con datos medidos bajo condiciones de campo con el fin de **predecir a largo plazo el impacto medioambiental en la calidad de las aguas subterráneas** bajo este tipo de escenarios, y iii) la influencia de esta práctica agronómica en las **comunidades microbianas** del suelo como indicadores de la calidad y conservación del suelo.

Para conseguir el objetivo principal del trabajo se abordaron los siguientes objetivos parciales:

1. Determinación de la **cinética de degradación de CTL y FNC, y la formación de sus metabolitos** en un suelo agrícola sin enmendar y enmendado con los residuos orgánicos SMS o GC **bajo condiciones de laboratorio a dos temperaturas diferentes, 6 °C y 16 °C**, con el fin de obtener los respectivos factores  $Q_{10}$  esenciales para la simulación posterior de la conducta medioambiental de los herbicidas con los modelos PRZM y MACRO.
2. Evaluación del **contenido volumétrico de agua, de la movilidad y el balance total de los herbicidas CTL y FNC, y del ion trazador bromuro ( $Br^-$ )** en el perfil de un suelo agrícola sin enmendar y enmendado con SMS o GC después de su aplicación en parcelas experimentales en un suelo cultivado con trigo de invierno durante un periodo de dos años consecutivos. Determinar el efecto de los residuos orgánicos en la conducta medioambiental de los herbicidas a partir de la **relación de las concentraciones del ion  $Br^-$  y de los herbicidas con las características del perfil**

**del suelo sin enmendar y enmendado, contenido de humedad y eventos de precipitación.**

3. **Simulación del contenido volumétrico de agua en el suelo y de la movilidad de los herbicidas CTL, FNC, y el ion  $\text{Br}^-$  en el perfil del suelo sin enmendar y enmendado con SMS o con GC usando los modelos PRZM y MACRO.** Evaluar y comparar el rendimiento de ambos modelos para su posible uso como herramientas de predicción del comportamiento medioambiental de estos herbicidas en suelos enmendados.
4. Estudio de la **cinética de disipación en campo de los herbicidas CTL y FNC, y la formación de sus metabolitos durante el primer año de su aplicación** en un suelo agrícola sin enmendar y enmendado con SMS o GC. Ajustar su disipación al modelo cinético más simple y aceptable para su descripción **mediante el uso de índices estadísticos, y evaluar la capacidad del modelo MACRO** para simular la persistencia de estos herbicidas en suelos enmendados.
5. Estudio de la **cinética de disipación en campo de los herbicidas CTL y FNC, y la formación de sus metabolitos después de su aplicación repetida** en un suelo sin enmendar y enmendado con SMS o GC. Comparar su persistencia con aquella observada el año anterior después de una primera aplicación y evaluar la influencia de la evolución de las propiedades del suelo y condiciones climáticas en la disipación y persistencia a largo plazo de estos herbicidas.
6. Evaluar los **cambios en las comunidades microbianas del suelo después de la aplicación de los herbicidas CTL y FNC + DFN** en un suelo sin enmendar y enmendado con SMS o GC en condiciones de campo. Determinar la evolución de la actividad global, biomasa microbiana total y estructura de las comunidades microbianas del suelo durante el periodo de disipación de estos herbicidas a lo largo de un año.

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 indexados 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

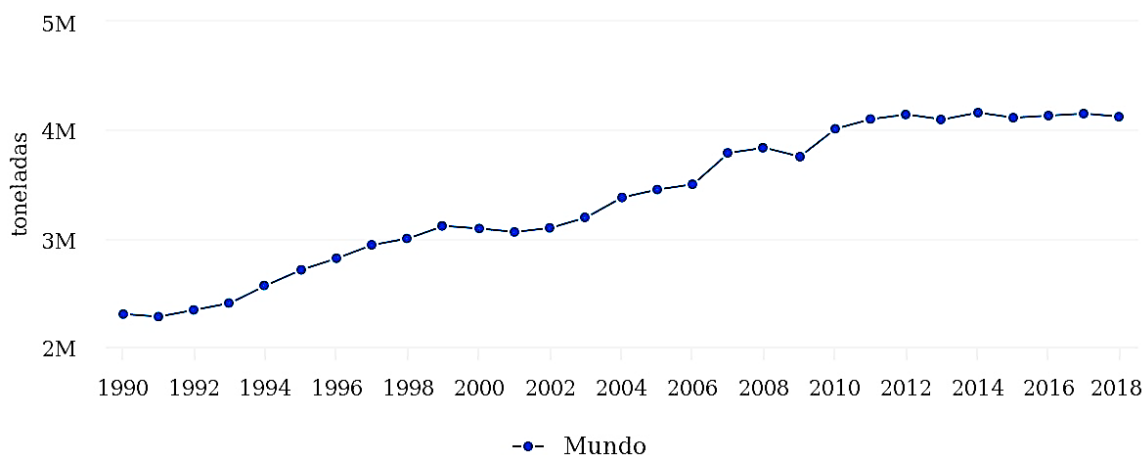
### 2.1 Pesticidas

#### 2.1.1 Producción y uso actual

Se entiende por pesticida cualquier sustancia o mezcla de sustancias químicas, bioactivas y tóxicas, de origen natural o sintético y de naturaleza orgánica o inorgánica, que están destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga. Una plaga se define como cualquier organismo vivo que produce daños o pérdidas económicas o que causa o transmite una enfermedad. Las plagas pueden ser provocadas por animales (ratones, insectos o algún parásito), plantas no deseadas (malas hierbas) o microorganismos (virus, hongos o bacterias) (EPA, 2021).

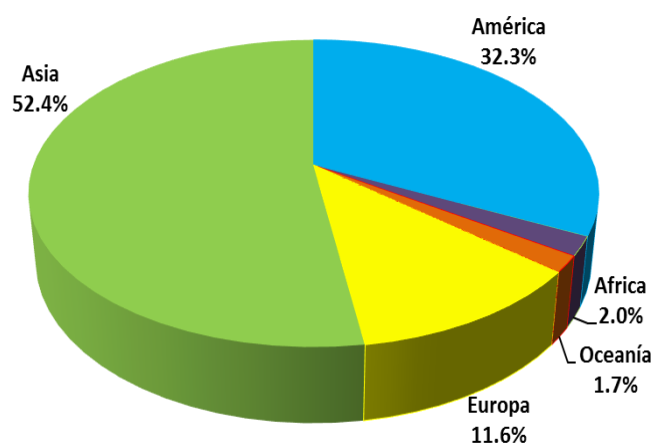
Los pesticidas y fertilizantes son los principales responsables del incremento en la producción agrícola registrado desde el año 1950, convirtiéndose en una parte esencial de la agricultura intensiva moderna. El papel que desempeñan los pesticidas es fundamental debido a la mayor vulnerabilidad de los monocultivos al ataque de plagas. Estos compuestos se aplican para controlar y destruir las plagas, y mejorar el rendimiento y calidad de los cultivos, maximizando la rentabilidad económica y asegurando la suficiente producción de alimentos para cubrir las necesidades alimenticias de la creciente población mundial (Sharma et al., 2019, 2020), actualmente con más de 7700 millones de personas y que se estima superará los 9700 millones en el año 2050, y podría alcanzar un máximo de casi 11000 millones alrededor del año 2100 (Naciones Unidas, 2021). Por tanto, la aplicación de una amplia gama de pesticidas se considera un componente regular y consistente en la agricultura, que influye directa o indirectamente, en la productividad del suelo y la calidad del agro ecosistema (Tudi et al., 2021).

La infestación de plagas, enfermedades y/o la competencia entre cultivos y malas hierbas por los nutrientes del suelo, causan al año pérdidas de hasta el 45% de la producción agrícola mundial, y se pueden presentar en todas las fases del cultivo y de la cadena de distribución (Sharma et al., 2019). Por esta razón, a medida que el valor añadido del cultivo incrementa, lo hace también el número de aplicaciones de pesticidas, llegándose a aplicar hasta 10 o 15 veces por cultivo, con más de un compuesto activo adicionado en cada aplicación. Esta intensificación agrícola a nivel mundial en las últimas décadas ha ido unida a un consumo cada vez mayor de pesticidas (**Figura 1**).

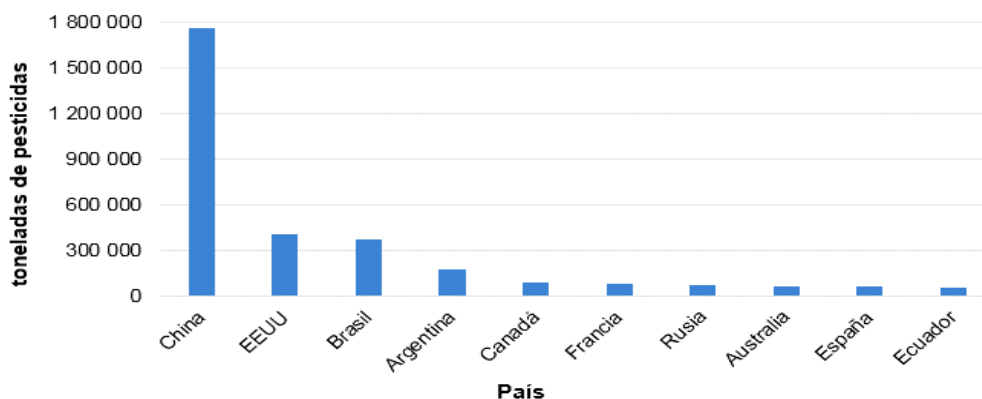


**Figura 1.** Cantidad total (toneladas) de pesticidas consumidos en todo el mundo desde el año 1990 hasta el año 2018 (FAO, 2021)

A nivel mundial, se utilizan casi 3 mil millones de kg de pesticidas cada año con un presupuesto de aproximadamente 40 mil millones de dólares (Sharma et al., 2020). El mayor volumen de consumo correspondía hace algunos años a los países desarrollados, sin embargo, en la última década los países en desarrollo (especialmente en Asia y América Latina) han registrado un mayor aumento en el consumo de estos compuestos (**Figura 2**) (March, 2014). Los diez países con mayor consumo de pesticidas del mundo son China, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Canadá, Francia, Rusia, Australia, España y Ecuador (**Figura 3**) (FAO, 2021).



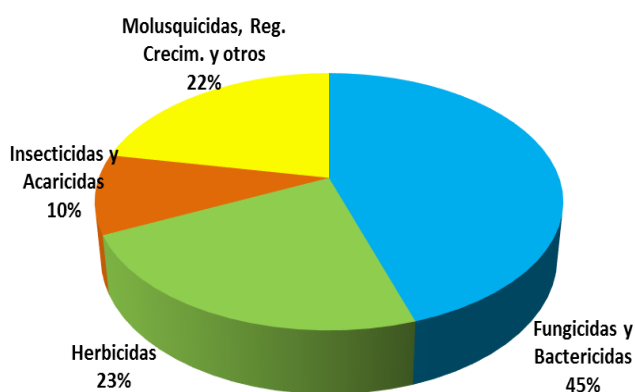
**Figura 2.** Porcentaje global de las principales categorías de pesticidas comercializados en todo el mundo en el año 2018 (FAO, 2021)



**Figura 3.** Principales países consumidores de pesticidas en todo el mundo en el año 2018 (FAO, 2021)

La disminución paulatina del volumen de pesticidas usados en los países de la Unión Europea (UE), es atribuible a las políticas proactivas tendentes a disminuir su uso (March, 2014). Sin embargo, más de 150 pesticidas diferentes están autorizados para su uso en los estados miembros de la UE, con una aplicación anual mayor a las 350000 t, representando los principales insumos para los sistemas de producción agrícola y una porción significativa del presupuesto de la comunidad europea dedicada a la agricultura (TCE, 2020).

España ha sido tradicionalmente un país con un alto consumo de pesticidas y con tendencia a crecer en el tiempo, llegando a estar en el noveno puesto a nivel mundial entre los países con mayor consumo de pesticidas en la actualidad (FAO, 2021). En el año 2019 se consumieron 75397 t de pesticidas, lo que supone un 2.9% más que en 2018. El grupo de sustancias activas que presentó una mayor comercialización correspondió a fungicidas y bactericidas (45%), seguidos de herbicidas (23%), insecticidas y acaricidas (10%), y molusquicidas y otros productos fitosanitarios (22%) (**Figura 4**) (MAPA, 2021).



**Figura 4.** Principales categorías de pesticidas comercializados en España en el año 2019 (MAPA, 2021)

### 2.1.2 Características de los pesticidas

Los pesticidas deben reunir determinados requisitos para alcanzar un amplio uso en la agricultura (Sánchez–Martín y Sánchez–Camazano, 1984; Umetsu y Shirai, 2020): i) ser efectivos y selectivos contra la plaga sobre la que actúan sin perjudicar a otros organismos de la flora o fauna, ii) proporcionar beneficios económicos que superen el gasto que implica su uso, iii) ser seguros y no presentar un peligro para la salud del ser humano, animales domésticos y plantas útiles al hombre, iv) ser estables, es decir, mantener su capacidad de acción durante un tiempo suficiente, y v) ser compatibles con algunos de los posibles soportes y diluyentes, dando lugar a formulaciones estables y efectivas.

Las formulaciones comerciales de los pesticidas aplicados en campo están compuestas por una serie de constituyentes: el ingrediente activo puro con el poder biocida en un soporte sólido o en un disolvente líquido, y numerosos coadyuvantes y aditivos (emulgentes, surfactantes, antioxidantes, protectores, adherentes, fluidificantes y estabilizantes) para optimizar y prolongar la acción del pesticida, facilitar su aplicación y proteger a los cultivos del propio pesticida (Umetsu y Shirai, 2020). Los pesticidas pueden ser comercializados como concentrados acuosos, concentrados emulsionables, suspensiones concentradas, polvo soluble en agua, polvo humectable, granulados, etc. Pueden ser aplicados en forma de spray (disolución o emulsión de partículas) o dispersados como gránulos, polvo o fumigantes. Habitualmente se aplican disueltos o suspendidos en agua como un fino spray por medio de sistemas acoplados a tractores o remolques aspersores. El spray se administra directamente en la base de los cultivos, salvo en parcelas donde es dirigido hacia arriba a altas presiones para llegar a los frutos más altos de los árboles.

El pesticida debe ser distribuido uniformemente en toda la parcela tratada para obtener la máxima eficacia en la aplicación, evitando que sus partículas se escapen por deriva a otros lugares que no se deseen tratar, puede ser por deriva directa (componente horizontal del viento) o indirecta (viento o corrientes convectivas o térmicas ascendentes), o por evaporación y difusión. La pérdida de producto fuera de la zona de tratamiento, implica una menor efectividad y mayor gasto de producto, y el riesgo de contaminación de zonas cercanas a las del tratamiento (Brain et al., 2017; Wang et al., 2020).



### **2.1.3 Tipos de pesticidas**

Los pesticidas pueden clasificarse de acuerdo a diferentes criterios, atendiendo a su naturaleza química o a su acción biológica específica (Khan, 2016):

Según su naturaleza química, los pesticidas pueden ser inorgánicos u orgánicos. Esto provee información sobre su posible toxicidad, pues en general, los pesticidas inorgánicos no representan un problema relevante desde el punto de vista de toxicidad y evolución en el suelo, mientras que los pesticidas orgánicos plantean problemas de evolución en el suelo y, por tanto, riesgos potenciales para los humanos, animales y medio ambiente (Kim et al., 2017; Kapsi et al., 2019).

Según su acción biológica específica los pesticidas pueden ser herbicidas (elimina malas hierbas), fungicidas (impide el crecimiento y elimina hongos), insecticidas (control de insectos), rodenticidas (elimina o repele roedores), bactericidas (elimina bacterias), nematocidas (control de nematodos), acaricidas (elimina y previene la presencia o acción de los ácaros), molusquicidas (aplicación contra moluscos), fitohormonas y fitorreguladores (inhiben, promueven o modifican algún proceso fisiológico en organismos vegetales), etc. Los tres grupos de mayor interés por su uso en la agricultura son los herbicidas, fungicidas e insecticidas (García et al., 2012).

La mayoría de los pesticidas utilizados en la agricultura son compuestos químicos orgánicos obtenidos sintéticamente, cuyo propósito es destruir al organismo–diana al cual están dirigidos interfiriendo en sus procesos metabólicos vitales. Los procesos metabólicos suelen ser la fotosíntesis (herbicidas), la biosíntesis (fungicidas), los impulsos nerviosos (insecticidas), la generación y transferencia de energía o el crecimiento y división celular (herbicidas y fungicidas) (García et al., 2012; Casida, 2017).

### **2.1.4 Herbicidas**

Los herbicidas son sustancias químicas utilizadas para inhibir o impedir el desarrollo de plantas no deseadas o malas hierbas en cultivos agrícolas, las cuales suelen presentar una alta dispersión debido al viento o el agua y una gran resistencia. Las malas hierbas compiten con el cultivo por la luz, el agua y los nutrientes, disminuyendo el desarrollo y rendimiento de los cultivos, y por tanto, reduciendo las cosechas y causando

pérdidas económicas. Los herbicidas se pueden clasificar de acuerdo a diferentes criterios (Vasilescu y Medvedovici, 2005):

Según su rango de acción, pueden ser totales (se aplican para controlar la totalidad de las malas hierbas y limpiar las parcelas) o selectivos (se aplican para destruir un tipo concreto de maleza sin afectar al cultivo). Un herbicida puede ser total o selectivo dependiendo de su concentración o dosis aplicada, ya que un herbicida total puede ser selectivo a concentraciones bajas, y viceversa.

Según el modo de acción, pueden ser residuales (se aplican directamente al suelo y sólo afectan a las malas hierbas que germinan, no a las existentes), foliares de contacto (afectan a hojas y tallos de malas hierbas al entrar en contacto con ellas) o foliares sistémicos (se absorben y trasladan a través del sistema vascular hasta la raíz, provocando la muerte de las plantas).

Según el momento de aplicación, pueden ser de pre-siembra (se aplican antes de la siembra), pre-emergencia (se aplican antes de que el cultivo emerja del suelo y son usados en terrenos con historial de malas hierbas) y post-emergencia (se aplican cuando el cultivo y las malas hierbas ya han germinado).

Según su composición y estructura química, pueden ser ureas (clortoluron, etc.), oxiacetamidas (flufenacet, etc.), carboxamidas (diflufenican, etc.), triazinas (atrazina, etc.), carbamatos y tiocarbamatos (prosulfocarb, etc.), compuestos piridínicos y biperidínicos (paraquat, etc.), organoclorados (pentaclorofenol, etc.), dinitroanilinas (trifluralin, etc.), entre otros.

La mayoría de herbicidas requieren ser selectivos ya que se aplican durante el cultivo y no pueden provocarle daños. Al elegir el herbicida más adecuado, se debe tener en cuenta la dosis y momento de aplicación considerando el estado de desarrollo del cultivo, ya que al igual que eliminan la planta no deseada, pueden hacerlo con la cultivada o provocarle daños, y considerando también las características fisicoquímicas del suelo.

Para lograr un control oportuno de las malas hierbas se necesita cierta incorporación del herbicida en el suelo, comúnmente por medio de la lluvia o el riego y el movimiento de los ingredientes activos a través del perfil del suelo. Sin embargo, este movimiento puede estar asociado con tres inconvenientes: i) dilución del herbicida en la zona de germinación y acumulación de semillas de malas hierbas en la zona de la raíz del

cultivo que puede causarle daño, ii) disminución de la actividad herbicida a causa de la distribución del ingrediente activo debajo de la zona de la raíz de las malas hierbas objetivo, y iii) posible contaminación del agua subterránea. Por lo tanto, sólo una pequeña fracción del herbicida aplicado contribuye a la actividad deseada. Estos problemas pueden dar como resultado aplicaciones repetidas y/o aumento de la dosis aplicada, incrementando el coste y el potencial daño ecológico (El-Nahhal, 2003).

Las malas hierbas representan una limitación y un coste significativo para la producción agrícola en todo el mundo. Sin el control de las malas hierbas las estimaciones suponen que las pérdidas de rendimiento podrían variar, por ejemplo, de 29% en cultivos de trigo a 47% en cultivos de arroz (Oerke, 2005). Se predice que el uso de herbicidas incrementará a medida que se intensifique la producción de alimentos y se continúe presionando la disponibilidad de mano de obra para el control manual de malas hierbas, principalmente en países en desarrollo (Gianessi, 2013).

En España, se utilizaron aproximadamente 17023 t de herbicidas en el año 2019, lo que supone un 22.6% del total de pesticidas utilizados y se mantiene en el mismo nivel que 2018, siendo uno de los más altos registrados en el país, donde se ha ido incrementado el consumo de estos agroquímicos en la última década (FAO, 2021).

Los herbicidas **clortoluron**, **flufenacet** y **diflufenican** son ampliamente utilizados en la actualidad en diferentes cultivos de cereales de invierno en pre- y post-emergencia, que proporcionan un buen control de las malas hierbas y ciertas malezas de hoja ancha. Los cereales se encuentran entre los cultivos más importantes en la agricultura mundial, y en España se dedica una media de 6 millones de hectáreas a estos cultivos, siendo el sector con mayor base territorial y con distribución a lo largo de todo el territorio. El trigo es el segundo cultivo con más representación a nivel nacional por detrás de la cebada, cuya producción alcanzó los 7.5 Mt en el 2020, muy por encima de los 5.1 de 2019 y del 6.7 de 2018 (MAPA, 2021). Se cultiva en todas las comunidades autónomas, pero principalmente se concentra en Castilla y León, con una producción estimada del 40% de la producción total. La mayor parte de estas cosechas son cultivadas en secano y durante la época de invierno, para poder aprovechar las lluvias de dicha estación, ya que los factores más importantes a tener en cuenta en este tipo de siembra son las temperaturas, precipitaciones, la calidad del suelo y la aplicación de herbicidas.

### 2.1.5 Contaminación de suelos y aguas por herbicidas

Los productos fitosanitarios en general y los herbicidas en particular son fundamentales para la subsistencia de la agricultura moderna. El resultado ideal del uso de estos agroquímicos ocurre cuando el compuesto logra los propósitos “anti-plagas” para los cuales fue aplicado y luego se descompone rápidamente en componentes inofensivos, como el dióxido de carbono y el agua. Sin embargo, el uso extensivo de herbicidas cada vez más potentes en las prácticas agrícolas convencionales ha aumentado dramáticamente con el tiempo durante las últimas décadas y ha dado lugar a una contaminación ambiental continua y preocupante, debido a la presencia de contaminantes móviles y/o persistentes en diferentes partes del medio ambiente, lo que resulta en la acumulación de estas sustancias tóxicas (De Souza et al., 2020; Magnoli et al., 2020). La evolución de los herbicidas y sus productos de degradación en el medio ambiente puede llegar a contaminar los ecosistemas del suelo, el agua y el aire con el tiempo (Székács et al., 2015; Schreiner et al., 2016; Silva et al., 2019). Además, si permanecen en los cultivos podrían finalmente incorporarse a la cadena alimentaria, representando una amenaza para la salud humana y otros animales (Stipičević et al., 2015). Los suelos agrícolas contaminados con herbicidas provocan cambios en las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo, afectando a su calidad y provocando trastornos funcionales en la biodiversidad microbiana del suelo y en la actividad enzimática, con un impacto negativo en el rendimiento de los cultivos (Baxter y Cummings, 2008; Arora et al., 2019).

Dos tipos de fuentes de contaminación han sido constatados por el uso de herbicidas: i) Contaminación de fuente puntual, que generalmente es causada por el manejo inadecuado de herbicidas durante su almacenamiento y uso, por eliminación incontrolada, disposición incorrecta de los residuos, fugas o derrames accidentales al llenar un tanque o por limpiar el equipo de rociado después de la aplicación (agua de lavado), y se caracteriza por altas concentraciones de herbicidas en áreas limitadas (De Wilde et al., 2007; Castillo et al., 2008), y ii) Contaminación de fuente difusa, que generalmente es causada por el uso de herbicidas en prácticas agrícolas, y se caracteriza por bajas concentraciones de compuestos en grandes áreas (Carter, 2000; Vonberg et al., 2014; Ouyang et al., 2016). Los herbicidas aplicados alcanzan la capa superficial del suelo, la microbiológicamente activa donde tienen lugar los procesos de disipación. El ingrediente activo y/o sus metabolitos se mueven posteriormente hacia los siguientes

horizontes de suelo adsorbidos por las partículas del suelo o en solución, para luego alcanzar los cuerpos de agua a través de los sistemas de drenaje, escorrentía directa, lixiviación o flujo preferencial. Los efectos de la contaminación difusa dependen de la magnitud de los procesos de adsorción, movilidad y degradación que experimentan los herbicidas en la zona no saturada del suelo. Algunas investigaciones han puesto de manifiesto que la contaminación del agua causada por pesticidas de fuentes puntuales puede ser más grave que la de fuentes difusas (Fait et al., 2007, Castillo et al., 2008).

Una gran cantidad de estudios de monitorización en suelos y cuerpos de agua superficiales y subterráneos han demostrado la presencia de herbicidas en zonas agrícolas de distintos países en una amplia gama de concentraciones y en algunos casos, en concentraciones superiores al límite establecido por la legislación de la UE para pesticidas individuales en el agua potable ( $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y mezclas de pesticidas en el agua ( $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Zheng et al., 2016; Kapsi et al., 2019; Zambito Marsala et al., 2020). En España, varios estudios señalan su presencia cada vez más frecuente y abundante en las aguas superficiales y subterráneas o en suelos, sobre todo como consecuencia directa de las actividades agrícolas (Pose–Juan et al. 2015a; Ccanccapa et al., 2016; Herrero–Hernández et al., 2013, 2017, 2020, Köck–Schulmeyer et al., 2019). El aumento en la detección de herbicidas en las aguas subterráneas se puede atribuir al desarrollo de métodos de análisis y extracción más sensibles que determinan concentraciones cada vez más bajas de estos compuestos, a la elaboración de nuevos herbicidas más fácilmente degradables a metabolitos con mayor capacidad de lixiviación que sus compuestos parentales, al incremento de su utilización en la agricultura o a la introducción de nuevas prácticas agrícolas que podrían modificar su comportamiento en el suelo, por ejemplo, la aplicación de residuos orgánicos como enmiendas orgánicas (Herrero–Hernández et al., 2011).

La búsqueda de estrategias adecuadas para optimizar la sostenibilidad ambiental agrícola mediante la maximización de la productividad de los cultivos y la reducción o prevención de la contaminación del suelo y el agua por pesticidas, se ha abordado ampliamente en los últimos años. Algunas de estas estrategias se desarrollan para controlar especialmente las fuentes puntuales de contaminación del agua por pesticidas debido a un manejo incorrecto de estos compuestos (Marín–Benito et al., 2018a; Dias et al., 2020), y se basan en la preparación de zonas adsorbentes mediante la aplicación *in situ* de residuos orgánicos naturales o modificados, con alto contenido de materia

orgánica (MO) (Marín–Benito et al., 2018b). Este método de bajo coste es una práctica agrícola común en diversos países, y puede ser utilizado también en suelos contaminados con pesticidas, ya que puede controlar la inmovilización de estos compuestos en el suelo, favoreciendo su posterior biodegradación al prevenir o reducir su movilidad potencial hacia los recursos hídricos y organismos vivos (Gupta et al., 2009; Marín–Benito et al., 2016; Chen et al., 2018).

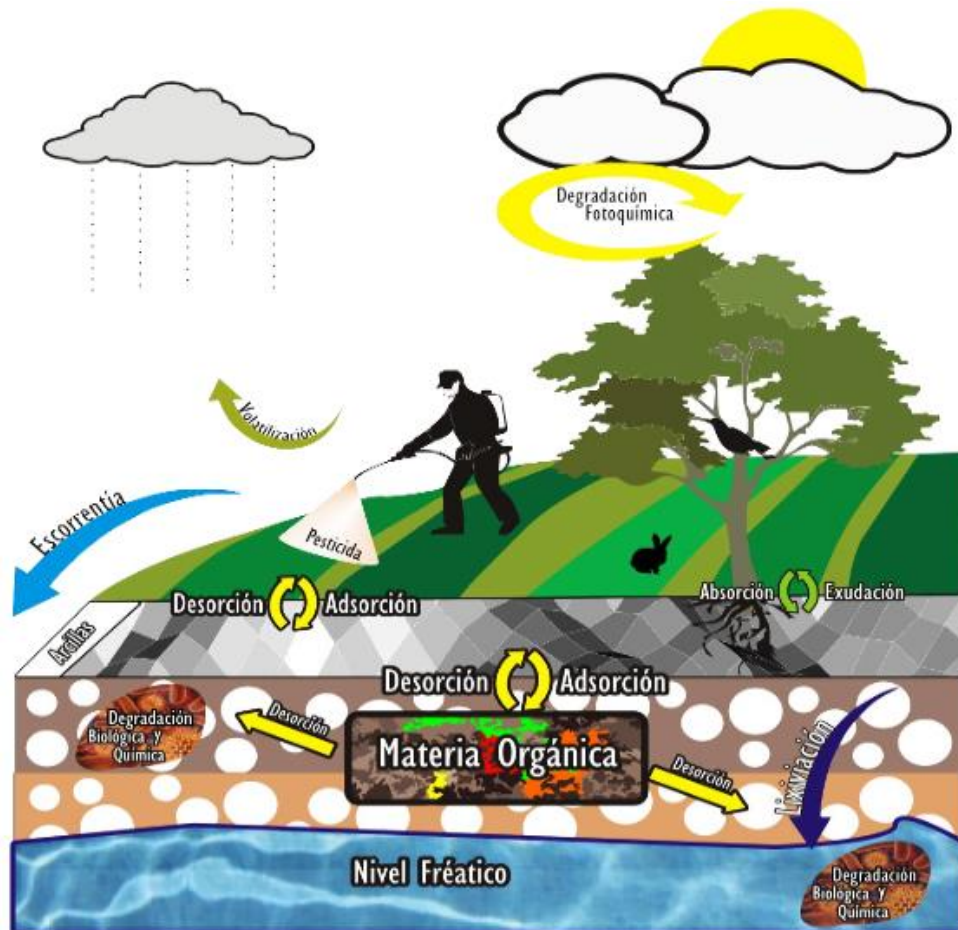
## 2.2 Dinámica de los herbicidas en los suelos

Los procesos que gobiernan el comportamiento y destino medioambiental de los herbicidas en el suelo se clasifican en tres grupos: **procesos de acumulación**, de **eliminación** y de **movimiento**. Estos procesos habitualmente no ocurren de modo aislado sino simultáneo, y dependen de las propiedades fisicoquímicas del suelo, de los herbicidas, y de los factores del medio (Chaplain et al., 2011; Khan, 2016).

Los **procesos de acumulación** suponen el paso del herbicida entre dos medios sin experimentar transformación química, por tanto, el herbicida mantiene su función original. Dentro de este grupo se incluyen los procesos de adsorción–desorción. Los **procesos de eliminación** son procesos fotoquímicos, químicos o biológicos que suponen una transformación del herbicida, resultando en compuestos con diferente función, toxicidad y comportamiento que los originales. Dentro de estos procesos se incluye el proceso de degradación. Los **procesos de movimiento** suponen un desplazamiento del herbicida respecto a su posición inicial sin sufrir ninguna transformación química. Dentro de estos procesos se incluyen los procesos de lixiviación, escorrentía y volatilización (**Figura 5**).

La dinámica de los herbicidas en el suelo está condicionada por una gran variedad de factores físicos, químicos y biológicos, que afectan a los procesos de adsorción–desorción, solubilización, volatilización, degradación química y biológica, absorción por las plantas, lixiviación y escorrentía. Estos procesos controlan directamente la persistencia y transporte de los herbicidas en el suelo, y posteriormente al agua, aire, plantas y alimentos, así como su impacto en organismos no diana. El herbicida entra, por tanto, en un ecosistema dinámico en el cual puede moverse desde el sistema inicial a otros sistemas o permanecer en el lugar con su estructura original intacta o degradada en mayor o menor medida en función del tiempo. Los procesos de adsorción y degradación se

consideran clave debido a que condicionan a los demás procesos que ocurren en el suelo, pueden informarnos de la eficacia que tendrá la aplicación del herbicida en el suelo y analizar si existe una posible contaminación de las aguas subterráneas (Farha et al., 2016; Marín–Benito et al., 2016).



**Figura 5.** Procesos que determinan la dinámica de los herbicidas en el suelo

### 2.2.1 Procesos de acumulación: adsorción–desorción de herbicidas en los suelos

La **adsorción** es un proceso fisicoquímico por el cual las moléculas de un soluto (adsorbato) – en este caso las moléculas del herbicida, son transportadas en fase acuosa, es decir, disueltas en agua hasta la superficie de un sólido poroso (adsorbente) – en este caso las partículas coloidales del suelo, que actúan como adsorbente y que a su vez están recubiertas por una fina película de agua (Khan 2016; Koskinen y Harper, 2018). Este proceso puede ser de naturaleza física (fisisorción), cuando el adsorbato se enlaza al adsorbente mediante fuerzas atractivas débiles (generalmente fuerzas de van der Waals), o de naturaleza química (quimisorción), si se une mediante un enlace químico (enlaces

covalentes, iónicos, de hidrógeno, entre otros) (Wu et al., 2019). Las propiedades fisicoquímicas del suelo que influyen en la adsorción son el contenido y naturaleza de la MO y minerales del suelo, pH, textura, capacidad de intercambio catiónico, y factores del medio como la humedad, temperatura y manejo del cultivo. En el proceso de adsorción influyen también las características de los compuestos orgánicos, en cuanto a su solubilidad en agua, persistencia, polaridad, tamaño molecular y características estructurales y químicas, así como la dosis de compuesto aplicada (Worrall et al., 2001). En especial, el proceso de adsorción está íntimamente relacionado con la estructura química del herbicida y su carácter hidrofóbico, y la superficie específica y tamaño de las partículas del suelo. En este sentido, la fracción coloidal del suelo, constituida por una fracción orgánica (MO) y una fracción inorgánica (minerales de arcilla), es la más activa en este proceso por su elevada superficie específica y presenta una mayor capacidad de retención de las moléculas del herbicida (Spuler et al., 2019).

Por otra parte, la **desorción** es el proceso mediante el cual el adsorbato es liberado de la superficie del adsorbente, es decir, el herbicida retenido en el suelo puede pasar de nuevo a la fase acuosa o gaseosa. El mecanismo de desorción del herbicida depende principalmente de la energía de adsorción. Cuanto mayor sea esta energía, más difícil será la desorción del herbicida de nuevo a la solución del suelo y viceversa. De modo que en función del equilibrio entre ambos procesos puede haber adsorción reversible o irreversible en mayor o menor grado, según se produzca una desorción total o parcial de las moléculas adsorbidas, respectivamente (Koskinen y Harper, 2018; Li et al., 2019).

Los procesos de adsorción–desorción además de determinar la cantidad de herbicida presente en la fase acuosa del suelo, influyen directa o indirectamente en los procesos implicados en la evolución de herbicidas (transporte, persistencia, volatilización y degradación) o en la magnitud y efecto de todos ellos al condicionar la cantidad de herbicida disponible en el suelo (Linn et al., 1993; Xie et al., 2021).

### **2.2.2 Procesos de eliminación: degradación de herbicidas en los suelos**

La degradación de un herbicida es el resultado de una serie de complejas transformaciones que provocan la mayor pérdida de compuesto tras su aplicación. Este proceso puede ocurrir mediante mecanismos abióticos (fotodegradación y degradación química) y bióticos (degradación microbiológica o biodegradación).



La **foto degradación** es el proceso por el cual el herbicida se degrada por la acción directa de la radiación solar sobre el compuesto presente en la superficie del suelo, y está condicionado por la duración, intensidad y el tiempo de exposición del espectro de luz ultravioleta de la luz solar sobre el herbicida, y sólo puede ocurrir en los primeros centímetros del suelo (desde 0.001 a 0.01 m), en la superficie de las plantas y en los cursos de agua superficial (Garrido et al., 2019; Aliste et al., 2021).

La **degradación química** ocurre a través de distintas reacciones químicas (oxidación–reducción, ionización, hidrólisis, entre otros) de los herbicidas sobre las superficies de arcillas, óxidos metálicos, sustancias húmicas y materiales orgánicos diversos presentes en el suelo que se comportan como catalizadores (Wolfe et al., 1990). El pH juega un papel clave en estos procesos químicos (Bending et al., 2006). Este tipo de degradación tiene menos relevancia ambiental que la biodegradación (con excepción de algunos casos), ya que la velocidad de reacción es más lenta por la competición de los oxidantes por la MO presente en el suelo. Sin embargo, es difícil distinguir entre estos dos procesos. Para hacerlo hay que eliminar los microorganismos del suelo mediante técnicas de radiación o esterilización adecuadas (Wolfe et al., 1990).

La **degradación microbiológica** de herbicidas es llevada a cabo principalmente a través de hongos y bacterias, entre otros microorganismos del suelo, que obtienen alimento y energía para su crecimiento por descomposición de estos compuestos orgánicos, especialmente cuando carecen de otras fuentes. La biodegradación es considerada la principal vía de eliminación de herbicidas en el suelo (Bending et al., 2006), pues se estima que un solo gramo de suelo contiene más de cien millones de bacterias (entre 5000 y 7000 especies) y alrededor de diez mil individuos de colonias de hongos (Gavrilescu, 2005). La biodegradación del herbicida está condicionada por el grado de similitud de la estructura química del compuesto con los sustratos orgánicos naturales que metabolizan las poblaciones microbianas del suelo. Los principales factores que afectan a la degradación de herbicidas en el suelo incluyen diferentes elementos ambientales (tipo de suelo, MO, clima, temperatura, riego), formulación de herbicidas (compuestos individuales o combinados) y método de aplicación (aplicación única o repetida) (Arias–Estévez et al., 2008; Ortiz–Hernández et al., 2013).

La biodegradación puede ocurrir de distintas maneras dependiendo de la velocidad del proceso: i) la biodegradación es inmediata y los compuestos son fácilmente utilizados

como fuente de energía y crecimiento, ii) la biodegradación empieza lentamente, seguida de un proceso de aclimatación y luego se produce una biodegradación rápida, y iii) la biodegradación es muy lenta o no se produce, considerando al compuesto como persistente frente a la degradación microbiana. Por tanto, la actividad microbiana puede ser rápida (horas) o muy lenta (años) (Gavrilescu, 2005; Bose et al., 2021).

La MO del suelo desempeña un papel fundamental en la degradación de los herbicidas. Sin embargo, no está uniformemente distribuida en el suelo, sino que decrece a medida que la profundidad del suelo incrementa. Por esta razón, una vez que los herbicidas traspasan la capa superficial del suelo (la más activa biológicamente), su porcentaje de degradación se reduce significativamente, con valores de velocidad de degradación de 5 a 20 veces menores que en los primeros centímetros del suelo (Rodríguez-Cruz et al., 2006).

Otro factor a tener en cuenta en la degradación de los herbicidas es la aplicación repetida de estos compuestos al mismo cultivo durante un período prolongado, que es una práctica agrícola común que puede influir en la disipación de herbicidas acelerando la biodegradación por microorganismos del suelo adaptados, lo que puede reducir o incluso eliminar la eficacia del herbicida para controlar las malas hierbas (Fang et al., 2015; Marín-Benito et al., 2018a; Pose-Juan et al., 2018).

La biodegradación puede o no afectar considerablemente a las propiedades químicas o toxicológicas del herbicida mediante el metabolismo y catabolismo microbiano, hasta transformarlo en otros compuestos químicos denominados metabolitos, los cuales pueden ser más peligrosos que el compuesto original (mayor toxicidad, movilidad, tiempo de vida media, bioacumulación), o pueden ocurrir procesos de mineralización que degradan el herbicida a moléculas más simples como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{Cl}^-$ , etc. (Aksu, 2005).

### **2.2.3 Procesos de movimiento: lixiviación, escorrentía, volatilización y absorción por plantas de herbicidas en los suelos**

La **lixiviación** es el movimiento vertical de los herbicidas a través del perfil del suelo como resultado de su disolución en el agua de lluvia o del riego de los cultivos. Tiene lugar cuando los aportes de agua exceden a las pérdidas por evapotranspiración y el contenido en agua del suelo excede la capacidad de campo (Katagi, 2013). Este proceso

es considerado el principal responsable de la contaminación de las aguas subterráneas por herbicidas (Carter, 2000). La lixiviación de los herbicidas depende de las propiedades fisicoquímicas del suelo (textura, permeabilidad, densidad del suelo, contenido de MO y arcilla, etc.) y de los herbicidas (especialmente, solubilidad en agua), del método, rango, emplazamiento y tiempo de aplicación del herbicida, de las condiciones medioambientales y de la velocidad de degradación. Además, cualquier factor que altere la actividad microbiológica, como la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, o variaciones de temperatura y humedad, influye en la biodegradación del suelo y, por tanto, modifica el tiempo de permanencia del herbicida y su tendencia a ser lixiviado (Navarro et al., 2007). El potencial de lixiviación de los herbicidas generalmente se ve favorecido por su alta solubilidad en agua, larga persistencia y bajo coeficiente de adsorción (Kerle et al. 2007; PPDB, 2021).

El factor más influyente en la lixiviación es el grado de adsorción de los herbicidas con las partículas de suelo. En general, en suelos con alto contenido en MO hay mayor adsorción de herbicidas y menor disponibilidad de los mismos para su lixiviación (Garrido et al., 2015). Además, herbicidas con alta solubilidad en agua se mueven más rápido y mejor a través del suelo (principalmente en suelos permeables), mientras que un herbicida susceptible a degradarse rápidamente, al permanecer en el suelo durante poco tiempo tiene menos probabilidad de lixiviar. Se ha indicado que menos del 0.1% y el 1% de la cantidad anual de herbicidas se pierden por lixiviación, pudiendo alcanzar el 5% dependiendo de la frecuencia de precipitaciones en el medio (Flury, 1996).

Este proceso está asociado a dos fenómenos (Cohen et al., 1995): i) Flujo preferencial, que permite el movimiento rápido de las moléculas de herbicidas en el agua a través de los macroporos del suelo (fracturas, galerías creadas por gusanos y lombrices, canales radiculares), favoreciendo el movimiento vertical del herbicida en el suelo, y ii) Flujo matricial, que permite el movimiento lento de las moléculas de herbicidas en el agua a través de los microporos del suelo y por tanto, mayor tiempo de contacto con las partículas del mismo, favoreciendo la difusión en el medio y el movimiento lateral del herbicida en el suelo. En muchos suelos la presencia de macroporos incrementa la lixiviación de herbicidas a las aguas subterráneas ya que, al aumentar la velocidad de drenaje del agua, los herbicidas reducen su contacto con el suelo, impidiendo los mecanismos naturales de eliminación (Cullum, 2009; Willkommen et al., 2021).

Por otro lado, la **escorrentía** ocurre cuando el agua aplicada a un suelo (por fuertes precipitaciones o por una excesiva irrigación) excede la capacidad de infiltración del mismo. Este proceso es considerado el principal responsable de la contaminación de las aguas superficiales. Los herbicidas son transportados superficialmente, disueltos en agua o por arrastre de partículas coloidales de suelo a las que se encuentran adsorbidos, desde las parcelas agrícolas hasta las aguas superficiales que son contaminadas (Navarro et al., 2007). Está condicionada por distintos factores como son la pendiente y estabilidad estructural del suelo, la formulación del herbicida y el tiempo desde su aplicación, la presencia de cubierta vegetal, la intensidad de lluvia, las características fisicoquímicas del compuesto y su grado de adsorción (Cohen et al., 1995). Generalmente, las pérdidas de herbicidas por escorrentía no superan el 2% de la masa aplicada (Carter, 2000).

La **volatilización** es el proceso mediante el cual hay pérdida de herbicidas desde las plantas, suelo o agua superficial en fase gaseosa, es decir, en forma de vapor. En este proceso influyen la volatilidad del propio herbicida, el método de aplicación y las condiciones climáticas al aplicarse el herbicida (Bedos et al., 2002; 2017). Todos los compuestos orgánicos son volátiles en algún grado dependiendo de su presión de vapor, del estado físico en que se encuentren y de la temperatura ambiente. Las mayores pérdidas por volatilización se producen en el periodo inmediatamente posterior a la aplicación del herbicida (Gavrilescu, 2005).

La **absorción por parte de las plantas** es otra de las vías de pérdida de herbicidas del suelo, e implica o no su introducción en la cadena trófica. Este proceso depende de factores relacionados con el metabolismo y naturaleza de las plantas, así como de la bioaccesibilidad del herbicida. La absorción por el sistema radicular de las plantas ocurre si el herbicida es relativamente soluble en agua y tiene cierto grado de lipofilia. La absorción de herbicidas volatilizados a través de las hojas de las plantas también puede tener lugar y, en algunos casos, puede ser más importante que la absorción radicular (Juraske et al., 2009).

## **2.3 Residuos orgánicos**

### **2.3.1 Producción, problemática ambiental y uso como enmienda en agricultura**

El manejo de diversos residuos orgánicos provenientes de actividades ganaderas, urbanas, agrícolas e industriales es en la actualidad un tema de interés ambiental y social

en muchos países, debido a los problemas de disposición, emisión y lixiviación que pueden generar. El crecimiento en la UE sigue generando una cantidad creciente de residuos que provoca pérdidas innecesarias de materiales y energía, daños medioambientales y efectos negativos sobre la salud y la calidad de vida. Los vertederos ocupan áreas de diferente extensión y pueden contaminar el aire, el agua y el suelo, mientras que la incineración puede generar emisiones de contaminantes atmosféricos (Dickerson, 2000).

Los residuos orgánicos de origen animal o vegetal suponen aproximadamente el 80% del total de residuos generados en países desarrollados. La intensificación del sector agrícola ha incrementado considerablemente la generación de estos residuos, en alrededor de 415 millones t/año en la UE (EEA, 2021). Según la European Compost Network (ECN), aproximadamente entre 118 y 138 millones t de biorresiduos surgen anualmente en la UE, de los cuales sólo alrededor del 40% (equivalente a 47.5 millones t/año) es reciclado eficientemente en abono y compost de alta calidad, siendo el compostaje el proceso de tratamiento predominante (ECN, 2020).

Según el Instituto Nacional de Estadística (INE), la economía española generó 137.8 millones de toneladas de residuos en 2018, un 4.3% más que en 2017. De esta cifra, 3.2 millones correspondieron a residuos peligrosos (un 0.3% menos que en el año anterior) y 134.6 millones a residuos no peligrosos (un 4.4% más). Las categorías de residuos generados más relevantes fueron residuos minerales (72.3 millones), residuos mezclados (37.8 millones) y residuos de animales y vegetales (9.2 millones). El 38.7% de los residuos tratados (47.24 millones), se destinaron al reciclado, un 5.2% más en tasa anual (INE, 2020).

Por otra parte, el aumento de la superficie destinada a la producción de cultivos a nivel mundial, y otros factores como el uso intensivo de pesticidas, de recursos hídricos y de maquinaria agrícola en la agricultura han acelerado la degradación del suelo en los últimos años, alterando sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas (Vimal et al., 2017). De hecho, aproximadamente el 45% de las capas superficiales de suelo europeas (0–30 cm) se caracterizan por un bajo contenido de MO (< 3.5%), y principalmente, la de los suelos de las regiones mediterráneas son muy susceptibles a su pérdida, donde casi el 75% de los suelos tienen un contenido de MO bajo ( $\leq 2\%$ ) o muy bajo ( $\leq 1\%$ ) (Martínez–Blanco et al., 2013). En el caso específico de España, más del 50% de las tierras agrícolas

tienen un contenido de MO inferior al 1.7%, la concentración mínima para considerar un suelo en riesgo de desertificación y con tendencia a la degradación (Rodríguez et al., 2009).

De acuerdo con lo anterior, la aplicación de residuos orgánicos como enmiendas del suelo constituye hoy día una práctica común y extendida en la agricultura moderna y en procesos de remediación del suelo. Se utiliza como reemplazo o complemento de fertilizante comercial produciendo muchos beneficios sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo, conservando la salud y productividad del mismo, ayuda a reducir la dependencia de los agroquímicos y además, representa una alternativa ecológica, económica y socialmente aceptable a la eliminación e incineración de los desechos orgánicos en vertederos (Dickerson, 2000; Medina et al., 2012; Sánchez–Monedero et al., 2019).

Hoy en día, esta práctica agronómica se está incrementando en Europa, Estados Unidos y muchos otros países. Entre los residuos orgánicos potencialmente aplicables al suelo se encuentran los de las actividades urbanas (lodos de depuradora o residuos sólidos urbanos), agrícolas (residuos de cultivos), ganaderas (estiércol y purines) y agroindustriales (producción de vino, cerveza y olivo, y cultivo de hongos) (Goss et al., 2013; Marín–Benito et al., 2016; Anton–Herrero et al., 2021).

La aplicación de estos residuos orgánicos al suelo es una práctica agrícola cada vez más común debido a sus bajos costes y a los beneficios conocidos para la fertilidad del suelo en términos de MO y enriquecimiento con macro– y micronutrientes, que contribuye en gran medida al funcionamiento del suelo a largo plazo (Eden et al., 2017). Las enmiendas orgánicas pueden modificar también el pH del suelo y mejorar la capacidad de intercambio catiónico, influyendo indirectamente en la disponibilidad de nutrientes y en la actividad microbiana. Además, influyen en las propiedades físicas del suelo, mejorando su estructura al aumentar la estabilidad de agregados del suelo y la macroporosidad, lo cual reduce la densidad aparente, y favorece una correcta aireación y retención de humedad del suelo, la capacidad exploratoria de los sistemas de raíces de las plantas y el desarrollo de un espacio habitable para las comunidades microbianas. Esto a su vez modifica las propiedades hidráulicas del suelo, con un aumento en las tasas de infiltración de agua. Esta práctica es considerada además como una forma de secuestrar carbono y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (Urrea et al., 2019).

En los procesos ambientales, la adición de MO ejerce un papel importante en el

destino de compuestos xenobióticos, como son los herbicidas (Barriuso et al., 1997; Kodesova et al., 2012; Pose–Juan et al., 2018; Mendes et al., 2019; Wu et al., 2019). Sin embargo, la MO sólida y líquida de estas enmiendas orgánicas, dependiendo de su naturaleza y composición, puede modificar el comportamiento fisicoquímico de los pesticidas en los suelos, definiendo su eficiencia, y disipación o persistencia como potenciales contaminantes ambientales del suelo y de las aguas superficiales y subterráneas (Briceño et al., 2007, Thevenot et al., 2009; Marín–Benito et al., 2016, 2021).

### 2.3.2 Sustrato postcultivo de hongos

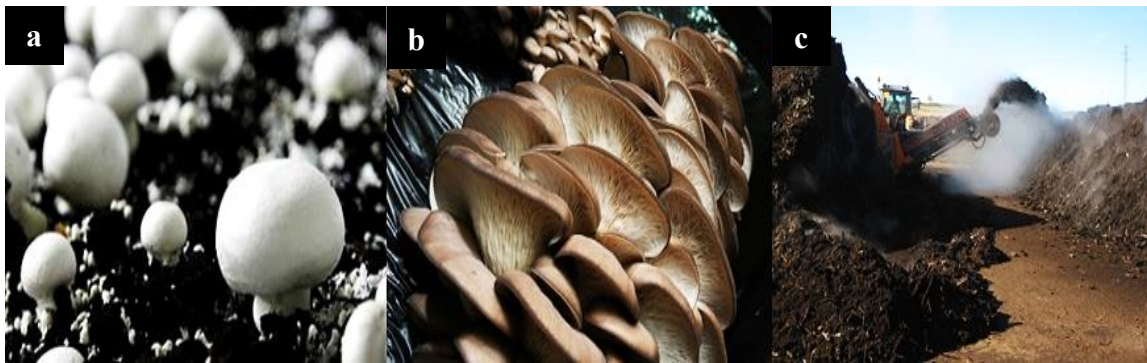
#### 2.3.2.1 Producción del cultivo del champiñón y setas

El 70% de la producción mundial de hongos comprende a los grupos *Agaricus bisporus* (champiñón de París), *Pleurotus ostreatus* (seta de ostra) y *Lentinula edodes* (shiitake), y el 30% restante de hongos abarca aproximadamente a una docena de especies. El champiñón es la especie de hongo comestible más cultivada en el mundo y la más importante desde el punto de vista económico. En Europa, la producción de *Agaricus bisporus* representa el 90% de la producción total de hongos, con una producción de 1320000 t en el 2019 (FAO, 2021).

Actualmente, España ocupa el cuarto lugar como país productor europeo de hongos cultivados (por detrás de Holanda, Polonia y Francia) y el sexto lugar a nivel mundial, con una producción estimada de 120000 t anuales de champiñón que corresponden aproximadamente a unos 4400000 m<sup>2</sup> de cultivo, y que representa el 10% de la producción total europea (MAPA, 2021). Existen dos zonas de producción bien diferenciadas, la zona de la Rioja y Castilla la Mancha, con prácticamente un 90 % de la producción de champiñón, 10% de la seta de ostra y 0.5% de la seta shiitake. Se calcula que La Rioja cultiva cada año unas 72000 t de champiñón, lo que supone el 60% de la producción nacional. Por otra parte, la producción de otras setas es mucho menor que la producción de champiñón, siendo la de mayor importancia *Pleurotus ostreatus*. La Rioja cultiva unas 5000 t de setas de ostra al año, lo que supone el 10% de la producción riojana de hongos (CTICH, 2021).

### 2.3.2.2 Problemática medioambiental de la generación de sustrato postcultivo de hongos

El sustrato postcultivo de hongos (SMS) hace referencia al residuo orgánico generado después del ciclo productivo del cultivo de hongos (en este caso de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*) y su posterior compostaje. El SMS es un compuesto heterogéneo que incluye el material de compostaje inicial utilizado como base en la producción de hongos, con un mayor o menor grado de desarrollo en función de la seta/hongo cultivados y el posterior proceso de alteración o compostaje que experimenta (Figura 6) (Marín–Benito et al., 2016).



**Figura 6.** a) *Agaricus bisporus* o “champiñón de París”, b) *Pleurotus ostreatus* o “seta de ostra”, y c) Sustrato postcultivo de hongos o “SMS”

La acumulación de SMS ha aumentado significativamente debido al incremento de la producción de hongos en China, EE.UU., Francia, Países Bajos, Polonia y España (FAO, 2021). En la producción de todas las especies de hongos quedan millones de toneladas de sustrato “gastado” que se acumulan sobre las cantidades almacenadas en años anteriores. Se estima que la producción de 1 kg de hongos genera 5 kg de SMS. Por lo tanto, si la producción española de champiñón se estima en 120000 t/año, la generación de SMS podría estimarse alrededor de 600000 t/año, y ascender a los 3.5 millones t/año en la UE (Marín–Benito et al., 2016). Si se comparan los datos de producción de champiñón con la producción de otras setas (12700 t/año) la cantidad total de residuos de sustrato postcultivo de otras setas podría estimarse en 63500 t/año. En consecuencia, el cultivo de hongos y el elevado volumen de sustrato postcultivo generado y acumulado año tras año se traduce en una importante problemática medioambiental. El SMS solía desecharse en vertederos contaminando el suelo y las aguas subterráneas por la



lixiviación de sales y carbono orgánico disuelto (COD). Sin embargo, el reciclaje, compostaje y revalorización de este material residual contribuye a resolver este problema medioambiental (Paredes et al., 2006; Medina et al., 2012).

El mayor porcentaje de la reutilización del SMS es como enmienda orgánica en agricultura (directamente o tras un proceso de recompostaje) para cultivos de invernadero, de campo abierto o la mejora de suelos en general. Para ello, tras su recepción desde las instalaciones de cultivo, se eliminan los plásticos y el gravillín, se descompone y madura en mesetas con volteos periódicos, se controla la temperatura, la humedad y el oxígeno, y se realiza un cribado. En función de este proceso sus características como enmiendas pueden alterarse (Paredes et al., 2006).

El SMS tiene un alto contenido en MO y humedad, una baja densidad aparente y altas concentraciones en macronutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, y especialmente calcio, a comparación con otros fertilizantes orgánicos, como los desechos urbanos y estiércol animal (Medina et al., 2012). Además, contiene enzimas residuales como proteasa, celulasa, hemicelulasa, lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa, y una baja carga de elementos tóxicos y ausencia de patógenos de las plantas (Paredes et al., 2006; García–Delgado et al., 2015). Se han realizado numerosos estudios donde se ha concluido positivamente sobre la efectividad del SMS como enmienda orgánica (Medina et al., 2012). Sin embargo, el alto contenido de sales minerales del SMS podría limitar su uso para el cultivo de plantas sensibles a la sal y su aplicación al suelo en áreas sensibles (Paredes et al., 2006).

### **2.3.3 Compost vegetal**

El compost vegetal (GC) hace referencia a todos los residuos vegetales tales como pasto cortado, hojas secas y ramas, material leñoso de poda, hierba, etc. que se generan como resultado del cultivo y mantenimiento de jardines, parques, espacios públicos (veredas), así como también por la conservación de paisajes, y que es sometido posteriormente a un proceso de compostaje (**Figura 7**). En España, su uso como fertilizante o enmienda orgánica del suelo está ampliamente extendido y ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años, generándose aproximadamente 573000 t de residuos vegetales de estas características en el año 2017 (STATISTA, 2021).



**Figura 7.** a) Residuos vegetales de jardinería y árboles, y b) Compost vegetal o “GC”

La generación de restos de poda y de jardinería se debe, mayoritariamente, a las actividades de mantenimiento de las zonas verdes de espacios públicos. Con la nueva tendencia urbanística enfocada hacia una mayor ratio de parques y jardines municipales por habitante, se ha incrementado progresivamente el volumen generado de estos restos. Su incorrecta gestión supone la pérdida de MO potencialmente valorizable en otros usos y un efecto negativo al ambiente al disponerlos en lugares inadecuados (el césped por su alto contenido de humedad y por su composición puede dar problemas de emisión de olores) y/o quemas. Varios países de América y Europa entre los que destacan Estados Unidos y España realizan prácticas de manejo de sus jardinerías transformando los residuos en MO aprovechable a través de los abonos o enmiendas (Pérez Méndez y Martínez Hernández, 2008; Eymar et al., 2009).

El reciclado de las podas y limpieza de parques y jardines a través del proceso de biodegradación aeróbica, conocido comúnmente como compostaje, permite la estabilización biológica de estos desechos vegetales biodegradables transformándolos en un material (compost) más seguro, estable y aprovechable como fuente potencial de carbono y nutrientes, y de acondicionador del suelo en aplicaciones agrícolas sin dañar al medio ambiente, disminuyendo la necesidad de fertilizantes inorgánicos e irrigación y reduciendo potencialmente la producción de metano por parte de los residuos (Benito et al., 2003).

El uso de compost vegetal es una alternativa económica y logísticamente viable para el reciclaje de estos residuos los cuales presentan una elevada cantidad de MO y carbono orgánico (CO) (> 15% en peso seco) (Marín-Benito et al., 2018c) aportado principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa, de modo que su relación C/N es alta.

Por tanto, se considera más estable que la MO proporcionada por otros residuos biodegradables, como los biosólidos o los lodos de depuradora (Lerch et al., 2019).

En España, se han realizado diversos estudios sobre residuos de jardinería donde se han evaluado los parámetros químicos y microbiológicos para la caracterización de la estabilidad y madurez de compostaje de residuos de poda, mostrando que los residuos de poda son aprovechables y cuentan con las características necesarias para la realización de un buen compost (Benito et al., 2003).

## **2.4 Efecto de los residuos orgánicos aplicados al suelo en el comportamiento de los herbicidas**

### **2.4.1 Efecto sobre la adsorción–desorción de herbicidas**

La aplicación combinada de herbicidas y residuos orgánicos modifica el comportamiento fisicoquímico de los agroquímicos aplicados a los suelos, principalmente a través de su adsorción–desorción, el cual es uno de los procesos dominantes que determina, directa o indirectamente, la disponibilidad de los herbicidas y su destino medioambiental en el ecosistema suelo–agua (Marín–Benito et al., 2016; Fernández et al., 2019). En consecuencia, una débil adsorción o una amplia desorción de herbicidas promueven la lixiviación, la escorrentía, la volatilización, la biodegradación e incluso los impactos ecotoxicológicos en los organismos no objetivo (incluidos los seres humanos). Por el contrario, una fuerte adsorción previene las pérdidas de herbicidas por tales procesos, convirtiéndose en una técnica eficaz para prevenir la contaminación difusa y/o puntual del agua (Jiang et al., 2016).

El uso de materiales adsorbentes de bajo coste para estos fines ha llevado a estudiar desde hace algunos años la capacidad de adsorción de diferentes residuos orgánicos como posibles adsorbentes para muchos herbicidas, considerando que el CO es el factor más relevante que influye en el proceso de adsorción y la afinidad de herbicidas hidrofóbicos por estos materiales orgánicos (Gupta et al., 2009; Zolgharnein et al., 2011; Pose–Juan et al., 2018). La aplicación de enmiendas orgánicas conduce generalmente a la inmovilización de los herbicidas en el suelo, lo que podría potenciar la posterior transformación/degradación química, física y/o biológica del herbicida, disminuyendo su transporte en el perfil del suelo y, en consecuencia, la contaminación de las aguas (Herrero–Hernández et al., 2011), aunque también podría afectar la concentración final

biodisponible del herbicida para su absorción por las malas hierbas a las que va destinado (Barriuso et al., 1997). Por tanto, los procesos de adsorción y desorción ayudan a comprender cómo predecir la movilidad y disponibilidad de los herbicidas en los suelos.

Por otro lado, la naturaleza y composición de la MO de las enmiendas es variable, con la consecuente dificultad de predecir su eficiencia para adsorber herbicidas u otros contaminantes (Barriuso et al., 1997). La aplicación de enmiendas orgánicas a los suelos introduce no solo materia orgánica sólida (MOS) sino materia orgánica disuelta (MOD), aunque la proporción de MOD en el suelo suele ser muy pequeña. La MOD es una mezcla de compuestos diversos y complejos con diferentes estructuras químicas y pesos moleculares que pueden realizar múltiples interacciones con contaminantes orgánicos, controlando su distribución en los suelos (Barriuso et al., 2011; Marín–Benito et al., 2012).

Muchas referencias informan de la capacidad de las enmiendas orgánicas para adsorber herbicidas, y generalmente se estudian en condiciones de laboratorio (Deng et al., 2017; Mendes et al., 2019; Wu et al., 2019; García–Delgado et al., 2020), y pocos en condiciones reales de campo (Marín–Benito et al., 2018a, c; Petter et al., 2019).

### ***Modelización de la adsorción–desorción de los herbicidas en los suelos***

Existen varios modelos para la interpretación de los resultados experimentales de las isothermas de adsorción siendo los más utilizados aquellos descritos por Freundlich (1909) para describir la adsorción de compuestos en una superficie heterogénea (Calvet, 1989). Generalmente, las isothermas experimentales de adsorción de pesticidas por suelos o por sus componentes coloidales, arcilla y MO, se ajustan bien a la ecuación empírica de Freundlich, dada por la siguiente expresión:  $C_s = K_f C_e^{n_f}$  donde  $C_s$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) es la cantidad de pesticida adsorbido por unidad de masa de adsorbente,  $C_e$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) es la concentración de equilibrio del pesticida en solución, y  $K_f$  ( $\mu\text{g}^{1-n_f} \text{mL}^{n_f} \text{g}^{-1}$ ) y  $n_f$  son dos constantes características de la capacidad de adsorción del pesticida por el suelo. Los valores de estas dos constantes se calculan a partir de la forma lineal de esta ecuación, dada por la siguiente expresión:  $\log C_s = \log K_f + n_f \log C_e$ .

La constante  $n_f$  representa la variación de la adsorción con la concentración (curvatura de la isoterma). Por otro lado,  $K_f$  es la cantidad de pesticida adsorbido para

una concentración de equilibrio igual a la unidad ( $C_e = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y representa la adsorción a bajo nivel de concentración. Para conocer la adsorción a un nivel de concentración mayor, se calcula el coeficiente de distribución,  $K_d$  ( $\text{mL g}^{-1}$ ), por la siguiente expresión:  $K_d = \frac{C_s}{C_e}$  que mide la relación entre la concentración del pesticida en el suelo y en solución en condiciones de equilibrio para una concentración de equilibrio determinada. Estos parámetros son utilizados normalmente para comparar la capacidad de adsorción de un adsorbente por un adsorbato.

La desorción de un pesticida previamente adsorbido por un suelo se estudia a través de una serie de lavados sucesivos del suelo con agua y midiendo la concentración de pesticida en la solución de equilibrio. El modelo de Freundlich es válido para la interpretación de los resultados experimentales del proceso de desorción bajo la forma de la expresión:  $C_s = K_{fd} C_e^{n_{fd}}$  donde  $C_s$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) es la cantidad de pesticida que queda adsorbido por unidad de masa de adsorbente después de cada desorción,  $C_e$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) es la concentración de equilibrio del pesticida en la solución, y  $K_{fd}$  ( $\mu\text{g}^{1-n_{fd}} \text{mL}^{n_{fd}} \text{g}^{-1}$ ) y  $n_{fd}$  son dos constantes características del proceso de desorción del pesticida por el suelo. De modo análogo al proceso de adsorción, los valores de estas dos constantes se determinan a partir de la forma lineal de esta ecuación, dada por la siguiente expresión:  $\log C_s = \log K_{fd} + n_{fd} \log C_e$ . La interacción entre un pesticida y el suelo no siempre ocurre mediante enlaces débiles o reversibles, sino que pueden quedar retenidos mediante enlaces fuertes e irreversibles que impiden que la desorción sea completa. Cuando los datos de desorción no coinciden con los de la isoterma de adsorción, las isotermas obtenidas muestran histéresis de la desorción en mayor o menor grado (Essington, 2004).

#### **2.4.2 Efecto sobre la degradación / disipación / persistencia de herbicidas**

Las enmiendas orgánicas tienen un impacto importante en la disipación de herbicidas, afectando sus procesos de adsorción y transporte, y consecuentemente, su degradación y persistencia (Thevenot et al., 2009). En general, la aplicación de las enmiendas orgánicas al suelo favorece la adsorción de herbicidas, disminuyendo su biodisponibilidad para la degradación por microorganismos del suelo y la velocidad a la que se degradan (Barriuso et al., 1997). Por otro lado, la MO, los nutrientes y los microorganismos de la propia enmienda pueden modificar la actividad de las comunidades microbianas del suelo, y la estimulación de la actividad microbiana puede

incrementar la biodegradación de los herbicidas (Karanasios et al. 2010). De hecho, la mayoría de los residuos orgánicos permiten el crecimiento de hongos que producen enzimas ligninolíticas extracelulares que promueven la degradación de los herbicidas (Castillo y Torstensson, 2007) y, en consecuencia, impiden su transporte a aguas superficiales y subterráneas.

Además, el COD aportado por los residuos orgánicos puede afectar potencialmente a la cinética de degradación y mineralización de los herbicidas de distintas formas: el COD puede aumentar la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos formando complejos herbicida-COD estables en solución, disminuyendo así su adsorción y mejorando su biodisponibilidad, y por tanto, su degradación. Al contrario, el COD también puede aumentar la adsorción de herbicidas, debido a interacciones herbicida-COD-suelo, disminuyendo su biodisponibilidad y su degradación (Li et al., 2005; Briceño et al., 2007; Barriuso et al., 2011). La influencia del COD en la biodegradación de herbicidas depende de su naturaleza y concentración, y del tipo de suelo y características del herbicida (Li et al., 2005).

Numerosos estudios han evaluado el efecto de la aplicación de residuos orgánicos sobre la disipación y biodisponibilidad de herbicidas en suelos enmendados bajo condiciones de laboratorio (Pose-Juan et al., 2018; Rodríguez-Cruz et al., 2019; Yavari et al., 2019; Marín-Benito et al. 2021). Sin embargo, los estudios dentro de este contexto llevados a cabo a escala de campo son más escasos (Marín-Benito et al., 2018a, c; Carretta et al., 2019; Li et al., 2019). En relación a los efectos, en algunos casos, las enmiendas orgánicas han provocado una disminución de la vida media de los herbicidas, mientras que en otros casos se ha observado un incremento de esta o incluso no han provocado ningún efecto (Hussain et al., 2015). Estos estudios que evalúan la cinética de degradación de herbicidas, independientemente de la escala a la que se realicen, son indispensables para caracterizar la concentración remanente de los agroquímicos con el tiempo y evaluar la persistencia de los herbicidas aplicados en el campo, su destino medioambiental y sus potenciales amenazas a las especies expuestas (FOCUS, 2000).

### ***Modelización de las cinéticas de degradación de los herbicidas en los suelos***

El conocimiento de la cinética de degradación de un herbicida y el efecto de todos los factores combinados que afectan a este proceso es necesario para determinar la

persistencia de estos compuestos en los suelos. La evaluación de la cinética de degradación se lleva a cabo a partir de la determinación de la concentración remanente del compuesto químico en el suelo bajo condiciones reales de humedad y temperatura en el campo a distintos tiempos de muestreo, o tras un proceso de incubación a temperatura y humedad controlada en el laboratorio. La representación de la concentración remanente, expresada generalmente como porcentaje de la cantidad de herbicida aplicada inicialmente al suelo, frente al tiempo, permite determinar los parámetros cinéticos de la degradación del herbicida mediante el ajuste de los resultados experimentales a ecuaciones matemáticas adecuadas (FOCUS, 2006). Estos parámetros son la constante de velocidad de degradación ( $k$ ) y tiempo de vida media ( $DT_{50}$ ) o el  $DT_{90}$ , que se refieren al tiempo (expresado en días) que tarda el herbicida en disiparse al 50% o 90%, respectivamente, de su concentración inicial en el suelo bajo unas determinadas condiciones de incubación.

Para obtener estos parámetros, se usa frecuentemente la guía FOCUS (FORum for the Coordination of pesticide fate models and their USE), del grupo de expertos en el cálculo de las cinéticas de degradación necesarias para el proceso europeo de autorización de pesticidas. Los principales tipos de cinéticas que se detallan en FOCUS (2006) son: el modelo de primer orden, varios modelos que pueden describir la cinética de degradación bifásica y dos modelos para describir patrones de degradación con periodo de latencia. La persistencia de un pesticida en el suelo puede estimarse con los parámetros cinéticos descritos anteriormente.

El **modelo cinético de primer orden o SFO** (Single First Order) supone que el número de moléculas de herbicida es pequeño en relación al número de microorganismos y enzimas capaces de degradarlo, o el número de moléculas de agua en el caso de la hidrólisis. Como resultado, la velocidad de cambio en la concentración del herbicida ( $dC/dt$ ) a cualquier tiempo es directamente proporcional a la concentración presente del mismo que queda en el sistema, dado que los demás componentes están en exceso. El tiempo para que la concentración disminuya en una cierta proporción es constante a lo largo del experimento e independiente de la concentración inicial del herbicida. Este modelo cinético se da en ausencia de crecimiento microbiano ya que se asume que no hay limitación en los microorganismos degradadores, y supone que la mineralización está limitada a una cantidad máxima que dependerá del tipo de herbicida y de suelo.

Este modelo de primer orden está definido por una ecuación exponencial simple con sólo dos parámetros:  $\frac{dC}{dt} = -kC$  siendo la forma integrada de la ecuación:  $C = C_0 e^{-kt}$  donde  $C$  es la concentración de herbicida a tiempo  $t$ ,  $C_0$  es la concentración inicial de pesticida a  $t = 0$  y  $k$  es la velocidad de disipación. El valor de  $DT_{50}$  se calcula con la ecuación:  $DT_{50} = \frac{\ln 2}{k}$ .

Por otra parte, las **cinéticas bifásicas** proponen una degradación inicial rápida en las concentraciones de pesticida, seguida de una disminución sustancial (más lenta), induciendo a que los residuos permanezcan en el suelo por períodos de tiempo elevados. En experimentos bajo condiciones de laboratorio, esto puede deberse al envejecimiento de los residuos, una adsorción no lineal, o a la reducción de microorganismos; mientras que en ensayos bajo condiciones reales de campo, puede ser debido a las variaciones espaciales en la parcela experimental y a los cambios en las condiciones meteorológicas. Los herbicidas se distribuyen entre la fase sólida y la líquida del suelo, y es esta partición la que caracteriza un comportamiento bifásico de la degradación, y que sólo está disponible para degradarse la fracción de herbicida en la disolución del suelo. Esta fracción disponible disminuye con el tiempo ya que la adsorción y los procesos de difusión se hacen más lentos, y en consecuencia, disminuye su degradación con el tiempo. En general, las ecuaciones bifásicas se ajustan mejor a los datos observados que las de primer orden.

Existen un gran número de modelos bifásicos, entre ellos, el propuesto por Gustafson y Holden (1990): el modelo cinético de **primer orden multi-compartimental o FOMC** (First-Order Multi-Compartment model) que indica que el suelo es un medio heterogéneo con un grado de degradación variable, siendo poco probable que la degradación se produzca de la misma forma y a la misma velocidad en sus diferentes compartimentos, entendiéndose a la división del suelo como un gran número de compartimentos no conectados, cada uno de los cuales presenta una velocidad de degradación de primer orden del sustrato distinta.

El modelo de primer orden multi-compartimental está definido por una ecuación diferencial con sólo tres parámetros con un comportamiento bifásico de degradación del pesticida en el suelo:  $\frac{dC}{dt} = -\frac{\alpha}{\beta} C \left( \frac{t}{\beta} + 1 \right)^{-1}$  siendo la forma integrada de la ecuación:



$C = \frac{C_0}{\left(\frac{t}{\beta} + 1\right)^\alpha}$  donde C es la concentración de herbicida a tiempo t,  $C_0$  es la concentración

inicial de herbicida a tiempo 0,  $\alpha$  es un parámetro de forma determinado por el coeficiente de variación de los valores de las constantes de primer orden y  $\beta$  es un parámetro de localización. La degradación aumenta conforme aumenta el valor de  $\alpha$  y el de  $\beta$  disminuye, además la ecuación de velocidad incluye el tiempo. El valor de  $DT_{50}$  se calcula con la ecuación:  $DT_{50} = \beta(2^{\frac{1}{\alpha}} - 1)$  donde, la degradación es más rápida para valores mayores de  $\alpha$  y para valores menores de  $\beta$ . Sin embargo, el FMOC no es apropiado para una implementación universalmente válida en modelos de lixiviación de pesticidas, ya que en la ecuación la velocidad de degradación depende del tiempo.

Si las concentraciones del herbicida se mantienen constantes durante un periodo de tiempo al inicio de la degradación y posteriormente hay una disminución de su concentración de primer orden o bifásica, se puede describir como una **cinética con períodos de latencia**. La fase inicial de latencia (fase *lag*) y el  $DT_{50}$  del herbicida equivale a la suma de esta fase inicial con el valor de  $DT_{50}$  calculado para la segunda fase. En experimentos bajo condiciones de laboratorio, esto puede deberse a un almacenamiento incorrecto de las muestras provocando la reducción de la biomasa microbiana (por ejemplo, por excesivo secado del suelo). En ensayos bajo condiciones reales de campo, puede deberse a pérdidas por volatilización o lixiviación, pérdida por fotólisis en la superficie del suelo, o una adaptación de los microorganismos (FOCUS, 2006).

### 2.4.3 Efecto sobre la lixiviación de herbicidas

El contenido y naturaleza del CO del suelo es el factor más influyente en la adsorción de herbicidas por el suelo y, en consecuencia, en su movilidad en este medio (Garrido et al., 2015), y es responsable de los potenciales problemas de contaminación ambiental. Los herbicidas con una capacidad de adsorción intermedia tienen una mayor tendencia a tener pérdidas por escorrentía, ya que los compuestos débilmente adsorbidos están más disponibles para lixivarse a través del suelo desde la superficie, mientras que los compuestos fuertemente adsorbidos están menos disponibles. Por tanto, se espera una lixiviación menor en suelos con alto contenido de MO debido a la mayor adsorción (Reichenberger et al., 2007).

Por otra parte, la MOD aportada por las enmiendas orgánicas puede modificar la

movilidad de los herbicidas, ya que tiene características similares a los tensioactivos y la capacidad de disminuir la tensión superficial y aumentar la solubilidad de estos compuestos, reduciendo su capacidad de adsorción a través de la formación de complejos móviles MOD–herbicidas que pueden ser lixiviados por el suelo, a través de la competencia por los lugares de adsorción del suelo entre el herbicida y las moléculas de MOD y/o a través de interferencias en la adsorción de herbicidas por componentes de la MOD (Wang et al., 2010; Barriuso et al., 2011; Thevenot et al., 2015). Estos efectos relativos a la MOD son mayores para los agroquímicos más hidrofóbicos y son atenuados por la concentración, polaridad y configuración molecular de los coloides orgánicos (Li et al., 2005; Álvarez–Martín et al., 2017).

Varios trabajos han señalado que una alta concentración de MOD favorece la formación de una tercera fase (microemulsión) en solución entre los compuestos hidrofóbicos en la fase acuosa, influyendo en su movilidad y facilitando el transporte de herbicidas a través del suelo, especialmente de herbicidas no iónicos (Graber et al., 2001; Briceño et al., 2007; Thevenot et al., 2009). Sin embargo, otros estudios han mostrado un aumento en la adsorción de herbicidas y una reducción de la lixiviación por cambios estructurales en la porosidad inducida por el mayor contenido de CO (Worrall et al., 2001).

Por otra parte, la mayoría de estudios de movilidad de herbicidas en suelos enmendados se han realizado en condiciones de laboratorio o invernadero (Kodesova et al., 2012; Marín–Benito et al., 2009, 2013, 2021), siendo poco frecuentes los estudios a escala de campo (Ahmad et al., 2003, Stipičević et al., 2015; Marín–Benito et al., 2018a, c; Fernández et al., 2019). El elevado coste económico y tiempo necesario para el desarrollo de este tipo de ensayos junto con su alta dependencia de las condiciones climáticas los hacen menos habituales que los realizados en el laboratorio.

Los ensayos de laboratorio consisten en realizar experimentos de lavado de los herbicidas a través de columnas de suelo empaquetadas o columnas de suelo sin distorsionar contaminadas con herbicidas que implican analizar la concentración del compuesto en los lixiviados y en el suelo de la columna después del experimento. Trabajar a escala de laboratorio implica hacerlo en condiciones controladas orientadas a evaluar unas variables objetivo concretas. Esto permite llegar a conclusiones relevantes sobre la influencia de variables individuales, como la aplicación de enmiendas orgánicas a los suelos en un proceso seleccionado (como la movilidad de los herbicidas). Sin

embargo, y al contrario de los estudios de campo, su extrapolación es limitada porque no son representativos de las condiciones reales, donde la interacción de múltiples variables informa de un comportamiento diferente al observado en estudios de laboratorio. Estudiar el impacto que tienen las enmiendas orgánicas en la lixiviación de los herbicidas bajo condiciones ambientales cambiantes de humedad y temperatura es de gran interés porque estas variables junto con las características de los agroquímicos y las dosis reales aplicadas al campo, controlan en mayor o menor medida, la movilidad de los herbicidas en el perfil del suelo y la potencial contaminación de las aguas (Stipičević et al., 2015).

Además, el conjunto de datos recopilado de un ensayo de campo permitiría la calibración y validación de modelos de lixiviación de herbicidas en suelos enmendados, que podrían posteriormente ser utilizados como herramienta para la predicción del destino medioambiental de los herbicidas en suelos enmendados. Estas simulaciones permitirían diseñar protocolos sostenibles para la aplicación combinada de enmiendas orgánicas y herbicidas, y así evitar la contaminación de las aguas superficiales o subterráneas (Filipovic et al., 2014) por lixiviación de herbicidas de la superficie del suelo, lo cuál además disminuye el tiempo de control para las malas hierbas reduciendo la eficacia del herbicida.

### ***Modelización de la lixiviación de herbicidas en suelos***

Una gran cantidad de modelos matemáticos que evalúan el comportamiento y la dinámica medioambiental de los pesticidas han sido desarrollados (Siimes y Kämäri, 2003). Sin embargo, a nivel europeo son 4 los modelos aceptados para evaluar el riesgo medioambiental del uso de todo tipo de pesticidas durante su proceso de registro. Son los denominados modelos FOCUS (2000): PEARL, PELMO, PRZM y MACRO, que representan herramientas económicas y eficientes para predecir el destino de los pesticidas en combinación con datos de laboratorio y campo (Herbst et al., 2005; Mamy et al., 2008; Marín–Benito et al., 2015).

Estos modelos integran las condiciones medioambientales e hidrológicas del suelo, propiedades químicas de los pesticidas y prácticas agrícolas de aplicación y cultivo (Mamy et al., 2008), y tienen en cuenta los principales procesos que afectan a la dinámica de los pesticidas en el suelo (adsorción, degradación, lixiviación, volatilización, absorción por plantas, erosión y/o escorrentía) en distintos grados de complejidad. Los modelos FOCUS se han aplicado en un amplio número de estudios para simular el transporte de

pesticidas en el suelo bajo condiciones espaciales y temporales limitadas, proporcionando resultados fiables acerca del destino medioambiental de estos productos químicos (Mamy et al., 2008; Giannouli y Antonopoulos, 2015). Sin embargo, estos modelos no siempre son lo suficientemente eficaces y, en algunos casos, una parametrización incorrecta de los modelos por parte del usuario, la calidad y cantidad de datos experimentales disponibles, las limitaciones del modelo para describir algunos procesos y las condiciones agronómicas, dan resultados insatisfactorios en relación con los observados en campo (Gottesbüren et al., 2000; Vanclooster et al., 2000; Garratt et al., 2002).

Por ello, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda que la modelización del transporte de los pesticidas se base en el uso de al menos dos modelos y en la comparación de sus resultados (EFSA, 2004). Sin embargo, son escasos los estudios comparativos sobre la capacidad de distintos modelos de destino de pesticidas en condiciones de campo (Garratt et al., 2002; Herbst et al., 2005; Chang et al., 2008), y menos aún la modelización del destino medioambiental de estos compuestos en suelos enmendados con residuos orgánicos a escala de campo (Hughes et al., 2008; Ghirardello et al., 2010; Filipović et al., 2014). Por lo tanto, se hace necesario probar la capacidad de estos modelos matemáticos para simular el destino de los pesticidas en suelos enmendados y mejorar la evaluación de riesgos en el contexto regulatorio.

En el presente trabajo, se han utilizado los modelos matemáticos **PRZM** y **MACRO**. Ambos modelos han sido utilizados en un amplio número de estudios donde han proporcionado resultados fiables, especialmente en la modelización del transporte de herbicidas (Russell y Jones, 2002; Jackson, 2003; Scorza et al., 2007; Chang et al., 2008; Vasconcelos et al., 2013; Giannouli y Antonopoulos, 2015; Noshadi et al., 2019).

#### **2.4.4 Efecto sobre las comunidades microbianas del suelo**

Las poblaciones microbianas del suelo que desempeñan papeles fundamentales en las funciones del ecosistema del suelo y sus servicios ecológicos podrían verse potencialmente afectadas por la aplicación conjunta de herbicidas y de residuos orgánicos (Bending et al., 2007). Cualquier factor perturbador de los microorganismos del suelo alterará los procesos de degradación asociados a las actividades enzimáticas microbianas, como la descomposición de la MO, la biodegradación de contaminantes, los ciclos biogeoquímicos, entre otros (Gianfreda y Rao, 2008). En general, para estudiar cambios

en las comunidades microbianas se determinan parámetros indicadores de su actividad, abundancia y diversidad mediante técnicas bioquímicas (biomasa microbiana, respiración, actividades enzimáticas, perfil de los ácidos grasos de fosfolípidos, etc.) y/o técnicas de biología molecular, como la secuenciación masiva. En los últimos años se han publicado varios estudios sobre el tema (Feld et al., 2015; García–Jaramillo et al., 2016; Arora et al., 2019; Romero et al., 2019). Además, la investigación de la toxicidad y los efectos que tienen los herbicidas en las comunidades microbianas del suelo está creciendo en los últimos años, ya que en el futuro debería establecerse como un requisito previo para la regulación de herbicidas (Arora et al., 2019).

Existen numerosos estudios sobre los efectos no deseados de los residuos de herbicidas y sus productos de degradación sobre las comunidades microbianas del suelo, que afectan a su actividad, abundancia y estructura de diferentes formas (Gianfreda y Rao, 2011; Arora et al., 2019). En algunos casos, los herbicidas pueden disminuir la diversidad microbiana pero aumentar la diversidad funcional, o incluso pueden tener efectos estimulantes o inhibidores reversibles sobre los microorganismos del suelo (Hussain et al., 2009). Estos efectos dependen de los procesos que influyen en el comportamiento de los herbicidas en el suelo y de los factores que los controlan (Gianfreda y Rao, 2011). En particular, los procesos de adsorción–desorción, degradación y movilidad rigen la concentración de herbicidas en la solución del suelo y su biodisponibilidad, determinando su posible efecto sobre el funcionamiento microbiano del suelo o la capacidad de los microorganismos para biodegradar residuos de herbicidas (Koskinen y Harper, 2018).

La aplicación de enmiendas orgánicas al suelo puede afectar a la biodegradación de los herbicidas mediante: i) la bioestimulación de la microbiota endógena o introduciendo microorganismos exógenos al suelo con capacidades de biodegradación, ii) el cambio en la movilidad del herbicida (transportándolo o inmovilizándolo) y por tanto, aumentando o disminuyendo su biodisponibilidad a los microorganismos capaces de degradarlo, y iii) la modificación de las características del suelo (como el pH y nutrientes disponibles), que pueden alterar la composición y actividad microbiana autóctona, incluidas las comunidades responsables de la degradación de los herbicidas. Por otro lado, la presencia de una enmienda orgánica en el suelo favorece la adsorción de herbicidas, lo que disminuiría su biodisponibilidad para la degradación por microorganismos del suelo (Bending et al., 2007).

La aplicación de enmiendas orgánicas en el suelo comúnmente produce un incremento de la biomasa global y actividad enzimática microbiana del suelo, debido a la incorporación de MO, nutrientes y disponibilidad de moléculas orgánicas simples como azúcar y aminoácidos (Böhme et al., 2005). Sin embargo, existe poca información sobre los cambios en la comunidad microbiana del suelo por efecto de esta práctica agronómica, debido posiblemente a la gran cantidad de herbicidas y residuos orgánicos utilizados en la agricultura. Las respuestas de los microorganismos del suelo pueden ser positivas, negativas o neutras (Pose–Juan et al., 2015b, c, García–Jaramillo et al., 2016), pudiendo disminuir o aumentar la abundancia relativa de bacterias y hongos durante el tiempo de disipación de los herbicidas en los suelos enmendados. Estas modificaciones dependen de la composición, dosis y momento de aplicación de los herbicidas y enmiendas orgánicas, de las propiedades fisicoquímicas del suelo y de las condiciones ambientales. Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados sobre la respuesta microbiológica del suelo a esta práctica agrícola se ha evaluado a escala de laboratorio o invernadero bajo condiciones controladas (Xu et al., 2014; Pose–Juan et al., 2017; Rodríguez Cruz et al., 2019), siendo pocos los estudios realizados bajo condiciones reales de campo (Petric et al., 2016; García–Delgado et al., 2018, 2019).

En general, estos estudios se centran en el impacto de un compuesto con una sola aplicación (Pose–Juan et al., 2015b, 2017; García–Jaramillo et al., 2016; Chen et al., 2018), mientras que los efectos de la aplicación combinada y/o repetida de herbicidas y el uso de dosis crecientes, apenas se consideran (Fang et al. 2015; Wang et al. 2015; Pose–Juan et al., 2015c). El uso de concentraciones de herbicidas superiores a la dosis agronómica en suelos se puede encontrar como resultado de la aplicación repetida de estos compuestos en prácticas de monocultivo o derrames accidentales. Además, los residuos de herbicidas podrían permanecer en el suelo después de aplicaciones repetidas, lo que afectaría a la función y estructura microbiana del suelo. En algunos casos, puede tener un efecto perjudicial sobre la comunidad microbiana degradando el herbicida y comprometiendo significativamente su actividad (Xu et al., 2014). Por lo tanto, resulta de gran interés estudiar los posibles efectos secundarios de estas variables mencionadas sobre las comunidades microbianas del suelo, aunque se considera que de todos los pesticidas, el grupo de herbicidas podría tener un efecto menor y transitorio sobre la microbiota del suelo (Storck et al., 2018).

## 2.5 BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, R., James, T.K., Rahman, A., Holland, P.T., 2003. Dissipation of the herbicide clopyralid in an allophanic soil: laboratory and field studies. *J. Environ. Sci. Health B* 38(6), 683–695.
- Aksu, Z., 2005. Review. Application of biosorption for the removal of organic pollutants. *Process Biochem.* 40, 997–1026.
- Aliste, M., Perez–Lucas, G., Garrido, I., Fenoll, J., Navarro, S., 2021. Mobility of insecticide residues and main intermediates in a clay–loam soil, and impact of leachate components on their photocatalytic degradation. *Chemosphere* 274, 129965.
- Álvarez–Martín, A., Sánchez–Martín, M.J., Ordax, J.M., Marín–Benito, J.M., Rodríguez–Cruz, M.S., 2017. Leaching of two fungicides in spent mushroom substrate amended soil: Influence of amendment rate; fungicide ageing and flow condition. *Sci. Total Environ.* 584–585, 828–837.
- Anton–Herrero, R., Garcia–Delgado, C., Alonso–Izquierdo, M., Cuevas, J., Carreras, N., Mayans, B., Camacho–Arevalo, R., Eymar, E., 2021. New Uses of Treated Urban Waste Digestates on Stimulation of Hydroponically Grown Tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *Waste Biomass Valor.* 12(4), 1877 – 1889.
- 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. *Agr. Ecosyst. Environ.* 123, 247–260.
- Arora, S., Sahni, D., Sehgal, M., Srivastava, D., Singh, A., 2019. Pesticides use and its effect on soil bacterial and fungal populations, microbial biomass carbon and enzymatic activity. *Curr. Sci.* 116, 643–649.
- Barriuso, E., Houot, S., Serra–Wittling, C., 1997. Influence of compost addition to soil on the behavior of herbicides. *J. Pest. Sci.* 49, 65–75.
- 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.
- Baxter, J., Cummings, S.P., 2008. The degradation of the herbicide bromoxynil and its impact on bacterial diversity in a top soil. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1605–1616.
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso E., Gabrielle, G., 2002. Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview. *Agronomy* 22, 21–33.

- Bedos, C., Alletto, L., Durand, B., Fanucci, O., Brut, A., Bourdat–Deschamps, M., Giuliano, S., Loubet, B., Ceschia, E., Benoit, P., 2017. Observed volatilization fluxes of S–metolachlor and benoxacor applied on soil with and without crop residues. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 3985–3996.
- Bending, G.D., Lincoln, S.D., Edmondson, R.N., 2006. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environ. Pollut.* 139, 279–287.
- Bending, G.D., Rodríguez–Cruz, M.S., 2007. Microbial aspects of the interaction between soil depth and biodegradation of the herbicide isoproturon. *Chemosphere* 66, 664–67.
- Benito, M., Masaguer, A., Moliner, A., Arrigo, N., 2003. Chemical and microbiological parameters for the characterization of the stability and maturity of pruning waste compost. *Biol. Fertil. Soils.* 37, 184–189.
- Böhme, L., Langer, U., Böhme, F., 2005. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long–term field experiments. *Agric. Ecosyst. Environ.* 109, 141–152.
- Bose, S., Kumar, P.S., Vo, D.V.N., Rajamohan, N., Saravanan, R., 2021. Microbial degradation of recalcitrant pesticides: a review. *Environ. Chem. Lett.* <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01236-5>.
- Brain, R.A., Perine, J., Cooke, C., Ellis, C.B., Harrington, P., Lane, A., O'Sullivan, C., Ledson, M., 2017. Evaluating the effects of herbicide drift on non–target terrestrial plants: A case study with mesotrione. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 2465–2475.
- Briceño, G., Palma, G., Durán, N., 2007. Influence of organic amendment on the biodegradation and movement of pesticides. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 37(3), 233–271.
- Calvet, R., 1989. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Persp.* 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. *J. Environ. Sci. Health B* 54(3), 187–195.
- Carter, A., 2000. Herbicide movement in soils: principles, pathways and processes. *Weed Res.* 40(1), 113–122.
- Casida, J.E., 2017. Pesticide interactions: Mechanisms, benefits, and risks. *J. Agric. Food Chem.* 65, 4553 – 4561.
- Castillo, M.P., Torstensson, L., 2007. Effect of biobed composition, moisture and temperature on the degradation of pesticides. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5725–5733.



- Castillo, M.P., Torstensson, L., Stenström, J., 2008. Biobeds for environmental protection from pesticide use – a review. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6206–6219.
- Ccancapa, A., Masia, A., Andreu, V., Pico, Y., 2016. Spatio-temporal patterns of pesticide residues in the Turia and Júcar Rivers (Spain). *Sci. Total Environ.* 540, 200–210.
- Chang, N.B., Srilakshmi, K., Parvathinathan, G., 2008. Comparison of models of simazine transport and fate in the subsurface environment in a citrus farm. *J. Environ. Manag.* 86(1), 27–43.
- Chaplain, V., Mamy, L., Vieublé-Gonod, L., Mougin, C., Benoit, P., Barriuso, E., Néliu, S., 2011. Fate of Pesticides in Soils: Toward an Integrated Approach of Influential Factors, Pesticides in the Modern World – Risks and Benefits. Stoytcheva, M. (Ed.), InTech Europe, Croatia. DOI: 10.5772/17035.
- Chen, W., Hsu, F., Yen, J., 2018. Effect of green manure amendment on herbicide pendimethalin on soil. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 53, 87–94.
- Cohen, S.Z., Wauchope, R.D., Klein, A.W., Eadsforth, C.V. Graney, R., 1995. Offsite transport of pesticides in water: mathematical models of pesticides leaching and runoff. *Pure Appl. Chem.* 67, 2109–2148.
- CTICH (Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de la Rioja), 2021. <https://ctich.com/> (consultado 10 enero 2021).
- Cullum, R.F., 2009. Macropore flow estimations under no-till and till systems. *Catena* 78, 87–91.
- De Souza, R.M., Seibert, D., Quesada, H.B., Bassetti, F.J., Fagundes-Klenc, M.R., Bergamasco, R., 2020. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surfacewater: A review. *Process Saf. Environ. Prot.* 135, 22–37.
- De Wilde, T., Spanoghe, P., Debaer, C., Ryckeboer, J., Springael, D., Jaeken, P., 2007. Overview of on-farm bioremediation systems to reduce the occurrence of point source contamination. *Pest Manag. Sci.* 63, 111–128.
- Deng, H., Feng, D., He, J., Li, F., Yu, H., Ge, C., 2017. Influence of biochar amendments to soil on the mobility of atrazine using sorption-desorption and soil thin-layer chromatography. *Ecol. Eng.* 99, 381–390.
- Dias, L.A., Gebler, L., Niemeyer, J.C., Itako, T.A., 2020. Destination of pesticide residues on biobeds: State of the art and future perspectives in Latin America. *Chemosphere* 248, 126038.
- Dickerson, G.A., 2000. Sustainable approach to recycling urban and agricultural organic wastes. Guide H-159, Cooperative Extension Service College of Agriculture and Home Economics,

Mexico.

ECN (European Compost Network), 2021. Bio-Waste in Europe. Disponible en línea: <https://www.compostnetwork.info/policy/biowaste-in-europe/> (consultado 20 enero 2021).

Eden, M., Gerke, H.H., Houot, S., 2017. Organic waste recycling in agriculture and related effects on soil water retention and plant available water: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 37, 11.

EEA (European Environment Agency), 2021. Waste Generation in Europe. Disponible en línea: <https://www.eea.europa.eu/es> (consultado 20 enero 2021).

EFSA (European Food Safety Authority), 2004. Opinion of the scientific panel on plant health, plant protection products and their residues on a request of EFSA related to FOCUS groundwater models. *EFSA J.* 93, 1–20.

El-Nahhal, Y., 2003. Persistence, mobility, efficacy and activity of chloroacetanilide herbicide formulation under greenhouse and field experiments. *Environ. Pollut.* 124(1), 33–38.

EPA (United States Environmental Protection Agency), 2021. Disponible en línea: <https://www.epa.gov/pesticides> (consultado 02 enero 2021).

Essington, M.E., 2004. Soil and water chemistry. An integrative approach. CRC Press, Florida.

Eymar, E., Tapia, Y., Frutos, I., Garate, A., Cala, V., 2009. Chemical and carbon-13 cross-polarization magic-angle spinning nuclear magnetic resonance characterization of composted organic waste. *Acta Hort.* 819, 459–464.

Fait, G., Nicelli, M., Fragoulis, G., Trevisan, M., Capri, E., 2007. Reduction of point contamination sources of pesticide from a vineyard farm. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3302–3308.

Fang, H., Lian, J., Wang, H., Cai, L., Yu, Y., 2015. Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation in repeatedly treated soils. *J. Hazard. Mater.* 286, 457–465.

Farha, W., Abd El-Aty, A. M., Rahman, Md. M., Shin, H.C., Shim, J.H., 2016. An overview on common aspects influencing the dissipation pattern of pesticides: a review. *Environ. Monit. Assess.* 188, 693.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2021. FAOSTAT database. Disponible en línea: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/> (consultado 10 enero 2021).

Feld, L., Hjelmsø, M. H., Nielsen, M. S., Jacobsen, A. D., Rønn, R., Ekelund, F., et al., 2015. Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by amoA expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS ONE* 10(5), e0126080.

- Fernández, D., Gómez, S., Albarrán, Á., Peña, D., Rozas, M.Á., Rato–Nunes, J.M., López–Piñeiro, A., 2019. How the environmental fate of clomazone in rice fields is influenced by amendment with olive–mill waste under different regimes of irrigation and tillage. *Pest Manag. Sci.* 76(5), 1795–1803.
- Filipović, V., Coquet, Y., Pot, V., Houot, S., Benoit, P., 2014. Modeling the effect of soil structure on water flow and isoproturon dynamics in an agricultural field receiving repeated urban waste compost application. *Sci. Total Environ.* 499, 546–559.
- Flury, M., 1996. Review. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils. *J. Environ. Qual.* 25, 25–45.
- FOCUS (FORum for Co–ordination of pesticide fate models and their Use), 2000. FOCUS Groundwater Scenarios in the EU Review of Active Substances. Report of the FOCUS Groundwater Scenarios Workgroup EC Document Reference Sanco/321/2000 rev.2 (202 pp).
- FOCUS (FORum for Co–ordination of pesticide fate models and their Use), 2006. Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration EC Documents Reference Sanco/10058/2005 Version 2.0 (434 pp).
- García, F.P., Sandra, Y., Ascencio, C., John, C., Oyarzun, G., Hernández, A.C., et al., 2012. Pesticides: Classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *J. Environ. Sci. Toxicol.* 1(11), 279–293.
- García–Delgado, C., Yunta, F., Eymar, E., 2015. Bioremediation of multi–polluted soil by spent mushroom (*Agaricus bisporus*) substrate: Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and Pb availability. *J. Hazard. Mater.* 300, 281–288.
- García–Delgado, C., Barba, V., Marín–Benito, J.M., Igual, J.M., Sánchez–Martín, M.J., Rodríguez–Cruz, M., 2018. Simultaneous application of two herbicides and green compost in a field experiment: Implications on soil microbial community. *Appl. Soil Ecol.* 127, 30–40.
- García–Delgado, C., Barba–Vicente, V., Marín–Benito, J.M., Mariano Igual, J., Sánchez–Martín, M.J., Sonia Rodríguez–Cruz, M., 2019. Influence of different agricultural management practices on soil microbial community over dissipation time of two herbicides. *Sci. Total Environ.* 646, 1478–1488.
- García–Delgado, C., Marín–Benito, J.M., Sánchez–Martín, M.J., Rodríguez–Cruz, M.S., 2020. Organic carbon nature determines the capacity of organic amendments to adsorb pesticides in soil. *J. Hazard. Mater.* 390, 122–162.

- García-Jaramillo, M., Redondo-Gómez, S., Barcia-Piedras, J.M., Aguilar, M., Jurado, V., Hermosín, M.C., Cox, L., 2016. Dissipation and effects of tricyclazole on soil microbial communities and rice growth as affected by amendment with alperujo compost. *Sci. Total Environ.* 550, 637–644.
- Garratt, J.A., Capri, E., Trevisan, M., Errera, G., Wilkins, R.M., 2002. Parametrization, evaluation and comparison of pesticide leaching models to data from a Bologna field site, Italy. *Pest. Manag. Sci.* 58, 3–20.
- Garrido, I., Vela, N., Fenoll, J., Navarro, G., Pérez-Lucas, G., Navarro, S., 2015. Testing of leachability and persistence of sixteen pesticides in three agricultural soils of a semiarid Mediterranean region. *Span. J. Agric. Res.* 13, 1104.
- Garrido, I., Pastor-Belda, M., Campillo, N., Vinas, P., Yanez, M.J., Vela, N., Navarro, S., Fenoll, J., 2019. Photooxidation of insecticide residues by ZnO and TiO<sub>2</sub> coated magnetic nanoparticles under natural sunlight. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 372, 245–253.
- Ghirardello, D., Morselli, M., Semplice, M., Di Guardo, A., 2010. A dynamic model of the fate of organic chemicals in a multilayered air/soil system: development and illustrative application. *Environ. Sci. Technol.* 44, 9010–9017.
- Gianessi, L.P., 2013. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. *Pest Manag. Sci.* 69, 1099–1105.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., 2008. Interactions between xenobiotics and microbial and enzymatic soil activity. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 38, 269–310.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., 2011. The influence of pesticides on soil enzymes. In: Shukla, G., Varma, A. (Eds.), *Soil Enzymology, Soil Biology* 22. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany (293–312 pp).
- Giannouli, D.D., Antonopoulos, V.Z., 2015. Evaluation of two pesticides leaching models in an irrigated field cropped with corn. *J. Environ. Manage.* 150, 508–515.
- Goss, M.J., Tubeileh, A., Goorahoo, D. 2013. A review of the use of organic amendments and the risk to human health. *Adv. Agron.* 120, 275–379.
- Gottesbüren, B., Aden, K., Bärlund, I., Brown, C., Dust, M., Görlitz, G., et al., 2000. Comparison of pesticide leaching models: results using the Weiherbach data set. *Agric. Water Manag.* 44, 153–81.
- Graber, E.R., Dror, I., Bercovich, F.C., Rosner, M., 2001. Enhanced transport of pesticides in a field trial with treated sewage sludge. *Chemosphere* 44(4), 805–811.
- Gavrilescu, M., 2005. Review. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Eng.*

- Life Sci.* 5, 497-525.
- Gupta, V.K., Carrott, P.J.M., Ribeiro C., Suhas, M.M.L., 2009. Low-cost adsorbents: growing approach to wastewater treatment—a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 39, 783–842.
- Herbst, M., Fialkiewicz, W., Chen, T., Pütz, T., Thiéry, D., Mouvet, C., et al., 2005. Intercomparison of flow and transport models applied to vertical drainage in cropped lysimeters. *Vadose Zone J.* 4, 240–54.
- Herrero–Hernández, E., Andrades, M.S., Marín–Benito, J.M., Sánchez–Martín, M.J. 2011. Field-scale dissipation of tebuconazole in a vineyard soil amended with spent mushroom substrate and its potential environmental impact. *Ecotox. Environ. Saf.* 74, 1480–1488.
- 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. *J. Hydrol.* 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). *Sci. Total Environ.* 609, 161–171.
- Herrero–Hernández, E., Simón–Egea, A.B., Sánchez–Martín, M.J., Rodríguez–Cruz, M.S., Andrades, M.S., 2020. Monitoring and environmental risk assessment of pesticide residues and some of their degradation products in natural waters of the Spanish vineyard region included in the Denomination of Origin Jumilla. *Environ. Pollut.* 264, 114666.
- Hughes, L., Webster, E., Mackay, D., 2008. An evaluative screening level model of the fate of organic chemicals in sludge-amended soils including organic matter degradation. *Soil Sediment Contam.* 17, 564–585.
- Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., Khalid, A., 2009. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Adv. Agron.* 102, 159–200.
- Hussain, S., Arshad, M., Springael, D., SøRensen, S.R., Bending, G.D., Devers–Lamrani, M., Maqbool, Z., Martin–Laurent, F., 2015. Abiotic and biotic processes governing the fate of phenylurea herbicides in soils: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 1947–1998.
- INE (Instituto Nacional de Estadística), 2020. Cuentas medioambientales: Cuenta de los residuos Año 2017. Disponible en línea: [https://www.ine.es/prensa/cma\\_2018\\_res.pdf](https://www.ine.es/prensa/cma_2018_res.pdf) (consultado 30 noviembre 2020).
- Jackson, S.H., 2003. Use of PRZM–3 to validate a laboratory to field degradation conceptual model. *Pest. Manag. Sci.* 60, 8–16.

- Jiang, L., Lin, J.L., Jia, L.X., Liu, Y., Pan, B., Yang, Y., Lin, Y., 2016. Effects of two different organic amendments addition to soil on sorption-desorption, leaching, bioavailability of penconazole and the growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Environ. Manage.* 167, 130–138.
- Juraske, R., Castells, F., Vijay, A., Muñoz, P., Antón, A., 2009. Uptake and persistence of pesticides in plants: Measurements and model estimates for imidacloprid after foliar and soil application. *J. Hazard. Mater.* 165, 683–689.
- Kapsi, M., Tsoutsis, C., Paschalidou, A., Albanis, T., 2019. Environmental monitoring and risk assessment of pesticide residues in surface waters of the Louros River (N.W. Greece). *Sci. Total Environ.* 650, 2188–2198.
- Karanasios, E., Tsiropoulos, N.G., Karpouzas, D.G., Ehalotis, C., 2010. Degradation and adsorption of pesticides in compost-based biomixtures as potential substrates for biobeds in southern Europe. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9147–9156.
- Katagi, T. 2013. Soil column leaching of pesticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 221, 1–105.
- Kerle, E.A., Jenkins J.J, Vogue P.A., 2007. Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection. Extension & Station Communications Oregon State University, Corvallis, USA.
- Khan, S.U., 2016. Pesticides in the Soil Environment. Elsevier (248 pp).
- Kim, K.H., Kabir, E., Jahan, S.A., 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* 575, 525–535.
- Köck-Schulmeyer, M., Postigo, C., Farré, M., Barceló, D., López de Alda, M., 2019. Medium to highly polar pesticides in seawater: Analysis and fate in coastal areas of Catalonia (NE Spain). *Chemosphere* 215, 515–523.
- Kodesova, R., Kocarek, M., Hajkova, T., Hybler, M., Drabek, O., Kodes, V., 2012. Chlorotoluron mobility in compost amended soil. *Soil Tillage Res.* 118, 88–96.
- Koskinen, W.C., Harper, S.S., 2018. The retention process: Mechanisms in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling. Editor(s):H.H. Cheng First published: 1990 Book Series: SSSA Book Series (51 – 77 pp).
- Lerch T.Z., Dignac M.F., Thevenot M., Mchergui C., Houot S., 2019. Chemical changes during composting of plant residues reduce their mineralisation in soil and cancel the priming effect. *Soil Biol. Biochem.* 136, 107525.
- Li, K., Xing, B.S., William, A.T., 2005. Effect of organic fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. *Environ. Pollut.* 134, 187–194.

- Li, Z., Gioia, D., Hwang, J., Hong, J., Ozores–Hampton, M., Zhao, X., Pisani, C., Roskopf, E., Christopher, P., 2019. Dissipation of fomesafen in fumigated, anaerobic soil disinfestation–treated and organic–amended soil in Florida tomato production systems. *Pest. Manag. Sci.* 76(2), 628–635.
- Li, X., Grey, T., Price, K., Vencill, W., Webster, T., 2019. Adsorption, desorption and persistence of fomesafen in soil. *Pest. Manag. Sci.* 75, 270–278.
- Linn, D.M., Carski, T.H., Brusseau, M.L., Chang, F.H., 1993. Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin (260 pp).
- Magnoli, K., Carranza, C.S., Aluffi, M.E., Magnoli, C.E., Barberis, C.L., 2020. Herbicides based on 2,4–D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 38501–38512.
- 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. Manag. Sci.* 64, 262–75.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), 2021. Disponible en línea: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/> (consultado 10 enero 2021).
- March, G.J., 2014. Agricultura y plaguicidas: un análisis global. FADA – Federación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina (293 pp).
- Marín–Benito, J.M., Rodríguez–Cruz, M.S., Sánchez–Martín, M.J., 2009. Effect of spent mushroom substrate amendment of vineyard soils on the behavior of fungicides: 2. Mobility of penconazole and metalaxyl in undisturbed soil cores. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9643–9650.
- 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. *J. Soils 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. *Sci. Total Environ.* 463–464, 589–599.
- Marín–Benito, J.M., Rodríguez–Cruz, M.S., Sánchez–Martín, M.J., Mamy, L., 2015. Modeling fungicides mobility in undisturbed vineyard soil cores unamended and amended with spent mushroom substrates. *Chemosphere* 134, 408–416.

- 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., Barba, V., Ordax, J.M., Sánchez–Martín, M.J., Rodríguez–Cruz, M.S., 2018a. Recycling organic residues in soils as amendments: effect on the mobility of two herbicides under different management practices. *J. Environ. Manage.* 224, 172–181.
- Marín–Benito, J.M., Sánchez–Martín, M.J., Ordax, J.M., Draoui, K., Azejjel, H., Rodríguez–Cruz, M.S., 2018b. Organic sorbents as barriers to decrease the mobility of herbicides in soils. Modelling of the leaching process. *Geoderma* 313, 205–216.
- Marín–Benito, J.M., Barba, V., Ordax, J.M., Andrades, M.S., Sánchez–Martín, M.J., Rodríguez–Cruz, M.S., 2018c. Application of green compost as amendment in an agricultural soil: effect on the behaviour of triasulfuron and prosulfocarb under field conditions. *J. Environ. Manag.* 207, 180–191.
- Marín–Benito, J.M., Herrero–Hernández, E., Ordax, J.M., Sánchez–Martín, M.J., Rodríguez–Cruz, M.S., 2021. The role of two organic amendments to modify the environmental fate of S–metolachlor in agricultural soils. *Environ. Res.* 195, 110871.
- Martínez–Blanco, J., Lazcano, C., Christensen, T. H., Muñoz, P., Rieradevall, J., Møller, J., et al., 2013. Compost benefits for agriculture evaluated by life cycle assessment. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33, 721–732.
- Medina, E., Paredes, C., Bustamante, M.A., Moral, R., Moreno–Caselles, J., 2012. Relationships between soil physico– chemical, chemical and biological properties in a soil amended with spent mushroom substrate. *Geoderma* 173–174, 152–161.
- Mendes, K.F., Alonso, F.G., Mertens, T.B., Inoue, M., Oliveira, M.G.De, Tornisielo, V.L., 2019. Aminocyclopyrachlor and mesotrione sorption–desorption in municipal sewage sludge–amended soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 78(1), 131–140.
- Naciones Unidas, 2021. Global Issues: Our Global Population. Disponible en línea: <https://www.un.org/es/global-issues/population> (consultado 10 enero 2021).
- Navarro, S., Vela, N., Navarro, G., 2007. Review. An overview on the environmental behavior of pesticide residues in soils. *Span. J. Agric. Res.* 5, 357–375.
- Noshadi, M., Foroutani, A., Sepaskhah, A., 2019. Evaluation of HYDRUS–1D and modified PRZM–3 models for tribenuron methyl herbicide transport in soil profile under vetiver cultivation. *Int. J. Phytoremediation* 21(9), 878–891.
- Oerke, E.C., 2005. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31.



- Ortiz–Hernández, M.L., Sánchez–Salinas, E., Dantán–González, E., Castrejón–Godínez, M.L., 2013. Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process, *Biodegradation – Life of Science*, Rolando Chamy and Francisca Rosenkranz, IntechOpen, DOI: 10.5772/56098.
- Ouyang, W., Cai, G., Huang, W., Hao, F., 2016. Temporal–spatial loss of diffuse pesticide and potential risks for water quality in China. *Sci. Total Environ.* 541, 551–558.
- Paredes, C., Moral, R., Pérez–Murcia, M.D., Moreno–Caselles, J., Pérez–Espinosa, A., 2006. Agricultural value of the spent mushroom substrate. In: Petersen, S.O. (Ed.), *Technology for Recycling of Manure and Organic Residues in a Whole–Farm Perspective: Danish Institute of Agricultural Sciences, Ministry of Food, Agricultural Sciences, Tjele, II*, (301–304 pp).
- Pérez–Méndez, M.A., Martínez Hernández, M.R., 2008. Manejo alternativo de los residuos de jardinería. *Revista De Divulgación. División Académica de Ciencias Biológicas. XIV*, 26, (12 pp).
- 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. *Environ. Sci. Poll. Res.* 23, 4320–4333.
- Petter, F.A., Ferreira, T.S., Sinhorin, A.P., Lima, L.B., Almeida, F.A., Pacheco, L. P., Silva, A.F., 2019. Biochar increases diuron sorption and reduces the potential contamination of subsurface water with diuron in a sandy soil. *Pedosphere* 29(6), 801–809.
- Pose–Juan, E., Sánchez–Martín, M.J., Andrades, M.S., Rodríguez–Cruz, M.S., Herrero–Hernández, E., 2015a. Pesticide residues in vineyard soils from Spain: spatial and temporal distributions. *Sci. Total Environ.* 514, 351–358.
- Pose–Juan, E., Igual, J.M., Curto, N., Sánchez–Martín, M.J., Rodríguez–Cruz, M.S., 2015b. Mesotrione dissipation and response of soil microbial communities in a soil amended with organic residues. *Spanish J. Soil Sci.* 5, 12–25.
- Pose–Juan, E., Sánchez–Martín, M. J., Herrero–Hernández, E., Rodríguez–Cruz, M.S. 2015c. Application of mesotrione at different doses in an amended soil: Dissipation and effect on the soil microbial biomass and activity. *Sci. Total Environ.* 536, 31–38.
- 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. *Front. Microbiol.* 8, 1–12.

- 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. *J. Environ. Manage.* 223, 1068–1077.
- PPDB (Pesticide Properties Data Base.), 2021. University of Hertfordshire, UK. Disponible en línea: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> (consultado 19 abril 2021).
- Reichenberger, S., Bach, M., Skitschak, A., Frede, H.G., 2007. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground– and surface water and their effectiveness; a review. *Sci. Total Environ.* 384, 1–35
- Rodríguez–Cruz, M.S., Jones, J.E., Bending, G.D., 2006. Field–scale study of the variability in pesticide biodegradation with soil depth and its relationship with soil characteristics. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2910–2918.
- Rodríguez–Martín J.A., López Arias M., Grau–Corbí J.M., 2009. Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de los suelos agrícolas y pastos de España. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (200 pp).
- Rodríguez–Cruz, M.S., Pose–Juan, E., Marín–Benito, J.M., Igual, M., Sánchez–Martín, M.J., 2019. Pethoxamid dissipation and microbial activity and structure in an agricultural soil: Effect of herbicide rate and organic residues. *Appl. Soil Ecol.* 140, 135–143.
- Romero, E., Delgado–Moreno, L., Nogales, R., 2019. Pesticide dissipation and enzyme activities in ungrassed and grassed biomixtures, composed of winery wastes, used in biobed bioremediation systems. *Water Air Soil Pollut.* 230, 33.
- Rusell, M.H., Jones, R.L., 2002. Comparison of Pesticide Root Zone Model 3.12: Leaching predictions with field data. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1552–1557.
- Sánchez–Martín, M.J., Sánchez–Camazano, M., 1984. Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo. Temas de Divulgación. 1ª Edición. Editorial Diputación de Salamanca (51 pp).
- Sánchez–Monedero, M.A., Cayuela, M.L., Sánchez–García, M., Vandecasteele, B., D’Hose, T., López, G., Martínez–Gaitán, C., Kuikman, P.J., Sinicco, T., Mondini, C., 2019. Agronomic Evaluation of Biochar, Compost and Biochar–Blended Compost across Different Cropping Systems: Perspective from the European Project FERTIPLUS. *Agronomy* 9, 225.
- Schreiner, V.C., Szöcs, E., Bhowmik, A.K., Vijver, M.G., Schäfer, R.B., 2016. Pesticide mixtures in streams of several European countries and the USA. *Sci. Total Environ.* 573, 680–689.
- Scorza, J. R.P., Jarvis, N.J., Boesten, J. JTI, EATM van der Zee, S., Roulier, S., 2007. Testing MACRO (version 5.1) for pesticide leaching in a Dutch clay soil. *Pest. Manag. Sci.* 63, 1011–1025.

- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Preet, G., Sidhu, S., Handa, N., et al., 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences* 1(11), 1–16.
- Sharma, A., Shukla, A., Attri, K., Kumar, M., Kumar, P., Suttee, A., Singh, G., Barnwal, R.P., Singla, N., 2020. Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 201, 110812.
- Siimes, K., Kämäri, J., 2003. A review of available pesticide leaching models: selection of models for simulation of herbicide fate in Finnish sugar beet cultivation. *Boreal Environ. Res.* 8, 31–51.
- Silva, V., Mol, H.G.J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C.J., Geissen, V., 2019. Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Sci. Total Environ.* 653, 1532–1545.
- 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. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 19, 313–320.
- STATISTA, 2021. Volumen de residuos vegetales gestionados en España de 2010 a 2017 (en toneladas). Disponible en línea: <https://es.statista.com/> (consultado 10 enero 2021).
- Stipičević, S., Galzina, N., Udiković–Kolić, N., Jurina, T., Mendaš, G., Dvorščak, M., Petrić, I., Barić, K., Drevenkar, V., 2015. Distribution of terbutylazine and atrazine residues in crop–cultivated soil: the effect of herbicide application rate on herbicide persistence. *Geoderma* 259–260, 300–309.
- Storck, V., Nikolaki, S., Perruchon, C., Chabanis, C., Sacchi, A., Pertile, G., Baguelin, C., Karas, P.A., Spor, A., et al., 2018, Lab to field assessment of the ecotoxicological impact of chlorpyrifos, isoproturon, or tebuconazole on the diversity and composition of the soil bacterial community. *Front. Microbiol.* 9, 1412.
- Székács, A., Mörtl, M., Darvas, B., 2015. Monitoring pesticide residues in surface and ground water in Hungary: Surveys in 1990–2015. *J. Chemistry* 717948.
- TCE (Tribunal de Cuentas Europeo), 2020. Informe Especial 05/2020: Uso sostenible de productos fitosanitarios: pocos progresos en la medición y en la reducción de riesgos. Disponible en línea: <https://op.europa.eu/webpub/eca/special-reports/pesticides-5-2020/es/> (consultado 10 diciembre 2020).
- Thevenot, M., Dousset, S., Hertkorn, N., Schmitt–Kopplin, P., Andreux F., 2009. Interactions of diuron with dissolved organic matter from organic amendments. *Sci Total Environ.* 407(14), 4297–4302.

- Thevenot, M., Dousset, S., 2015. Compost effect on diuron retention and transport in structured vineyard soils. *Pedosphere*. 25, 25–36.
- Tudi, M., Ruan, H.D., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C, Phung, D.T., 2021. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18(3), 1112.
- Umetsu, N., Shirai, Y., 2020. Development of novel pesticides in the 21st century. *J Pestic. Sci.* 45, 54–74.
- Urrea, J., Alkorta, I., Garbisu, C., 2019. Potential benefits and risks for soil health derived from the use of organic amendments in agriculture. *Agronomy* 9(9), 1–23.
- Vanclooster, M., Boesten, J.T., Trevisan, M., Brown, C.D., Capri, E., Eklo, O.M., et al., 2000. A European test of pesticide-leaching models: methodology and major recommendations. *Agric. Water Manag.* 44, 1–19.
- Vasconcelos, F.C., Andrade Carvalho, S., Godinho Silva, S.H., Silva, E.A., Guerreiro, M.C., Curi, N., 2013. MACRO simulator (version 5.0) for predicting atrazine herbicide behavior in brazilian latosols. *Ciênc. Agrotec.* 37(3), 211–220.
- Vasilescu, M.N., Medvedovici, A.V., 2005. HERBICIDES. In Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition). Eds. Paul Worsfold, Alan Townshend and Colin Poole (243–260 pp). <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00256-9> Disponible en línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977002569> (consultado 10 mayo 2021).
- Vimal, S.R., Singh, J.S., Arora, N.K., Singh, S., 2017. Soil–plant–microbe interactions in stressed agriculture management: a review. *Pedosphere* 27, 177–192.
- Vonberg, D., Vanderborght, J., Cremer, N., Pütz, T., Herbst, M., Vereecken, H., 2014. 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Res.* 50, 294–306.
- Wang, H., Lin, K., Hou, Z., Richardson, B., Gan, J., 2010. Sorption of the herbicide terbuthylazine in two New Zealand forest soils amended with biosolids and biochars. *J. Soils Sediments.* 10, 283–289.
- Wang, F., Zhu, L., Wang, X., Wang, J., Wang, J., 2015. Impact of repeated applications of metalaxyl on its dissipation and microbial community in soil. *Water Air Soil Pollut.* 226, 1–14.
- Wang, G., Han, Y., Li, X., Andaloro, J., Chen P., Hoffmann W.C., Han X., Chen S., Lan, Y., 2020. Field evaluation of spray drift and environmental impact using an agricultural

- unmanned aerial vehicle (UAV) sprayer. *Sci. Total Environ.* 737, 139793.
- Willkommen, S., Lange, J., Ulrich, U., Pfannerstill, M., Fohrer, N., 2021. Field insights into leaching and transformation of pesticides and fluorescent tracers in agricultural soil. *Sci. Total Environ.* 751, 141658.
- Wolfe, N.L., Mingelgrin, U., Miller, G.C., 1990. Abiotic transformations in water, sediments and soil. H.H. Cheng (Ed.), En: *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modelling*. Soil Sci. Soc. Am., Madison, Wisconsin (103–168 pp).
- Worrall, F., Fernandez–Perez, M., Johnson, A.C., Flores–Cespedes, F., Gonzalez–Pradas, E., 2001. Limitations on the role of incorporated organic matter in reducing pesticide leaching. *J. Contam. Hydrol.* 49, 241–262.
- Wu, C., Liu, X., Wu, X., Dong, F., Xu, J., Zheng, Y., 2019. Sorption, degradation and bioavailability of oxyfluorfen in biochar–amended soils. *Sci. Total Environ.* 658(2), 87–94.
- Xie, G., Li, B., Tang, L., Rao, L., Dong, Z., 2021. Adsorption–desorption and leaching behaviors of broflanilide in four texturally different agricultural soils from China. *J. Soils Sediments* 21, 724–735.
- Xu, J., Zhang, Y., Dong, F., Liu, X., Wu, X., Zheng, Y., 2014. Effects of repeated applications of chlorimuron–ethyl on the soil microbial biomass, activity and microbial community in the greenhouse. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 175–182.
- Yavari, S., Sapari, N.B., Malakahmad, A., Yavari, S., 2019. Degradation of imazapic and imazapyr herbicides in the presence of optimized oil palm empty fruit bunch and rice husk biochars in soil. *J. Hazard. Mater.* 366, 636–642.
- Zambito Marsala, R., Capri, E., Russo, E., Bisagni, M., Colla, R., Lucini, L., Gallo, A., Suci, N.A., 2020. First evaluation of pesticides occurrence in groundwater of Tidone Valley, an area with intensive viticulture. *Sci. Total Environ.* 736, 139730.
- 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.
- Zolgharnein, J., Shahmoradi, A., Ghasemi, J., 2011. Pesticides removal using conventional and low–cost adsorbents: a review. *Clean (Weinh)* 39, 1105–1119.



# MATERIALES Y MÉTODOS





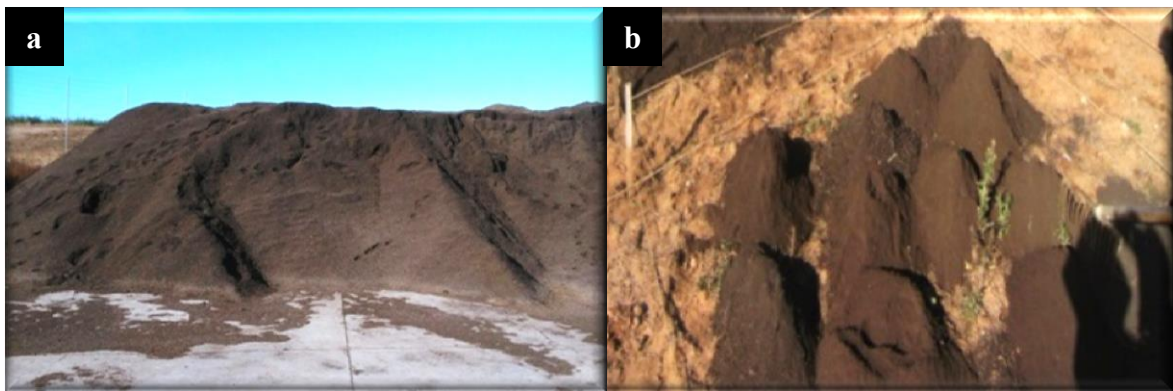


### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Enmiendas orgánicas

Se seleccionaron dos enmiendas orgánicas con distinta naturaleza y contenido en carbono orgánico (CO): el sustrato postcultivo de hongos recompostado (SMS) y el compost vegetal (GC) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Enmiendas orgánicas: a) Sustrato postcultivo de hongos recompostado (SMS), y b) Compost vegetal (GC)

El SMS utilizado procede del residuo generado tras el ciclo productivo del cultivo de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* (relación 2:1), y fue suministrado por Sustratos de La Rioja, S.L. (Pradejón). El SMS procedente de la producción de *Agaricus* está compuesto de una mezcla compostada de paja de cereal y estiércol (de aves de corral y/o caballo y purín de cerdo), nitrato amónico, urea, yeso, agua, carbonato de calcio, suelo y residuos de nutrientes inorgánicos, mientras que el SMS procedente de la producción de *Pleurotus* está compuesto de serrín de madera o paja de cereal fermentada, restos de plantas y residuos de nutrientes inorgánicos (Paredes et al., 2006; CTICH, 2021).

El GC utilizado procede de residuos de origen vegetal de la poda de plantas y/o árboles de jardines, y fue suministrado por Viveros El Arca, S.L. (Salamanca).

Ambos residuos orgánicos (tamaño < 2 mm) se compostaron en pilas durante 2 – 6 meses en condiciones aeróbicas, con el fin de incrementar su grado de uniformidad y obtener un producto estable. La caracterización fisicoquímica de las enmiendas orgánicas

(referidas a materia seca) se realizó por los métodos habituales de análisis de suelos (Sparks, 1996; Marín–Benito, 2012) y se describen en el apartado 3.2. Métodos experimentales. Sus principales características fisicoquímicas se recogen en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas de las enmiendas orgánicas

Características fisicoquímicas	SMS	GC
pH	7.9	7.2
Conductividad eléctrica (S/m)	0.8	0.2
Cenizas (%)	40.6	54.0
Humedad (%)	37.7	48.6
MO <sup>a</sup> (%)	59.4	46.0
CO <sup>b</sup> (%)	35.0	26.7
COD <sup>c</sup> (mg g <sup>-1</sup> )	11.9	7.2
N (%)	2.3	1.1
C/N	15.2	24.3
CIC <sup>d</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	35.1	41.4

<sup>a</sup> MO, Materia Orgánica, <sup>b</sup> CO, Carbono Orgánico, <sup>c</sup> COD, Carbono Orgánico Disuelto, <sup>d</sup> CIC, Capacidad de Intercambio Catiónico

### 3.1.2 Herbicidas e ion trazador

Se seleccionaron los herbicidas clortoluron (CTL), flufenacet (FNC) y diflufenican (DFN), que presentan actividad herbicida selectiva y controlan malas hierbas en pre– y post–emergencia en cereales de invierno. Cada compuesto pertenece a distinto grupo químico y presentan estructuras y características fisicoquímicas diferentes (solubilidad en agua, hidrofobicidad, potencial de lixiviación, etc.) (**Tabla 2**). Fueron seleccionados por su uso continuado en cultivos de cereales de Castilla y León, y debido a su presencia y la de sus productos de degradación en las aguas superficiales y subterráneas constatadas en los últimos años.

Los herbicidas fueron utilizados en el campo bajo las formulaciones comerciales Erturon<sup>®</sup> (CTL 50% p/v, Cheminova Agro, S.A., Madrid) y Herold<sup>®</sup> (FNC 40% + DFN 20% p/v, Bayer CropScience, S.L., Valencia) (**Figura 9**). Los estándares analíticos de los

tres herbicidas (> 99.5% pureza) y de sus principales metabolitos, desmetilclortoluron, flufenacet ácido etanosulfónico (FNC–ESA) y flufenacet oxalato (FNC–OA) (> 99.3% pureza), fueron suministrados por Sigma Aldrich Química, S.A. (Madrid). El ion trazador aplicado para describir las características dispersivas de los herbicidas fue el bromuro (KBr, VWR International, Lovaina, Bélgica, 99.8% pureza) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Formulaciones comerciales de herbicidas e ion trazador: a) Erturon<sup>®</sup>, b) Herold<sup>®</sup>, y c) KBr

### Clortoluron (CTL)

Clortoluron es el nombre común del herbicida conocido químicamente por la IUPAC como 3-(3-cloro-p-tolil)-1,1-dimetilurea perteneciente a la familia de las fenilureas. Es moderadamente soluble en agua, volátil, con baja hidrofobicidad, y con un alto potencial de lixiviación y alta movilidad hacia las aguas subterráneas (EC, 2005). El CTL se ha detectado con frecuencia en aguas superficiales y subterráneas, y en algunos casos a concentraciones más altas que las permitidas por la UE ( $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Carabias–Martínez et al., 2003; Kotrikla et al., 2006; Fingler et al., 2017; Casado et al., 2019). Es moderadamente persistente en el suelo pero tiende a no serlo en el agua debido a la rápida fotólisis acuosa. La  $DT_{50}$  del CTL varía entre 13 y 92 días en condiciones de laboratorio (PPDB, 2019), y su disipación se debe principalmente a la transformación microbiana (ElGouzi et al., 2015). Su principal producto de degradación en el suelo es el desmetilclortoluron, cuyo nombre químico según la IUPAC es 3-(3-cloro-p-tolil)-1-metilurea. Presenta una alta movilidad y valores de  $DT_{50}$  que van de 52 a 66 días en condiciones de laboratorio (PPDB, 2019). Este metabolito se evaluó cuantitativamente en los estudios de degradación, disipación y movilidad del CTL (**Tabla 2**).

El CTL es un herbicida de contacto y residual, comúnmente utilizado en el control selectivo en pre- o post-emergencia de malas hierbas tanto de hoja ancha como de gramíneas, en la producción de cereales, algodón y frutas. Su uso en España está autorizado en tres cultivos: trigo, cebada y triticale. Por lo general, se suministra como un concentrado soluble o en gránulos humectables que son mezclados con agua y aplicados en forma de lluvia fina (PPDB, 2019). Es absorbido por las raíces y las hojas durante la germinación y la emergencia, pero no se transloca en el interior. Esta acción pre-emergente es más prolongada en suelos arcillosos con bajo contenido en MO y escasa humedad. En post-emergencia se absorbe vía foliar de los pastos jóvenes y en crecimiento activo. Actúa como inhibidor del fotosistema II (FSII) evitando la fotosíntesis en la reacción de Hill (De Liñán, 2021). Bloquea el transporte de electrones a través de la interacción con un polipéptido en la membrana de los cloroplastos. La clorofila absorbe la energía luminosa para activar el flujo de electrones desde el agua, y si la energía de excitación no es utilizada porque el flujo de electrones está detenido, puede excitar al oxígeno, y esta forma altamente dañina de oxígeno puede interactuar con los lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y demás moléculas celulares provocando la desorganización celular, síntomas fitotóxicos en la planta (clorosis, necrosis), y finalmente la muerte de la misma. El CTL presenta una moderada toxicidad para las aves, lombrices de tierra y mayoría de los organismos acuáticos, una baja toxicidad para los mamíferos y no es tóxico para las abejas (PPDB, 2019). Sin embargo, los análisis biológicos revelan que el CTL se bioacumula con facilidad en los cultivos y vegetales, razón por la cual se ha prestado especial atención a la adsorción, movilidad y transformación de este herbicida (Benny et al., 2004; Gao et al., 2007).

### **Flufenacet (FNC)**

Flufenacet es el nombre común del herbicida conocido químicamente por la IUPAC como 4'-fluoro-N-isopropil-2-[5-(trifluorometil)-1,3,4-tiadiazol-2-iloxi]acetanilida, que pertenece a la familia de las oxiacetamidas. Es moderadamente soluble en agua y presenta una alta hidrofobicidad y adsorción (EC, 2003). No es un compuesto muy volátil, y bajo ciertas condiciones, puede ser persistente en el suelo y los sistemas agua/sedimento (PPDB, 2019). Se ha observado baja movilidad para el FNC (Rouchaud et al., 1999; Milan et al., 2015), sin embargo ha sido detectado en aguas superficiales (Casado et al., 2019) y el riesgo de contaminación de aguas subterráneas en suelos extremadamente permeables es alto (USEPA, 1998). Por tanto, su movilidad dependerá de las condiciones climáticas, el

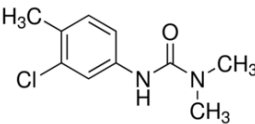
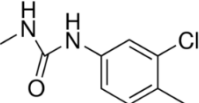
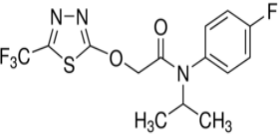
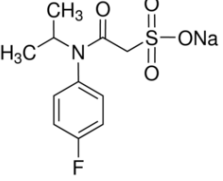
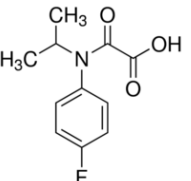
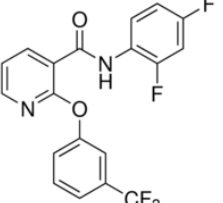
tiempo transcurrido entre la fecha de la aplicación y el primer evento de precipitación, y las propiedades del suelo (USEPA, 1998; Milan et al., 2015; Willkommen et al., 2019). En condiciones de laboratorio, los valores  $DT_{50}$  de FNC oscilan entre 7.0 y 37.4 días (PPDB, 2019). Sus principales productos de degradación en el suelo son: FNC-ESA cuyo nombre químico según la IUPAC es ácido 2-(4-fluoro-*N*-propan-2-ilanilino)-2-oxoetanosulfónico y FNC-OA cuyo nombre químico es ácido ((4-fluorofenil) (isopropil)amino) oxoacético. En condiciones de laboratorio, los valores de  $DT_{50}$  de FNC-ESA y FNC-OA son 302 y 11.1 días, respectivamente. El alto potencial de lixiviación de FNC-ESA en el suelo (índice GUS= 7.20) representa un grave peligro para la calidad del agua (EC, 2003; Ulrich et al., 2018; PPDB, 2019). Ambos metabolitos se evaluaron cuantitativamente en los estudios de degradación, disipación y movilidad del FNC (**Tabla 2**).

El FNC es un herbicida de amplio espectro utilizado en el control en pre- o post-emergencia contra malas hierbas de hoja ancha y de gramíneas anuales y de algunas dicotiledóneas, y a menudo es utilizado junto con otros herbicidas. Se aplica comúnmente en pre-siembra en tomate, en pre-emergencia en maíz, patata, girasol y soja, y en post-emergencia temprana en cereales. Su uso en España está autorizado en cuatro cultivos: trigo, cebada, centeno y triticale. Su modo de acción es sistémico, es absorbido por las raíces, y transportado vía apoplasto hacia los meristemas, inhibiendo el desarrollo de malas hierbas y la proliferación y crecimiento celular por completo en las zonas meristémicas de las raíces y los brotes. Actúa sobre el metabolismo de los ácidos grasos de cadena muy larga (PPDB, 2019; De Liñán, 2021). Sin embargo, no se ven afectadas las pro, meta, ana y telofase de la división celular pero se reduce el índice mitótico. Las plantas tolerantes se detoxifican rápidamente por acción de las glutatión-transferasas. Además, es moderada o altamente tóxica para la mayoría de la fauna y flora, con excepción de las abejas, donde la toxicidad es baja (PPDB, 2019).

### **Diflufenican (DFN)**

Diflufenican es el nombre común del herbicida conocido químicamente por la IUPAC como 2,4-difluoro-2-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-*m*-toliloxi) nicotinanilida, perteneciente a la familia de las piridina-carboxamidas. Presenta baja solubilidad en agua, baja lixiviación, alta hidrofobicidad y una persistencia moderada en el suelo. El valor de  $DT_{50}$  de este herbicida es de 95 días aproximadamente en condiciones de laboratorio (**Tabla 2**) y,

**Tabla 2.** Principales características fisicoquímicas de los herbicidas y sus metabolitos evaluados en el presente trabajo

Nombre común y estructura química	S <sub>agua</sub> <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	K <sub>oc</sub> /K <sub>foc</sub> <sup>c</sup> (mL g <sup>-1</sup> )	DT <sub>50</sub> lab <sup>d</sup> (días)	DT <sub>50</sub> campo <sup>e</sup> (días)	Índice GUS <sup>f</sup>
Clortoluron 	74	2.5	196	59	34	3.02
Desmetilclortoluron 	—	—	248	59	—	2.84
Flufenacet 	51	3.5	273.3	19.7	39.0	2.02
Flufenacet-ESA 	5500	—	12.5	302	—	7.20
Flufenacet-OA 	—	—	14.0	11.1	—	2.98
Diflufenican 	0.05	4.2	5504	95.5	64.6	1.29

<sup>a</sup> S<sub>agua</sub>, solubilidad en agua a 20 °C; <sup>b</sup> K<sub>ow</sub>, coeficiente de reparto octanol/agua a pH 7 y 20 °C; <sup>c</sup> K<sub>oc</sub>/K<sub>foc</sub>, coeficiente de adsorción normalizado al contenido de carbono orgánico del suelo; <sup>d</sup> DT<sub>50</sub> lab, tiempo de disipación del 50% o vida media del compuesto en condiciones de laboratorio a 20 °C; <sup>e</sup> DT<sub>50</sub> campo, tiempo de disipación del 50% o vida media del compuesto en condiciones de campo; <sup>f</sup> Índice GUS, indicador de movilidad potencial (puntuación de ubicuidad en aguas subterráneas) (PPDB, 2019).

entre 4 y 5 meses en suelos arcillo-limosos. A mayor temperatura mayor es su velocidad de degradación (De Liñan, 2021). Sus principales productos de degradación en el suelo son: 2-(3-trifluorometilfenoxi) nicotinamida y ácido 2-(3 trifluorometilfenoxi) nicotínico. En condiciones de laboratorio los metabolitos presentan valores de  $DT_{50}$  de 191.6 y 20.1 días, respectivamente. El primer metabolito presenta una alta persistencia en el suelo y ambos presentan una alta lixiviación. Estos metabolitos no se evaluaron en el presente trabajo. El DFN es un herbicida ampliamente utilizado en pre- o post-emergencia temprana contra dicotiledóneas, selectivo en cereales de invierno, y a menudo se usa en mezclas (PPDB, 2019).

Cuando se aplica en pre-emergencia, es fuertemente absorbido entre los 2 – 3 primeros cm del suelo formando una capa continua en la superficie que es resistente al arrastre por el agua y persistente durante el ciclo vegetativo del cultivo. Es absorbido por vía foliar, caulinar (tallos jóvenes) y radical. Forma una capa delgada en la superficie del suelo a través de la cual deben pasar las malezas en germinación absorbiendo el químico, y una vez absorbido es transportado hacia los tejidos apicales inhibiendo la biosíntesis de los carotenoides con lo que, en presencia de un exceso de iluminación, se produce oxígeno naciente que destruye la clorofila, provocando una clorosis en los nuevos brotes seguida de una decoloración malva rosácea de los mismos y causando una clorosis que finalmente produce la desecación total de las plántulas (De Liñan, 2021). Su velocidad de acción es directamente proporcional a la intensidad de luz, siendo más lenta en aplicaciones en invierno, donde los efectos pueden tardar en observarse unas 6–8 semanas. Sólo es activo sobre tejidos vegetales jóvenes y en desarrollo. Se metaboliza débilmente en la planta, sea o no sensible. Su modo de acción no se ve perjudicado en exceso por las condiciones climáticas, es activo incluso en tiempo frío, y no es arrastrado por las lluvias.

### 3.1.3 Suelo

El experimento de campo se llevó a cabo en parcelas experimentales en la finca experimental Muñovela del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) (40° 54' 15'' N latitud y 5° 46' 26'' O longitud), y tuvo una duración de dos años (2016–2018). Se seleccionó un área para la preparación de las parcelas experimentales a partir de una exploración inicial de la variabilidad espacial de las propiedades de los suelos en la zona donde se ubicaron las parcelas (**Figura 10**).



**Figura 10.** Fotografía aérea de las parcelas experimentales en la finca experimental Muñovela (Barbadillo, Salamanca).

De acuerdo con el IUSS WRB (2015), el suelo sobre el que se llevó a cabo el experimento de campo y laboratorio es un Cambisol eútrico–crómico con una predominante textura franco arenosa (0–90 cm de profundidad: 72.9–80.4% arena, 4.6–7.4% limo, 14.9–19.7% arcilla) y arcillo–arenosa (90–160 cm de profundidad: 22% arena, 9.7% limo, 68.3% arcilla), que ha estado dedicado habitualmente al cultivo de cereal. Como cultivo se seleccionó el trigo de invierno por ser representativo de la región de estudio (**Figura 11**).



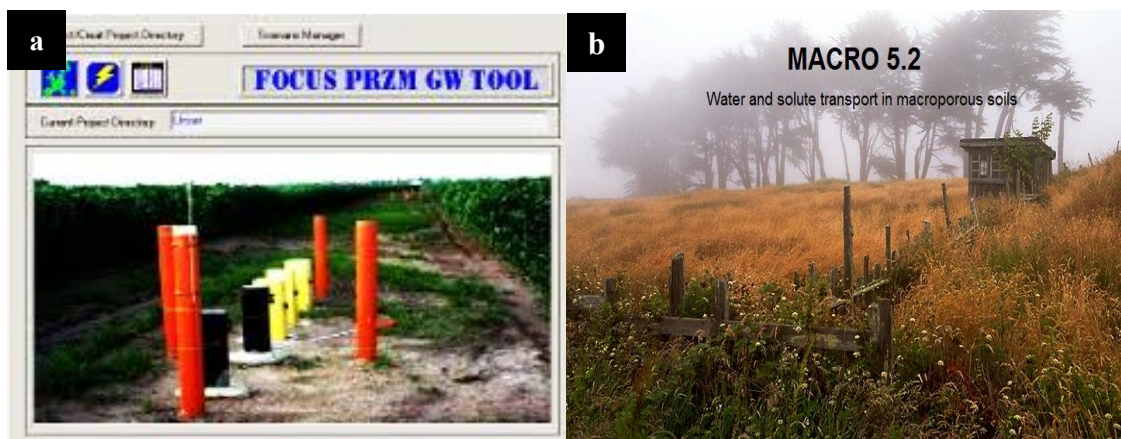
**Figura 11.** Cultivo de trigo de invierno en parcelas experimentales

### 3.1.4 Modelos matemáticos de destino medioambiental de pesticidas: PRZM y MACRO

Se seleccionaron los modelos unidimensionales PRZM 3.21 (Carsel et al., 2005) y MACRO 5.2 (Larsbo and Jarvis, 2003) para modelizar la disipación y movilidad de los



herbicidas en el campo (**Figura 12**). Estos modelos difieren principalmente en su descripción del transporte de agua y solutos (MACRO muestra una descripción más compleja del transporte de agua que PRZM) y simulan los principales procesos involucrados en el destino de los pesticidas en el medio ambiente, cada uno con sus ventajas y limitaciones. Estos modelos son utilizados a nivel europeo para el registro de pesticidas y la evaluación de su riesgo medioambiental (FOCUS, 2000). En la **Tabla 3** se incluye un resumen descriptivo de los procesos más importantes simulados por los dos modelos matemáticos.



**Figura 12.** Portada de los programas de modelos matemáticos para la evaluación del destino medioambiental de pesticidas: a) PRZM 3.2, y b) MACRO 5.2

El **modelo PRZM (Pesticide Root Zone Model)** es un modelo unidimensional, dinámico y compartimental utilizado para simular el flujo de agua y el movimiento de solutos dentro de la zona no saturada del suelo que se localiza inmediatamente por debajo de la zona de la raíz de la planta. Es un modelo capacitivo que se basa en una aproximación “tipo balancín” donde el agua sólo se filtrará de la capa superior a la siguiente si se excede la capacidad de campo de la primera. El transporte de los solutos en el suelo se simula por la ecuación de advección–dispersión que comprende los procesos de adsorción, degradación, asimilación por las plantas, lixiviación, lavado foliar, volatilización (MACRO no incluye una descripción completa de este proceso), y erosión y esorrentía superficial (MACRO no tiene en cuenta estos dos procesos), utilizando la “Ecuación universal modificada de pérdida de suelo” (MUSLE) y la técnica de “Número de curva modificada del Servicio de Conservación de Suelo” del USDA, respectivamente. La dispersión y difusión en la fase líquida y gaseosa se describe por la ley de Fick. Las suposiciones adicionales del modelo incluyen cinéticas de primer orden para la degradación de los pesticidas en el suelo, aunque

PRZM también permite el uso de una ecuación bifásica para este proceso (a diferencia de MACRO), junto con un equilibrio de adsorción instantáneo, lineal y una isoterma de adsorción de Freundlich. Además, considera el efecto del contenido de humedad del suelo y la temperatura del suelo sobre la tasa de degradación de los pesticidas. Este modelo puede simular hasta tres compuestos químicos diferentes o un compuesto y dos metabolitos simultáneamente, y se distingue por su eficiencia para simular la concentración de un compuesto químico en el perfil de un suelo donde sus características cambian con la profundidad. La evapotranspiración se estima a partir de los datos de evaporación y se divide entre la evaporación de la interceptación del cultivo, la evaporación del suelo y la transpiración del cultivo. El movimiento del agua se simula mediante el uso de parámetros del suelo generalizados, incluida la capacidad de campo, el punto de marchitez y el contenido de agua de saturación (Carsel et al., 2005).

El **modelo MACRO (Water and solute transport in macroporous soils)** es un modelo unidimensional de doble permeabilidad que considera los flujos preferenciales, el calor y el transporte de solutos reactivos en la matriz del suelo, dividiendo la porosidad del suelo en dominios de microporos y macroporos, cada uno caracterizado por diferentes flujos de agua, concentraciones de soluto, densidad de flujo de soluto, grado de saturación y conductividad. El límite entre los dos dominios está definido por una carga de presión de agua del suelo cercana a la saturación, y su contenido de agua y conductividad hidráulica asociados. El flujo de agua en los microporos del suelo se rige por la ecuación de Richards y el transporte de solutos por la ecuación de convección–dispersión, mientras que en el dominio de los macroporos el flujo de agua es impulsado por la gravedad (ecuación de onda cinemática) y el transporte de solutos es sólo convectivo. El intercambio de masa entre los dominios de flujo se calcula con expresiones aproximadas de primer orden, basadas físicamente, en un agregado efectivo de medio ancho. Las suposiciones adicionales del modelo incluyen cinéticas de primer orden para la degradación de los pesticidas en el suelo (micro y macroporos, fases sólida/líquida), junto con un equilibrio de adsorción instantáneo y una isoterma de adsorción lineal o de Freundlich en cada dominio de poro. Además, considera el efecto del contenido de humedad del suelo, la temperatura del suelo y la profundidad sobre la tasa de degradación de los pesticidas. Por lo tanto, la estructura del modelo permite la evaluación cuantitativa del impacto del flujo de macroporos en el transporte de solutos en suelos estructurados. Este modelo puede simular trazadores no reactivos (ej. bromuro), tritio y pesticidas, incluido un único metabolito.

**Tabla 3.** Principales procesos simulados por los modelos PRZM y MACRO.

PROCESOS	PRZM	MACRO
<i>Agua</i>		
Hidrología	Aproximación “tipo balancín”	Microporos: Ecuación de Richard Macroporos: Flujo por gravedad Capilaridad Flujos preferenciales
<i>Pesticidas</i>		
Adsorción	Lineal o Freundlich Equilibrio instantáneo, reversible o f(tiempo)	Lineal o Freundlich Equilibrio instantáneo o f(tiempo) y adsorción cinética en micro- y macroporos
Degradación	Cinéticas de 1 <sup>er</sup> orden o bifásicas	Cinéticas de 1 <sup>er</sup> orden y coeficientes de velocidad separados para fase sólida y líquida de micro- y macroporos
Volatilización	Desde el suelo o la superficie de la planta	Relación empírica o coeficiente global (hojas)
Absorción de la planta	f(transpiración)	f(transpiración)
Transporte de solutos	Convección + dispersión numérica	Microporos: convección–dispersión  Macroporos: convección (flujo por gravedad)
Erosión	Ecuación universal modificada de pérdida de suelo	–
Escorrentía superficial	Curva numérica aproximada	–
<i>Cultivo</i>		
Crecimiento de cultivo	Lineal	Bilineal (altura, profundidad de raíz) y lineal + dos fases (GLAI): cultivo anual Constante: cultivo perenne
<i>Temperatura</i>		
Temperatura del suelo	Ecuación de conducción de calor	Ecuación de conducción de calor

En MACRO se considera un balance hídrico completo que incluye el movimiento ascendente de agua y soluto (a diferencia de PRZM “tipo balancín”), tratamientos de precipitación (lluvia, manto de nieve y riego), flujo de agua variablemente saturado, pérdidas en los sistemas de drenaje de campo, evapotranspiración y absorción por las raíces. El crecimiento del cultivo en ambos modelos se describe mediante un modelo simple donde tanto el índice de área foliar (LAI) como la profundidad de enraizamiento son función de la

etapa de desarrollo del cultivo. La evapotranspiración potencial se calcula usando la ecuación de Penman Monteith o puede ser pre-calculada y proporcionada por el usuario, y puede dividirse en evaporación y transpiración reales mediante funciones de reducción. Finalmente, el modelo asume que la escorrentía ocurre cuando se excede la capacidad de infiltración (Larsbo and Jarvis, 2003).

### **3.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES**

#### **3.2.1 Caracterización de las enmiendas orgánicas**

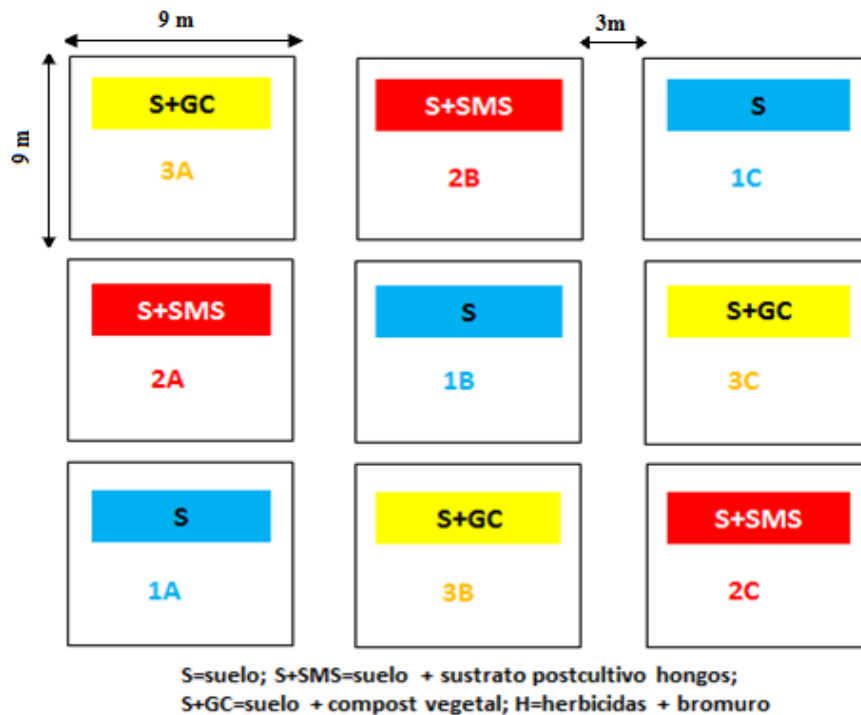
Las características fisicoquímicas de los residuos orgánicos se determinaron en muestras molidas y tamizadas en un tamiz de malla con paso de luz  $< 2$  mm. El pH y la conductividad eléctrica se determinaron en una suspensión residuo/agua ultrapura Milli-Q (Millipore) (relación 1:2.5 y 1:5 p/v, respectivamente). La conductividad eléctrica se evaluó utilizando un conductímetro LF91 (WTW, Weilheim, Alemania). Su contenido de MO (%) se calculó como 100-% de cenizas, siendo el porcentaje de cenizas determinado por la diferencia de peso tras la ignición de 5 g de los residuos a 540 °C durante 24 h.

El COD se determinó en una suspensión de residuo/agua ultrapura Milli-Q (relación 1:100 p/v) después de agitar 24 h a 20 °C, centrifugar durante 20 min a 10000 rpm y filtrar a través de filtros Minisart NY 25  $< 0.45$   $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim Biotech, Alemania). El contenido de COD se midió en un analizador de carbono orgánico Shimadzu 5050 (Shimadzu, Columbia, MD, USA). El CO y el N se determinó usando un analizador elemental LECO CN628 (LECO Corporation, Saint Joseph, M, USA). El P asimilable se determinó por el método de Olsen, mientras que el K, Ca y Mg asimilables se extrajeron con acetato de amonio a pH 7 y se cuantificaron usando un espectrómetro de emisión de plasma óptico acoplado inductivamente modelo Varian 720-ES (Varian Instruments, Palo Alto, CA, USA). La humedad se determinó mediante diferencia de peso tras secar 5 g de los residuos a 110 °C durante 24 h (Sparks, 1996; Marín-Benito, 2012).

#### **3.2.2 Preparación de parcelas experimentales, aplicación de residuos orgánicos, herbicidas e ion trazador**

Se estableció un diseño de 12 parcelas experimentales de 81 m<sup>2</sup> (9 m  $\times$  9 m) distribuidas al azar: nueve parcelas con tres tratamientos diferentes por triplicado correspondientes a suelo sin enmendar más herbicidas (S+H), suelo enmendado con SMS

más herbicidas (S+SMS+H), y suelo enmendado con GC más herbicidas (S+GC+H) y tres parcelas más por tratamiento que no fueron tratadas con ninguno de los herbicidas para ser utilizadas como control en la determinación de los parámetros bioquímicos del suelo (S, S+SMS y S+GC). Las parcelas se diseñaron con una separación de 3 m entre ellas (**Figura 13**).



**Figura 13.** Diseño experimental de las parcelas tratadas con herbicidas en campo

Las enmiendas orgánicas, SMS y GC, se aplicaron a la dosis de 140 y 85 t ha<sup>-1</sup> (peso seco), respectivamente. Estos residuos orgánicos se esparcieron uniformemente en el campo con un tractor y se incorporaron en los 20 cm superficiales del suelo con un rotavator en noviembre de 2016 (una sola vez en los dos años de experimento) (**Figura 14**).

Todas las parcelas se cultivaron anualmente con trigo de invierno y se gestionaron de acuerdo con las buenas prácticas agrícolas. La siembra del trigo se llevó a cabo en hileras con maquinaria adecuada tras un período de estabilización de los residuos orgánicos en el suelo. El trigo se sembró el 14 de noviembre de 2016 y se cosechó el 3 de julio de 2017 (1<sup>er</sup> ciclo de cultivo). Después de la cosecha, se mantuvo un suelo desnudo durante el período de barbecho, y se volvió a sembrar el 2 de noviembre de 2017 y se cosechó el 23 de julio de 2018 (2<sup>o</sup> ciclo de cultivo). El experimento de campo finalizó el 30 de noviembre de 2018 (572 días después de la primera aplicación de los herbicidas).

Según los registros de la finca experimental, el área seleccionada no fue previamente tratada con los pesticidas utilizados en el estudio. Igualmente, se realizó un análisis de fondo inicial del suelo donde se evaluó en el perfil de suelo (0–100 cm) la posible presencia de ion trazador y de los herbicidas estudiados verificando la ausencia de residuos de los compuestos seleccionados. Además, antes de la aplicación de los químicos (herbicidas e ion trazador  $\text{Br}^-$ ), se abrieron tres perfiles de suelo (uno por tratamiento) en tres parcelas adicionales para la caracterización pedológica del perfil del suelo en el área seleccionada. Se tomaron muestras de suelo de cada uno de los cinco horizontes observados (0–10, 11–30, 31–55, 56–90, 91–160 cm) en los respectivos perfiles de suelo, siempre a una distancia mínima de 0.5 m de los márgenes de la parcela para evitar el efecto borde. La caracterización pedológica de las muestras de suelo sin enmendar y enmendados se realizó tras 30 días de acondicionamiento de los residuos de SMS y GC en el suelo, para reproducir el estado inicial de las muestras de suelo en condiciones de campo lo más fielmente posible. Este tiempo se consideró apropiado para el acondicionamiento previo de los residuos orgánicos en el suelo. Las muestras de suelo se secaron al aire, se tamizaron ( $< 2$  mm) y se determinaron sus características fisicoquímicas y mineralógicas (apartado 3.2.3).



**Figura 14.** Preparación de parcelas experimentales: a) aplicación de residuos orgánicos, b) aplicación de herbicidas e ion trazador, y c) parcela experimental d) vista aérea de las parcelas experimentales

Los herbicidas CTL, FNC, DFN y el ion  $\text{Br}^-$  se aplicaron conjuntamente una vez por ciclo de cultivo a las dosis de 15, 5, 2.5 y 53 kg i.a.  $\text{ha}^{-1}$ , respectivamente. Se aplicaron bajo las formulaciones comerciales indicadas previamente (Erturon<sup>®</sup>, Herold<sup>®</sup> y KBr, respectivamente). Las dosis aplicadas a las parcelas fueron cinco veces la dosis de aplicación agronómica máxima recomendada para cada herbicida. Se utilizaron dosis más altas que las recomendadas con el fin de que los herbicidas permanezcan mínimamente fitodisponibles y mantengan la eficacia de los compuestos contra las malas hierbas, ya que después de aplicar las enmiendas orgánicas hay un incremento en la capacidad del suelo para adsorber los herbicidas. Se utilizó bromuro (KBr) como ion trazador para evaluar a partir de su comportamiento de movilidad las características dispersivas de los herbicidas en el perfil de suelo, ya que no presenta ningún tipo de retención ni degradación en el mismo. Los productos químicos fueron aplicados en pre-emergencia del trigo con una mochila manual (5 L de volumen) acoplada a un pulverizador con 4 boquillas (Figura 14). Se aplicaron el 1 de diciembre de 2016 y el 13 de noviembre de 2017 (346 días después de la primera aplicación).

Las nueve parcelas tratadas con herbicidas fueron equipadas con un tubo de cloruro de polivinilo (PVC) con bases herméticamente selladas (120 cm longitud  $\times$  5.2 cm  $\varnothing$ ) para medir periódicamente el contenido volumétrico de agua del suelo en el perfil y evaluar su evolución temporal en secciones de 20 cm hasta 100 cm de profundidad utilizando una sonda eléctrica portátil Troxler Sentry 200-AP (Troxler International Ltd., NC, USA) (Figura 15). Se registraron en total 38 mediciones del contenido volumétrico de agua del suelo a 20, 40, 60, 80 y 100 cm de profundidad por parcela, desde el 29 de noviembre de 2016 al 30 de noviembre de 2018.



**Figura 15.** a) Parcela equipada con tubo de PVC para medir la humedad del suelo en el perfil usando una sonda eléctrica portátil, y b) sonda portátil Troxler Sentry 200-AP

Para los estudios de modelización, las variables climáticas (precipitación, temperatura máxima, mínima y promedio del aire) fueron monitorizadas diariamente utilizando una estación meteorológica ubicada en la finca experimental. Los datos de radiación solar, evapotranspiración y velocidad del viento se obtuvieron de la estación del aeropuerto de Matacán (a 23 km de la finca Muñovela). Ambas estaciones meteorológicas pertenecen a la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET).

### 3.2.3 Caracterización del suelo sin enmendar y enmendado

Las características fisicoquímicas de los suelos sin enmendar y enmendados (0–100 cm de profundidad) se determinaron en muestras tamizadas usando un tamiz de malla con paso de luz < 2 mm. Las principales características fisicoquímicas del horizonte superficial del suelo sin enmendar y enmendado se recogen en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Características fisicoquímicas del horizonte superficial del suelo (0–10 cm) sin enmendar (S) y enmendado con SMS (S+SMS) o GC (S+GC).

Características fisicoquímicas	S	S+SMS	S+GC
pH	6.3	7.1	7.0
Densidad aparente (g cm <sup>-3</sup> )	1.48	1.23	1.34
CaCO <sub>3</sub> (%)	0.00	1.01	0.00
MO (%)	1.33	4.56	2.92
CO (%)	0.77	2.64	1.69
COD (%)	0.12	0.50	0.38
N (%)	0.05	0.24	0.14
C/N	11.2	12.5	14.9
CIC (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	8.5	10.9	11.0
Mineralogía de arcilla <sup>a</sup>	M, I, K	M, I, K	M, I, K

<sup>a</sup> M, Montmorillonita; I, Ilita; K, Caolinita

La composición granulométrica de los suelos se determinó mediante el método de la pipeta de Robinson. El carbono inorgánico (CI) se determinó como CaCO<sub>3</sub> con un calcímetro Bernard. El CO se calculó como la diferencia entre el C total (medido con el



analizador elemental LECO CN628) y el CI. La MO se calculó a partir de los resultados de CO multiplicados por 1.724 y el COD se determinó en un extracto de suelo/agua relación 1:2 (p/v) como se indicó para las enmiendas orgánicas. La humedad se determinó por diferencia de peso tras secar 5 g de los suelos a 110 °C durante 24 h (Sparks, 1996; Marín-Benito, 2012). Los minerales de arcilla (montmorillonita, illita y caolinita) se identificaron cualitativamente en la fracción de arcilla del suelo mediante la técnica de difracción de rayos X utilizando un difractómetro Philips PW1710 (Eindhoven, The Netherlands) (Robert, 1975).

### **3.2.4 Evaluación de la adsorción de los herbicidas en los distintos horizontes del suelo sin enmendar y enmendado en campo: Experimento de laboratorio**

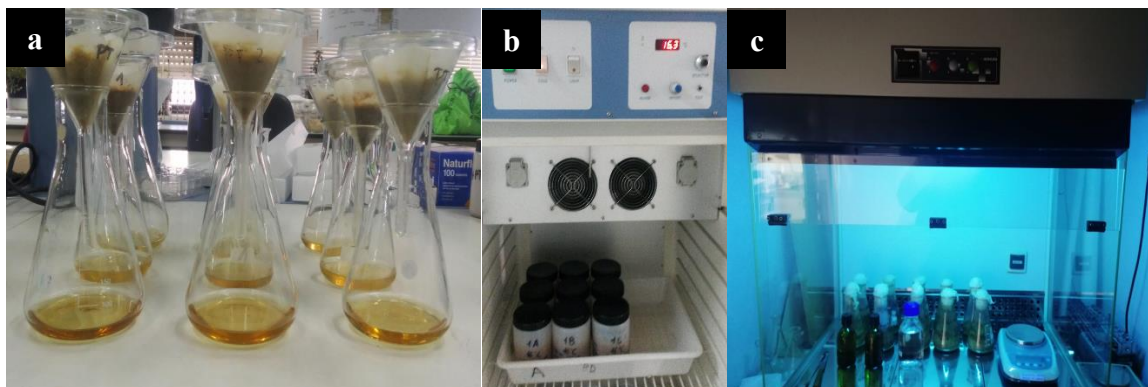
El posible efecto de la adsorción sobre la degradación, disipación y movilidad de los herbicidas se evaluó determinando la cantidad de herbicida adsorbida en los suelos sin enmendar y enmendados. Se tomaron muestras de suelo de tres parcelas experimentales (una por tratamiento) correspondientes a los horizontes 0–10 cm, 11–30 cm, 31–55 cm, 56–90 cm y 91–100 cm del suelo sin enmendar y a los horizontes 0–10 cm y 11–30 cm de los suelos enmendados, en noviembre de 2016 (previo a la aplicación de herbicidas en el campo). Se pesaron por cuadruplicado 5 g de suelo sin enmendar y enmendado (seco y tamizado a < 2 mm) correspondiente a cada horizonte y se añadieron 10 mL de una solución de agua ultrapura Milli-Q + CaCl<sub>2</sub> 0.01 M + herbicidas CTL, FNC y DFN (conjuntamente) a concentraciones de 10 µg mL<sup>-1</sup>, preparada a partir las formulaciones comerciales Erturon<sup>®</sup> y Herold<sup>®</sup>. Las suspensiones se agitaron a 6 °C y 16 °C durante 24 h en una cámara termostatazada, se centrifugaron a 3000 rpm entre 15–30 minutos, se filtró el sobrenadante con filtros de nylon < 0.45 µm (Sartorius Stedim Biotech, Alemania) y se determinaron las concentraciones de equilibrio del herbicida (C<sub>e</sub>, µg mL<sup>-1</sup>) mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detector de fotodiodos y masas (HPLC–DAD–MS). Se consideró que la cantidad de herbicida absorbido (C<sub>s</sub>, µg g<sup>-1</sup>) es la diferencia entre la cantidad inicialmente presente en la solución y la cantidad remanente después de alcanzar el equilibrio.

### 3.2.5 Evaluación de la degradación de los herbicidas y de la formación de sus principales metabolitos en el suelo sin enmendar y enmendado en campo: Experimento de laboratorio

Antes de la aplicación de los herbicidas en campo, se tomaron muestras de suelo sin enmendar y enmendado con ambos residuos procedentes del horizonte superficial (0–10 cm) de las 12 parcelas experimentales en diciembre de 2016. Las muestras fueron individualmente homogeneizadas y tamizadas (< 2 mm). Se pesaron por triplicado 600 g de muestras de suelo para cada tratamiento (S, S + SMS y S + GC) y se añadieron los herbicidas con una dosis combinada de 14 mg CTL + 5.5 mg FNC + 2.75 mg DFN por  $\text{kg}^{-1}$  de suelo seco (dosis aplicadas en el campo correspondientes a cinco veces las dosis agronómicas recomendadas) utilizando las formulaciones comerciales Erturon<sup>®</sup> y Herold<sup>®</sup>, respectivamente. El contenido de humedad del suelo se ajustó al 40% de la capacidad de campo (CC) del respectivo suelo, de acuerdo con el contenido de humedad de cada muestra determinada previamente (**Figura 16a**). Las muestras se incubaron posteriormente en cámaras termostatzadas durante distintos períodos de tiempo en la oscuridad a dos temperaturas con 10 °C de diferencia para el cálculo del factor  $Q_{10}$  (dato requerido para parametrizar los modelos matemáticos): 6 °C (temperatura promedio de invierno donde se ubicaron las parcelas experimentales) y a 16 °C (**Figura 16b**). También se preparó una muestra de suelo esterilizado para cada tratamiento de suelo autoclavando el suelo a 120 °C durante 1 h durante tres días consecutivos. Los suelos esterilizados se trataron con los herbicidas y se incubaron como se indicó anteriormente a las dos temperaturas, y estas muestras se usaron como controles para verificar la degradación química de los herbicidas.

Las pérdidas de humedad se repusieron periódicamente añadiendo agua estéril y los muestreos de los suelos estériles se hicieron en cabina de flujo laminar (**Figura 16c**). El muestreo de suelo se realizó por duplicado a distintos tiempos hasta 67 o 273 días de acuerdo con la velocidad de degradación de cada herbicida. Los tiempos correspondieron a 1, 4, 7, 12, 15, 20, 25, 32, 41, 53, 67, 83, 95, 109, 126, 141, 165, 228 y 273 días después de la aplicación de los herbicidas. Se cuantificó la cantidad de herbicida remanente y la cantidad de metabolitos formados en las muestras de suelo sin enmendar y enmendado, siguiendo el mismo protocolo de extracción, concentración y medida utilizado en el experimento de campo. Se determinaron los parámetros de degradación a partir del ajuste de los datos experimentales a los modelos cinéticos de degradación correspondientes. Los datos de  $DT_{50}$  determinados a 6 y 16 °C para cada herbicida y tratamiento de suelo se utilizaron

para determinar el correspondiente factor  $Q_{10}$  mediante la expresión:  $Q_{10} = DT_{50}(6\text{ °C}) / DT_{50}(16\text{ °C})$ .



**Figura 16.** Experimento de degradación en laboratorio: a) medida de la CC del suelo, b) incubación de suelo a 6 ó 16 °C, y c) cabina de flujo laminar para la manipulación de suelos estériles

### 3.2.6 Evaluación de la movilidad y distribución de los herbicidas, ion trazador y metabolitos en el perfil del suelo sin enmendar y enmendado en campo: Experimento de campo

Los estudios de la movilidad de los herbicidas y del ion trazador, se llevaron a cabo en muestras del perfil del suelo (0–100 cm) (**Figura 17a**) sin enmendar y enmendado con SMS o GC tomadas a distintos períodos de tiempo que correspondieron a: 1, 17, 33, 60, 80, 151, 229 y 339 días después de la primera aplicación de los herbicidas; y a 1, 29, 64, 127, 142, 181 y 225 días después de la segunda aplicación de los herbicidas (correspondientes a 347, 376, 411, 474, 489, 528 y 572 días después de la primera aplicación de los herbicidas). En cada muestreo, se tomaron aleatoriamente cinco muestras de suelo de hasta 100 cm de profundidad con una sonda de 3 cm Ø en cada parcela y se seccionaron en 10 segmentos (cada uno con un espesor de 10 cm). Se obtuvieron muestras de suelo promedio representativas de cada parcela mezclando las cinco sub-muestras correspondientes a la misma profundidad. Las muestras compuestas se colocaron en bolsas de plástico y se transportaron en neveras portátiles al laboratorio, donde se homogeneizaron, tamizaron (< 2 mm) y almacenaron a 4 °C hasta su análisis mediante HPLC–DAD–MS (herbicidas) o cromatografía iónica ( $\text{Br}^-$ ). Las cantidades de CTL, FNC, DFN y  $\text{Br}^-$  determinado se expresaron como porcentajes de la cantidad inicial. Los valores de pH, CO y COD se determinaron a diferentes tiempos después de las aplicaciones de los productos químicos para evaluar su influencia en la movilidad de los herbicidas. Estos análisis se llevaron a cabo

en el Servicio de Análisis e Instrumentación del IRNASA–CSIC, así como en el propio laboratorio.



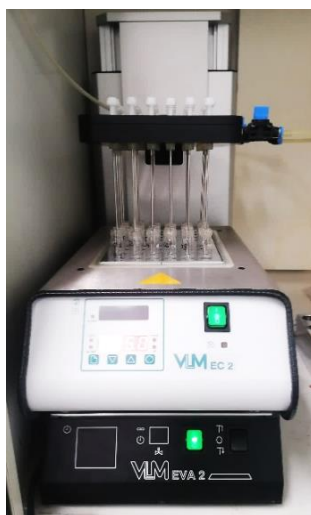
**Figura 17.** Toma de muestras de suelo: a) en profundidad, y b) superficial

### **3.2.7 Evaluación de las cinéticas de disipación de los herbicidas y cinéticas de formación de sus principales metabolitos en el suelo sin enmendar y enmendado en campo: Experimento de campo**

Los estudios de disipación de los herbicidas y de formación de sus principales metabolitos, se llevaron a cabo en muestras de suelo sin enmendar y enmendado con SMS o GC tomadas *in situ* del tramo superficial (0–10 cm) (**Figura 17b**) a distintos periodos de tiempo que correspondieron a: 1, 5, 10, 13, 17, 21, 33, 38, 45, 53, 60, 70, 80, 89, 104, 124, 145, 151, 173, 199, 229, 269, 311 y 339 días después de la primera aplicación de los herbicidas; y a 1, 3, 6, 10, 17, 29, 37, 59, 64, 84, 104, 119, 127, 142, 162, 181, 203, 225 días después de la segunda aplicación de los herbicidas (correspondientes a 347, 350, 353, 357, 364, 376, 384, 406, 411, 431, 451, 466, 474, 489, 509, 528, 550, 572 días después de la primera aplicación de los herbicidas). El primer muestreo tuvo lugar 24 h después de la aplicación de los herbicidas para determinar la concentración inicialmente aplicada. En cada muestreo, se tomaron aleatoriamente cinco sub-muestras del suelo superficial de 10 cm de profundidad en cada parcela, y se obtuvieron muestras promedio representativas de suelo mezclándolas. Las muestras compuestas se colocaron en bolsas de plástico y se transportaron en neveras portátiles al laboratorio, donde se homogeneizaron y tamizaron (< 2 mm), y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis mediante HPLC–DAD–MS.

### 3.2.8 Determinación cuantitativa de los herbicidas y metabolitos

La extracción y análisis de los herbicidas y sus principales metabolitos formados durante los diferentes procesos evaluados en el conjunto del experimento se llevó a cabo a los distintos tiempos de muestreo después de la aplicación de los herbicidas en los suelos de las parcelas experimentales. A las muestras de cada segmento de 10 cm de suelo (0–100 cm) sin enmendar y enmendado tratado con los herbicidas, se les determinó su humedad, y se pesaron por triplicado 6 g de suelo húmedo que fueron extraídos con 12 mL de acetonitrilo (relación 1:2), se agitaron por sonicación durante 1 h en un baño de ultrasonidos a 20 °C y posteriormente se sometieron a agitación mecánica intermitente por rotación durante 24 h en una cámara termostatzada a 20 °C. Las suspensiones se centrifugaron a 3000 rpm durante 7 min y el sobrenadante se filtró con filtros Minisart NY 25 (Sartorius Stedim Biotech, Germany) de < 0.45 µm de tamaño de poro. Para concentrar los herbicidas y metabolitos se tomó un volumen de 8 mL de los extractos de suelo y se evaporó hasta sequedad a 25 °C bajo corriente de nitrógeno (**Figura 18**) usando un evaporador EVA– EC2–L (VLM GmbH, Bielefeld, Alemania). El residuo fue redissuelto en 0.75 mL de acetonitrilo. Finalmente, los extractos orgánicos de suelo (sin concentrar o concentrados) se transfirieron a viales de vidrio para su posterior análisis.



**Figura 18.** Evaporador de nitrógeno para concentrar los extractos de herbicidas y metabolitos

La determinación cuantitativa de la concentración de equilibrio de los herbicidas y metabolitos se realizó mediante HPLC–DAD–MS (**Figura 19**). El cromatógrafo utilizado fue un modelo Waters (Waters Assoc., Milford, MA, USA), equipado con un sistema de

bombeo multisolvente modelo e2695 con inyector automático, un detector de fotodiodos en cadena modelo 996 (DAD) y un espectrómetro de masas con cuádruplo simple modelo Micromass ZQ (MS) equipado a su vez con una interfaz de electrospray (ESI) y un sistema de adquisición y procesamiento de datos Empower Pro de Waters Technologies. La columna de separación utilizada fue una Luna PFP2 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) de fase C18 con modo de separación en fase reversa (150 mm longitud  $\times$  4.6 mm  $\varnothing$ ), y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y 100 Å de tamaño de poro, acoplada a una pre-columna de C18 de Waters (Milford, MA, USA) a temperatura ambiente. La fase móvil en elución isocrática empleada fue 80% de acetonitrilo grado UHPLC y 20% de agua ultrapura Milli-Q (Millipore) acidificada con 1% de ácido fórmico (relación 80:20). La velocidad de flujo de la fase móvil fue 0.4 mL  $\text{min}^{-1}$  y el volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Las temperaturas de la fuente y de desolvatación utilizadas fueron 120  $^{\circ}\text{C}$  y 300  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Los voltajes del capilar, del cono, del extractor y de las lentes fueron 3.08 kV, 20.6 y 0.3 V, respectivamente.

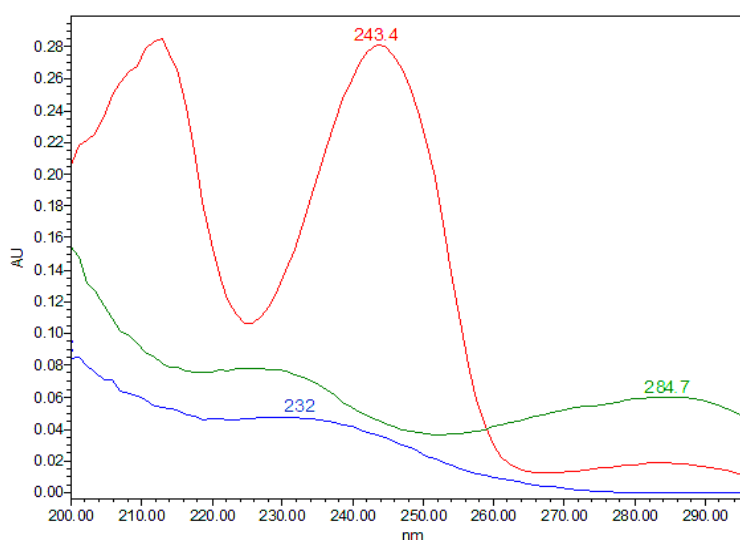


**Figura 19.** Cromatógrafo líquido de alta eficacia acoplado a detector de fotodiodos y masas (HPLC–DAD–MS) para la cuantificación de herbicidas y metabolitos

Con el fin de optimizar inicialmente la detección de todos los compuestos se inyectaron los patrones de cada herbicida y metabolito directamente en el equipo operando en modo Scan. El análisis cuantitativo se realizó posteriormente a partir del área bajo el pico de cada compuesto obtenido en modo SIR. Las curvas de calibración fueron determinadas automáticamente por el equipo considerando las áreas de los picos eluidos correspondientes

a los patrones de distintas concentraciones. Estas curvas se realizaron en soluciones de los extractos de los adsorbentes (S, S+SMS, S+GC) para evitar el posible efecto matriz, y se inyectó un blanco cada 30 muestras para verificar el efecto memoria. El tiempo de análisis de cada muestra fue de 14 min.

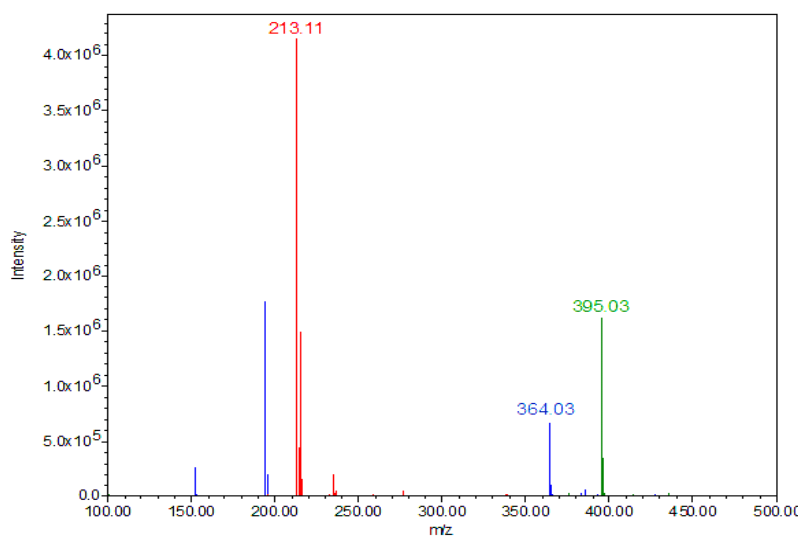
La detección de los herbicidas por HPLC–DAD se realizó a una longitud de onda de 243.4 nm para el CTL, 232.8 nm para el FNC y 284.0 nm para el DFN (**Figura 20**). La detección de los herbicidas por HPLC–MS se realizó por monitorización del ion molecular positivo (m/z)  $[M+H^+]$  siendo 213.04 para el CTL, 364.03 para el FNC y 395.16 para el DFN (**Figura 21**).



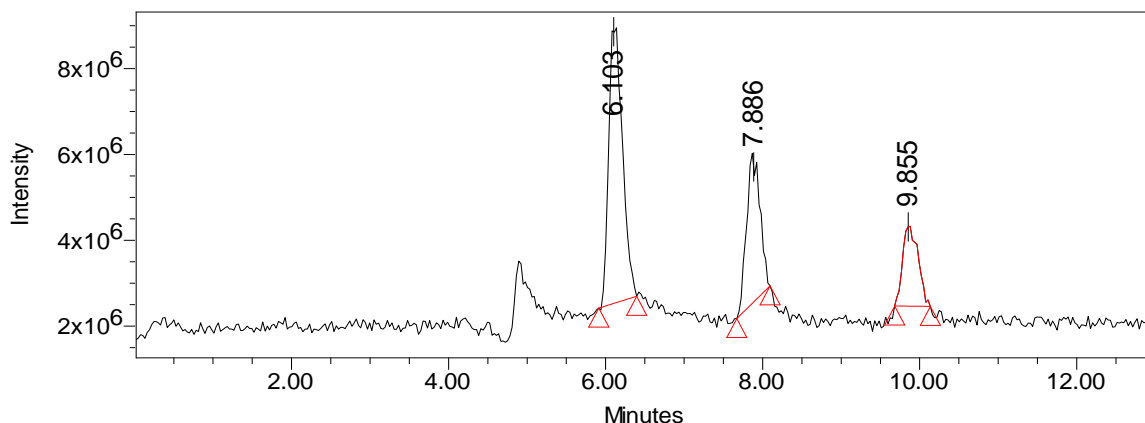
**Figura 20.** Registro del espectro completo UV–Vis obtenido por el HPLC–DAD de los picos de clortoluron ( $\lambda=243$  nm), flufenacet ( $\lambda=232$  nm) y diflufencian ( $\lambda=284$  nm) en respuesta a la absorbancia de los analitos en función de la longitud de onda

En el caso de los metabolitos, se realizó también por monitorización del ion molecular positivo (m/z)  $[M+H^+]$  siendo 198.65 para el desmetilclortoluron, y del ion molecular negativo (m/z)  $[M-Na^+]$  siendo 274.26 para el FNC–ESA y 152.14 para el FNC–OA. Bajo estas condiciones de medida, los tiempos de retención de los herbicidas CTL, FNC y DFN fueron 6.1, 7.9 y 9.4 min (**Figura 22, 23**), respectivamente, mientras que los tiempos de retención de los metabolitos desmetilclortoluron, FNC–ESA y FNC–OA fueron 5.8, 7.7 y 6.5 min, respectivamente. El límite de detección (LOD) para CTL fue de  $0.002 \mu\text{g mL}^{-1}$  para todos los tratamientos y el límite de cuantificación (LOQ) varió entre 0.007 (S), 0.006

(S + GC) y  $0.008$  (S + SMS)  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En el caso del FNC, el LOD varió entre  $0.004$  (S),  $0.003$  (S + SMS) y  $0.005$   $\mu\text{g mL}^{-1}$  (S + GC), y el LOQ varió entre  $0.015$  (S),  $0.009$  (S + SMS) y  $0.016$  (S + GC)  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Las recuperaciones del método de extracción se determinaron añadiendo a tres muestras de suelo por cada tratamiento, el herbicida de grado analítico a una concentración de  $3 \text{ mg kg}^{-1}$ , realizando el procedimiento de extracción como se ha descrito anteriormente. Los valores medios de recuperación variaron entre  $101\%$  y  $115\%$  para CTL,  $95\%$  y  $101\%$  para FNC, y  $93\%$  y  $104\%$  para DFN en los diferentes tratamientos.

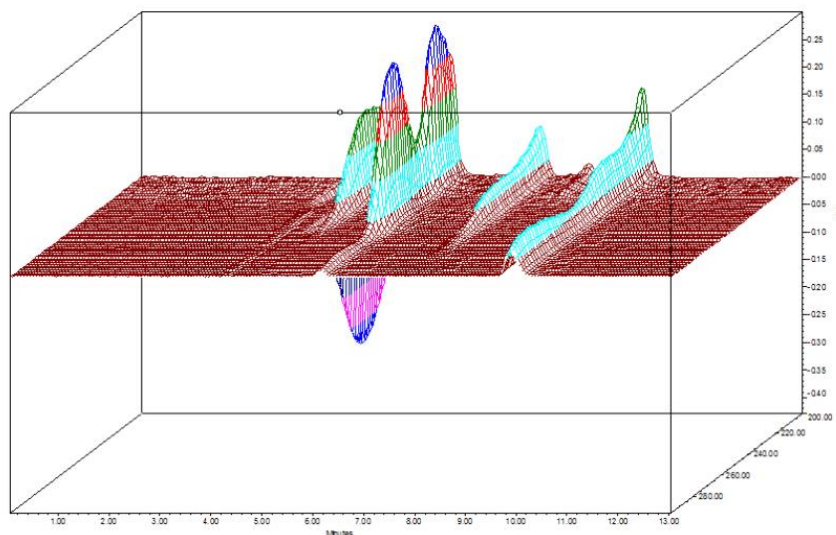


**Figura 21.** Registro del espectro completo de masas obtenido por el HPLC–MS de los picos de clortoluron ( $[m/z] [M]^+ = 213.11$ ), flufenacet ( $[m/z] [M]^+ = 364.03$ ) y diflufencian ( $[m/z] [M]^+ = 395.03$ ) en respuesta a la intensidad de los analitos en función de la masa/carga



**Figura 22.** Cromatograma obtenido por el HPLC–DAD–MS que muestra los picos de clortoluron ( $T_r = 6.1 \text{ min}$ ), flufenacet ( $T_r = 7.9 \text{ min}$ ) y diflufencian ( $T_r = 9.9 \text{ min}$ ) con tiempos de retención diferentes en respuesta a la intensidad de los analitos en función del tiempo





**Figura 23.** Representación gráfica en 3D obtenido por el HPLC–DAD–MS de los cromatogramas de los picos de chlortoluron, flufenacet y diflufenican en respuesta a la absorbancia y longitud de onda de los analitos en función del tiempo

### 3.2.9 Determinación cuantitativa del ion trazador

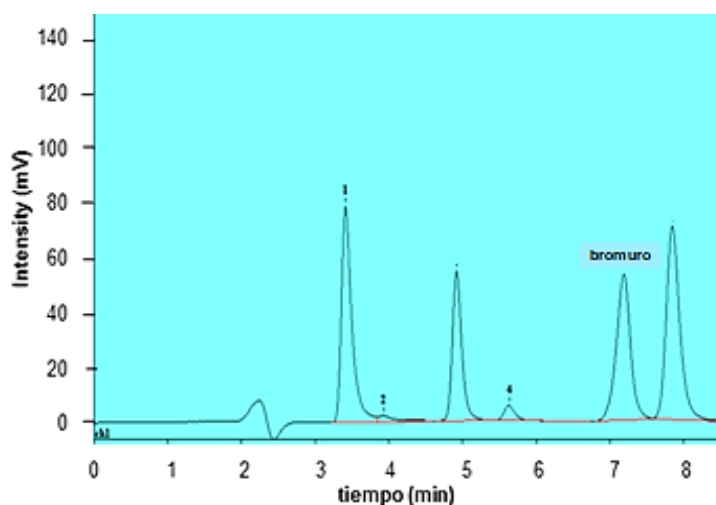
La extracción y análisis del ion  $\text{Br}^-$  se determinó a los distintos tiempos de muestreo después de su aplicación en los suelos de las parcelas experimentales. A las muestras de cada segmento de 10 cm de suelo (0–100 cm) sin enmendar y enmendado tratado con el  $\text{Br}^-$  se les determinó su humedad, y se pesaron por triplicado 5 g de suelo húmedo que fueron extraídos con 10 mL de agua ultrapura Milli–Q (Millipore) (relación 1:2), se agitaron por sonicación durante 1 h en un baño de ultrasonidos a 20 °C y luego, se sometieron a agitación mecánica intermitente por rotación durante 24 h en una cámara termostatzada a 20 °C. Las suspensiones se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se filtró con filtros Minisart NY 25 (Sartorius Stedim Biotech, Germany) de < 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. La determinación cuantitativa de la concentración del ion  $\text{Br}^-$  en los extractos acuosos de suelo se realizó mediante un sistema modular de cromatografía iónica (IC) acoplado a un detector de conductividad (**Figura 24**). El cromatógrafo utilizado fue un modelo Metrohm (Metrohm Ltd., Herisau, Suiza) con supresión química formado 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), un centro de separación donde está la columna y el módulo supresor (Metrohm 733 IC Separation Center) y el detector (Metrohm 732 IC Detector). El sistema de adquisición y procesamiento de datos utilizado fue el IC Metrodata 714 para Windows 95. La columna utilizada fue una

6.1006.520 Metrosep A Supp 5 (Metrohm) constituida por alcohol polivinílico con grupos amonio cuaternario (150 mm longitud  $\times$  4 mm  $\varnothing$ , 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula).



**Figura 24.** Cromatógrafo iónico (IC) con detector de conductividad para la cuantificación del ion  $\text{Br}^-$

La fase móvil empleada fue una disolución en agua ultrapura Milli-Q (Millipore) con 3.2  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1.0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  y 10% de acetonitrilo. Como disoluciones de lavado y de regeneración del supresor se utilizaron agua ultrapura Milli-Q y una disolución acuosa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20 mM, respectivamente. La velocidad de flujo de la fase móvil fue 0.7  $\text{mL min}^{-1}$  y el volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Antes de llenar el bucle de muestras de la bomba peristáltica (manualmente con jeringa) se filtraron las muestras a través de filtros GHP acrodiscs (Waters Corporation) de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención del ion  $\text{Br}^-$  fue de 7.1 min (**Figura 25**).



**Figura 25.** Cromatograma obtenido por el IC que muestra el pico del ion  $\text{Br}^-$  (Tr: 7.1 min) en respuesta a la intensidad del analito en función del tiempo

### 3.2.10 Modelización del comportamiento de los herbicidas y el ion trazador en el campo

#### *Estrategia de modelización*

Las simulaciones se realizaron desde el 29 de noviembre del 2016 hasta el 30 de noviembre del 2018 según el conjunto de datos de campo. El primer período experimental se utilizó para la calibración de los modelos (del 29 de noviembre de 2016 al 12 de noviembre de 2017), y el segundo período se utilizó para validar el rendimiento de los modelos (del 13 de noviembre de 2017 al 30 de noviembre de 2018). Por lo tanto, la estrategia de simulación fue primero calibrar los modelos frente a las mediciones de campo de los contenidos de agua, Br<sup>-</sup>, CTL y FNC en los perfiles de suelos control y enmendados durante el período de calibración. Luego se simuló el contenido de agua del suelo y el transporte de productos químicos sin ninguna calibración adicional de los modelos, y los resultados se compararon con la humedad del suelo, las concentraciones de Br<sup>-</sup>, CTL y FNC medidas en los suelos durante el período de validación.

#### *Parametrización de los modelos matemáticos*

Los modelos se parametrizaron principalmente con datos experimentales específicos del lugar (suelo, cultivo, clima, herbicidas, enmiendas). Aquellos parámetros que no se midieron fueron estimados mediante funciones pedotransferencia, usando datos de la bibliografía o valores por defecto recogidos en los correspondientes manuales del usuario de los modelos para parámetros que no se pueden medir (por ejemplo, algunos parámetros hidráulicos).

Los perfiles de suelos sin enmendar y enmendados de 1.6 m se dividieron en cinco horizontes de diferentes espesores de acuerdo con los horizontes del suelo. Las características fisicoquímicas tales como arena, limo, arcilla, contenido en CO y COD, densidad del suelo ( $\rho$ ) y pH corresponden a medidas realizadas en las parcelas experimentales por los métodos habituales de análisis de suelos (Sparks, 1996; Marín-Benito, 2012). El contenido en agua de cada horizonte de los suelos a capacidad de campo ( $\theta_{FC}$ , -33 kPa, pF = 2.5) y a punto de marchitez ( $\theta_{WP}$ , -1500 kPa, pF = 4.2), necesarios para la parametrización hidráulica de PRZM, fueron estimados a partir de su textura y densidad utilizando las funciones pedotransferencia Rosetta (Šimůnek et al. 2008). Para la parametrización de MACRO, los parámetros de retención de agua de van Genuchten

( $\theta_r$ ,  $\theta_s$ ,  $\alpha$  y  $n$ ), así como la conductividad hidráulica de saturación ( $K_{sat}$ ) para cada horizonte de suelo de los tres tratamientos fue estimada a partir de su textura, densidad y contenido en MO utilizando las funciones pedotransferencia HYPRES (Wösten et al. 1999). Las características del suelo del dominio de los macroporos, así como el contenido de agua correspondiente al límite de carga de presión de agua del suelo entre microporos y macroporos ( $\theta_b$ ), la conductividad hidráulica límite ( $K_b$ ), el parámetro que controla el intercambio de agua y soluto entre los flujos de microporos y macroporos (ASCAL), y el índice de distribución del tamaño de poro en los macroporos (ZN), se estimaron utilizando las funciones pedotransferencia incluidas en MACRO 5.2 (Moeys et al., 2012). El límite de carga de presión de agua del suelo entre los microporos y macroporos se estableció con el valor predeterminado de MACRO (CTEN = 10 cm).

Los parámetros relativos al cultivo, incluidas las fechas de siembra, emergencia, floración y cosecha, la altura máxima y la profundidad de enraizamiento de las plantas de trigo, la distribución de las raíces y la fracción máxima de cobertura del suelo (COVMAX en PRZM) correspondieron a medidas y observaciones realizadas en las parcelas experimentales, y se basaron en el juicio de expertos. La densidad radicular fue parametrizada de acuerdo con las recomendaciones de FOCUS (2000) para cereales de invierno, mientras que el índice de área foliar máxima del trigo (LAI) se estimó a partir de la fracción de cobertura máxima del suelo observada según  $COVMAX = LAI / 3$  (Kroes et al., 2008).

Los coeficientes de adsorción ( $K_d$ ) de CTL y FNC, sus  $DT_{50}$  en la capa superior del suelo a 6 °C, y el efecto de la temperatura sobre la tasa de degradación de los herbicidas (factor  $Q_{10}$  para PRZM y TRESP para MACRO) se obtuvieron a partir de los experimentos de laboratorio explicados anteriormente. Sin embargo, en algunos casos se realizó una calibración de los valores de  $DT_{50}$  y/o  $K_d$  para mejorar las estadísticas de bondad de ajuste de los modelos. La variación de la  $DT_{50}$  con la profundidad se calculó de acuerdo con las recomendaciones de FOCUS (2000).

Los coeficientes de dispersividad ( $\lambda$ ) (DV para MACRO) y de dispersión hidrodinámica (D) (DISP para PRZM), y los coeficientes de  $K_d$  y  $DT_{50}$  de los herbicidas para cada tratamiento del suelo se ajustaron manualmente a partir de las concentraciones de ion trazador  $Br^-$ , herbicidas y contenido de agua en el suelo, respectivamente, observadas en los perfiles de suelo correspondientes al período de calibración (primer año). La calibración de

$K_d$  y  $DT_{50}$  de los herbicidas sólo fue necesaria en los suelos enmendados y se llevó a cabo asumiendo que el COD aportado por los residuos SMS y GC al suelo podría haber disminuido la adsorción de los herbicidas por el suelo favoreciendo su biodisponibilidad en solución para ser degradados (Barriuso et al. 2011; Marín-Benito et al. 2014a). Cuantitativamente, la calibración de  $K_d$  y  $DT_{50}$  de los herbicidas se realizó a partir de la relación inicial del contenido en COD del suelo enmendado/COD del suelo sin enmendar. El factor de absorción del cultivo se ajustó a cero para ambos herbicidas, y a 0.5 para el trazador Br- no absorbido (FOCUS, 2000).

La temperatura y humedad del suelo monitorizadas al comienzo del experimento a lo largo de los perfiles del suelo se usaron como condiciones iniciales para las simulaciones. Se asumió que la temperatura del suelo en las capas profundas del suelo fue de 1 °C por debajo de la observada en la capa superior del suelo (Marín-Benito et al., 2014b). Para MACRO, se asumió un gradiente hidráulico constante igual a 1 como condición límite inferior. Posteriormente, la validación de los modelos se realizó por comparación de las simulaciones con los datos experimentales de las concentraciones de bromuros y herbicidas, y contenido de agua en el suelo sin enmendar y enmendado correspondientes al segundo año experimental.

Los datos climáticos necesarios para PRZM y MACRO (precipitación, temperatura máxima, mínima y media del aire, radiación solar, evapotranspiración y velocidad del viento) se monitorizaron diariamente a través de las dos estaciones meteorológicas de la AEMET indicadas en el apartado Materiales.

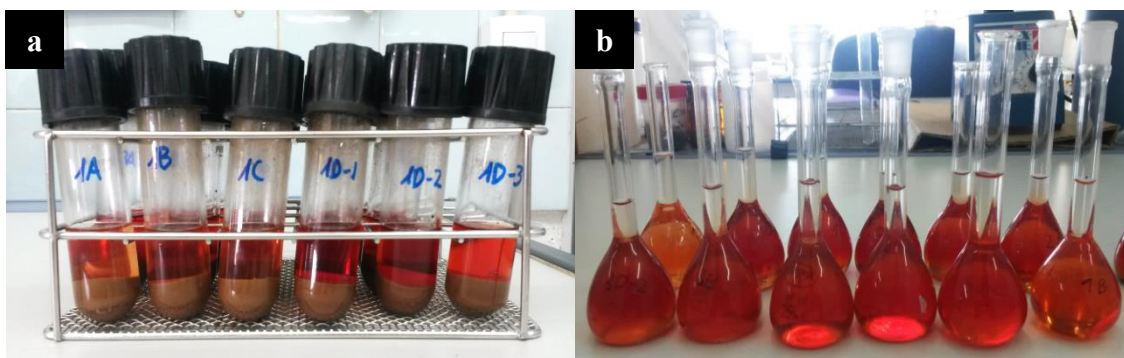
### **3.2.11 Evaluación de parámetros bioquímicos indicadores de la actividad, abundancia y estructura de las comunidades microbianas del suelo durante el proceso de disipación de los herbicidas en campo**

El estudio de las modificaciones en las comunidades microbianas por impacto de los herbicidas y enmiendas orgánicas se evaluó mediante la determinación de dos parámetros bioquímicos generalmente muy sensibles a las perturbaciones del suelo: la actividad deshidrogenasa (DHA) y la estructura de las comunidades microbianas mediante el análisis del perfil de ácidos grasos fosfolípidos (PLFAs), en muestras de suelo sin enmendar y enmendado con SMS o GC en las parcelas experimentales. Estos parámetros se utilizaron como indicadores de la actividad (DHA), biomasa total y estructura microbiana del suelo (PLFAs). El análisis se realizó en muestras del horizonte superficial del suelo (0–10 cm) a los

tiempos 0, 45, 145, 229 y 339 días después de la primera aplicación de los herbicidas. Además, se recogieron muestras de suelo 3 días antes de la aplicación de los herbicidas (−3 días) para determinar la estructura filogenética (PLFAs). La evaluación de las modificaciones en las comunidades microbianas se realizó únicamente durante el primer ciclo de cultivo.

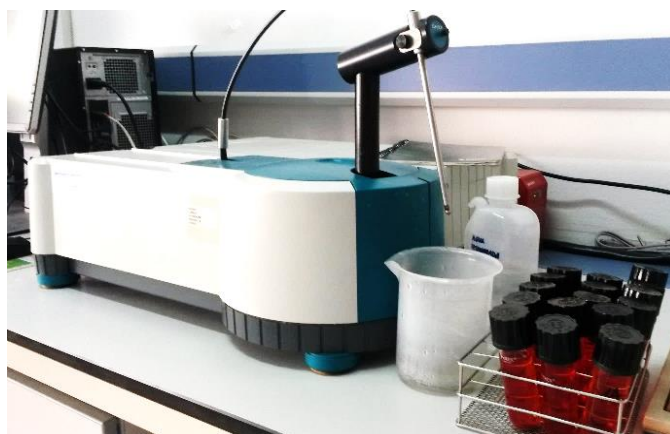
### ***Determinación de la actividad deshidrogenasa del suelo (DHA)***

La DHA, enzima asociada a la actividad oxidativa de los microorganismos sobre la MO, se considera un indicador biológico de la actividad microbiana total del suelo (Paolini, 2003). Se determinó por el método de Tabatabai (1994) a los distintos tiempos de muestreo después de la aplicación de los herbicidas en los suelos de las parcelas experimentales. Se tomaron muestras superficiales de suelo (0–10 cm) sin enmendar y enmendado, y tratadas con o sin herbicidas (muestras control). Se determinó su humedad, y se pesaron por duplicado 6 g de suelo, se añadieron 60 mg de carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ), 1 mL de una disolución acuosa de cloruro de 2,3,5–trifeniltretrazolium (TTC) al 3% y 2.5 mL de agua ultrapura Milli-Q (Millipore). Se agitaron ligeramente en un vórtex e incubaron a 37 °C en oscuridad y en condiciones anaerobias durante 24 h. Tras este tiempo de incubación, el TTC se reduce al compuesto 1,3,5–trifenilformazan (TPF), de color rojo, originado en el proceso con tres extracciones consecutivas de metanol. Para ello, se añadieron 7 mL de metanol a cada muestra de suelo, se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min (**Figura 26a**). Se extrajo el sobrenadante en un matraz aforado de 25 mL con una pipeta pasteur de cristal, y se repitió la operación anterior dos veces más. Se enrasó el matraz hasta 25 mL con metanol (**Figura 26b**). Los reactivos TTC y TPF fueron suministrados por Sigma–Aldrich Química S.A (España).



**Figura 26.** a) Muestras de suelo con TTC reducido a TPF tras incubación y proceso de extracciones con MeOH, y b) matraz enrasado hasta 25 mL con MeOH

La determinación cuantitativa de la DHA se realizó a partir de la medida de la absorbancia del compuesto TPF generado a la longitud de onda de 485 nm por espectrofotometría ultravioleta–visible (UV/VIS) (**Figura 27**). El espectrofotómetro utilizado fue un modelo Cary 100 Conc (Varian Optical Spectroscopy Instruments) con el software Cary Win UV. La recta de calibrado se preparó con disoluciones patrón preparadas en metanol de concentraciones comprendidas entre 0 y 50  $\mu\text{g TPF mL}^{-1}$ . Los valores de los resultados se expresan en  $\mu\text{g TPF g}^{-1}$  de suelo seco.



**Figura 27.** Espectrofotometría Ultravioleta–Visible (UV/VIS) para la cuantificación de la DHA

#### ***Determinación del perfil de ácidos grasos de fosfolípidos del suelo (PLFAs)***

Los PLFAs son componentes clave de las membranas celulares microbianas. El análisis de PLFAs extraído de los suelos proporciona información sobre la estructura general de las comunidades microbianas del suelo y la biomasa microbiana (Frostegard et al., 1993). Los PLFAs se determinaron a los distintos tiempos de muestreo después de la aplicación de los herbicidas en los suelos de las parcelas experimentales. Se tomaron muestras superficiales de suelo (0 – 10 cm) sin enmendar y enmendado, y tratadas con o sin herbicidas (muestras control). Las muestras de suelo fueron de inmediato liofilizadas (**Figura 28**).

El método para el análisis de los PLFAs consta de cuatro pasos claves (Zelles, 1999):

1) **Extracción de los ácidos grasos:** se pesaron por duplicado 2 g del suelo liofilizado y los lípidos fueron extraídos por sonicación con una disolución tampón de cloroformo–metanol–fosfato monofásico y otros disolventes orgánicos, tras varias fases de centrifugación y decantado.



**Figura 28.** Liofilización de muestras de suelo previo a la extracción de PLFAs

2) El **fraccionamiento de los ácidos grasos**: se emplearon columnas de extracción en fase sólida (SPE) para aislar los fosfolípidos de otros lípidos extraídos no polares. Estas columnas fueron acondicionadas con metanol y cloroformo, y las muestras una vez en las columnas se lavaron con cloroformo y acetona, y por último se diluyeron con una mezcla de agua, metanol y cloroformo.

3) **Metanólisis alcalina**: los fosfolípidos se transformaron en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) antes de su análisis. Para ello, se utilizó un reactivo de trans-esterificación compuesto de una solución de hidróxido de potasio (KOH) disuelto en una mezcla de metanol y tolueno. Tras incubar en baño maría de agua a 37 °C durante 15 minutos, los ácidos grasos se extrajeron con ácido acético y cloroformo.

4) Por último, los ácidos grasos se **lavarón** varias veces con cloroformo y se **evaporaron** en presencia de una corriente de N<sub>2</sub>. Las muestras se **re-suspendieron** en 500 µL de n-Hexano.

La determinación cuantitativa de los fosfolípidos se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID) (**Figura 29**). El cromatógrafo utilizado fue un modelo Agilent 7890 (Agilent technologies, Wilmington, DE, USA) equipado con una columna de 25 m Ultra 2 (5% fenil)-metilpolisiloxano (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Los fosfolípidos fueron identificados utilizando estándares de ácidos grasos bacterianos y fúngicos, y un software de sistema de identificación microbiano (Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA). Se utilizó ácido nodecanoico (19:0)



como patrón interno para la determinación cuantitativa de los PLFAs. Se utilizaron algunos ácidos grasos específicos como biomarcadores (Zelles, 1999) para cuantificar la abundancia relativa de bacterias Gram positivas (ácidos grasos de cadena ramificada saturados iso y anteiso), Gram negativas (ácidos grasos monoinsaturados y ciclopropil 17:0), Actinobacterias (ácidos grasos 10-metil) y hongos saprófitos y micorrícicos arbusculares (18:2  $\omega$ 6 cis y 16:1  $\omega$ 5, respectivamente). La biomasa microbiana total se estimó mediante la suma total de PLFAs y se expresó como  $\text{nmol g}^{-1}$ .



**Figura 29.** Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID) para la cuantificación de los fosfolípidos (PLFAs)

### 3.2.12 Análisis estadístico de resultados obtenidos en los distintos procesos estudiados

Las cinéticas de disipación/degradación de los herbicidas en campo y en laboratorio fueron ajustadas para cada herbicida y tratamiento de suelo a un modelo cinético de primer orden (SFO) ( $C = C_0 e^{-kt}$ ) o modelo multicompartimental de primer orden (FOMC) ( $C = C_0 / ((t/\beta) + 1)^\alpha$ ). Para la selección del modelo cinético que mejor describe los resultados de disipación, se siguieron las recomendaciones del grupo de trabajo FOCUS (2006). Las concentraciones de herbicidas, que se midieron un día después de la aplicación en los tres tratamientos del suelo, se consideraron como el 100% de las cantidades aplicadas. La desviación estándar (SD) se usó para indicar la variabilidad entre las réplicas. El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y la prueba chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) se calcularon como indicadores de la bondad de ajuste. La prueba  $\chi^2$  considera las desviaciones entre los valores observados y calculados en relación con la incertidumbre de las mediciones para un ajuste específico, y se

utilizó para comparar la bondad del ajuste de los dos modelos probados. Para validar el modelo, los valores de  $\chi^2$  calculados deben ser iguales o menores al 15% para un número determinado de grados de libertad a un nivel de significancia del 95%. Se determinó el tiempo de disipación del 50% (DT<sub>50</sub>, días) y 90% (DT<sub>90</sub>, días) de la cantidad de herbicida inicialmente añadida a partir de las curvas de disipación/degradación, para comparar las variaciones en la velocidad de disipación de los herbicidas en los diferentes tratamientos del suelo. Los parámetros de los modelos cinéticos se estimaron utilizando la herramienta Excel Solver add-in Package (FOCUS, 2006, Marín-Benito et al., 2012).

Los resultados de movilidad de los compuestos químicos del experimento de campo se sometieron a un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para comparar los efectos de los diferentes tratamientos y tiempos del suelo sobre las características del suelo y sobre la movilidad de bromuro y herbicida en el perfil del suelo. La desviación estándar (SD) se usó nuevamente para indicar la variabilidad entre las réplicas. La diferencia menos significativa de Fisher (LSD) se determinó con un nivel de confianza del 95%. Se utilizaron modelos de regresión lineal simple y múltiple para relacionar la movilidad química con el contenido de CO, COD y agua de los suelos. Se utilizó el software SPSS Statistics v22.0 para Windows (IBM Inc. Chicago, ILL).

Los datos obtenidos del estudio de la DHA y del PLFAs del experimento de campo, se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA). La prueba post hoc de Tukey o Games-Howell (de acuerdo con la prueba de homogeneidad de varianza de Levene) en  $p < 0.05$  se usó para determinar diferencias significativas entre valores medios y evaluar los efectos de los diferentes tratamientos del suelo a un mismo tiempo de muestreo, y los diferentes tiempos de muestreo dentro del mismo tratamiento de suelo. La desviación estándar (SD) se usó para indicar la variabilidad entre las réplicas. Los análisis ANOVA y de correlación se llevaron a cabo utilizando el paquete de software IBM SPSS Statistics v24. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó con el software PAST v3.15 (Hammer et al., 2001) para determinar las variables más significativas y el impacto global de los herbicidas en las comunidades microbianas del suelo. Se realizaron también análisis PERMANOVA de una y dos vías para determinar la importancia de la aplicación de herbicidas, los tiempos de muestreo, los tratamientos de suelo y sus interacciones. Los coeficientes de correlación de Pearson entre los porcentajes remanentes de herbicidas, los contenidos en CO del suelo y la estructura y actividad microbiana se determinaron para dilucidar cómo se relacionan las variables entre sí.

El rendimiento de los modelos matemáticos PRZM y MACRO para reproducir las observaciones experimentales fue evaluado calculando los siguientes índices estadísticos: la eficiencia del modelo (EF), el coeficiente de masa residual (CRM), el error cuadrático medio (RMSE) y el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) (Smith et al. 1996). Estos índices se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$EF = 1 - [\sum_{i=1}^n (S_i - O_i)^2 / \sum_{i=1}^n (O_i - O_m)^2] \quad (1)$$

$$CRM = (\sum_{i=1}^n O_i - \sum_{i=1}^n S_i) / \sum_{i=1}^n O_i \quad (2)$$

$$RMSE = (100/O_m) [\sum_{i=1}^n (S_i - O_i)^2 / n]^{1/2} \quad (3)$$

$$r = \sum_{i=1}^n (O_i - O_m) \times (S_i - S_m) / [\sum_{i=1}^n (O_i - O_m)^2]^{1/2} \times [\sum_{i=1}^n (S_i - S_m)^2]^{1/2} \quad (4)$$

donde  $O_i$  y  $P_i$  son los valores observados y simulados, respectivamente,  $O_m$  y  $P_m$  son los valores medios observados y simulados, respectivamente, y  $n$  es el número de datos de muestreo. El valor óptimo de  $r$  y  $EF$  es  $+1$ , y el de  $RMSE$  y  $CRM$  es cero. Si  $CRM > 0$  hay una subestimación de los resultados observados, y si  $CRM < 0$  existe una sobreestimación de los mismos.

### 3.3 BIBLIOGRAFÍA

- Barriuso, E., Andrades, M.S., Benoit, P., Houot, S., 2011. Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from compost: experimental data and modelling approach. *Biogeochemistry* 106, 117–33.
- Benny, C., Yitzhak, I.B., Tamara, P., 2004. Sorption–desorption behavior of triazine and phenylurea herbicides in Kishon river sediments. *Water Res.* 38, 4383–4394.
- Carabias–Martínez, R., Rodríguez–Gonzalo, E., Fernández–Laespada, M.E., Calvo–Seronero, L., Sánchez–San Román, F.J., 2003. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res.* 37, 928–938.
- Carsel, R., Imhoff, J., Hummel, P., Cheplick, J., Donigian, A., Suarez, L., 2005. PRZM–3, a Model for Predicting Pesticide and Nitrogen Fate in the Crop Root and Unsaturated Soil Zones: User's Manual for Release 3.12.2. US Environ. Prot. Agency (EPA) (420 pp).
- Casado, J., Brigden, K., Santillo, D., Johnston, P., 2019. Screening of pesticides and veterinary drugs in small streams in the European Union by liquid chromatography high–resolution mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* 670, 1204–1225.
- CTICH (Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de la Rioja), 2021. <https://ctich.com/> (consultado 10 Enero 2021).
- De Liñán, C., 2021. Vademecum on–line: productos fitosanitarios y nutricionales. <https://www.portaltecnologicoagricola.com/> (consultado 10 Enero 2021).
- EC (European Commission. Directorate–General Health & Consumer Protection), 2005. Review Report for the Active Substance Chlorotoluron (54 pp).
- EC (European Commission. Directorate–General Health & Consumer Protection), 2003. Review Report for the Active Substance Flufenacet (30 pp).
- ElGouzi, S., Draoui, K., Chtoun, E.H., Dolores Mingorance, M., Peña, A., 2015. Changes in the persistence of two phenylurea herbicides in two Mediterranean soils under irrigation with low– and high–quality water: a laboratory approach. *Sci. Total Environ.* 538, 16–22.
- Fingler, S., Mendas, G., Dvorscak, M., Stipicevic, S., Vasilic, Z., Drevenkar, V., 2017. Herbicide micropollutants in surface, ground and drinking waters within and near the area of Zagreb, Croatia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 11017–11030.
- FOCUS (FORum for Co–ordination of pesticide fate models and their Use), 2000. FOCUS Groundwater Scenarios in the EU Review of Active Substances. Report of the FOCUS Groundwater Scenarios Workgroup EC Document Reference Sanco/321/2000 rev.2 (202 pp).

- FOCUS (FORum for Co-ordination of pesticide fate models and their Use), 2006. Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics. EC Documents Reference Sanco/10058/2005 Version 2.0 (434 pp).
- Frostegard, A., Baath, E., Tunlid, A., 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* 25, 723–730.
- Gao, M.L., Dai, S.G., Ma, Y.M., Zhang, P., 2007. Impact of atrazine and nitrogen fertilizers on the sorption of chlorotoluron in soil and model sorbents. *J. Environ. Sci.* 19, 327–331.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4 (1) (art 4: 9 pp).
- IUSS Working Group WRB, 2015. World reference base for soil resources 2014, update 2015. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome ISSN 0532–0488.
- Kotrikla, A., Gatidou, G., Lekkas, T.D., 2006. Monitoring of triazine and phenylurea herbicides in the surface waters of Greece. *J. Environ. Sci. Health B* 41, 135–144.
- Kroes, J.G., Van Dam, J.C., Groenendijk, P., Hendriks, R.F.A., Jacobs, C.M.J., 2008. SWAP version 3.2. Theory description and user manual. Alterra Report 1649, Swap32 Theory description and user manual. Wageningen, The Netherlands (262 pp).
- Larsbo, M., Jarvis, N., 2003. MACRO 5.0. A Model of Water Flow and Solute Transport in Macroporous Soil. Technical Description. Rep Emergo, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden (49 pp).
- Marín–Benito, J.M., Herrero–Hernández, E., Andrades, M.S., Sánchez–Martín, M.J., Rodríguez–Cruz, M.S., 2014a. Effect of different organic amendments on the dissipation of linuron, diazinon and myclobutanil in an agricultural soil incubated for different time periods. *Sci. Total Environ.* 476–477, 611–621.
- Marín–Benito, J.M., Pot, V., Alletto, L., Mamy, L., Bedos, C., Barriuso, E., Benoit, P., 2014b. Comparison of three pesticide fate models with respect to the leaching of two herbicides under field conditions in an irrigated maize cropping system. *Sci. Total Environ.* 499, 533–545.
- Marín–Benito, J.M.; Andrades, M.S.; Sánchez–Martín, M.J.; Rodríguez–Cruz, M.S., 2012. Dissipation of Fungicides in a Vineyard Soil Amended with Different Spent Mushroom Substrates. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6936–6945.
- Milan, M., Ferrero, A., Fogliatto, S., Piano, S., Vidotto, F., 2015. Leaching of S–metolachlor, terbuthylazine, desethyl–terbuthylazine, mesotrione, flufenacet, isoxaflutole, and diketonitrile in field lysimeters as affected by the time elapsed between spraying and first leaching event. *J.*

- Environ. Sci. Health B* 50, 851–861.
- Moeys, J., Larsbo, M., Bergström, L., Brown, C.D., Coquet, Y., Jarvis, N.J., 2012. Functional test of pedotransfer functions to predict water flow and solute transport with the dual-permeability model MACRO. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 16, 2069–2083.
- Paolini, J.E., 2003. Las enzimas del suelo y su aplicación en la caracterización bioquímica de sitios. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.
- Paredes, C., Moral, R., Pérez-Murcia, M.D., Moreno-Caselles, J., Pérez-Espinosa, A., 2006. Agricultural value of the spent mushroom substrate. In: Petersen, S.O. (Ed.), *Technology for Recycling of Manure and Organic Residues in a Whole-Farm Perspective: Danish Institute of Agricultural Sciences, Ministry of Food, Agricultural Sciences, Tjele, II*, 301–304.
- PPDB (Pesticide Properties Data Base.), 2019. University of Hertfordshire, UK. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> (consultado 06 mayo 2021).
- Robert, M., 1975. Principes de détermination qualitative des minéraux argileux à l'aide des rayons X. *Annales Agronomiques*, 26, 7339–7346.
- Rouchaud, J., Neus, O., Bulcke, R., Cools, K., Eelen, H., Dekkers, T., 2000. Soil dissipation of diuron, chlorotoluron, simazine, propyzamide, and diflufenican herbicides after repeated applications in fruit tree orchards. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 60–65.
- Rouchaud, J., Neus, O., Cools, K., Bulcke, R., 1999. Flufenacet soil persistence and mobility in corn and wheat crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 460–466.
- Smith, J., Smith, P., Addiscott, T., 1996. Quantitative methods to evaluate and compare soil organic matter (SOM) models. NATO ASI Series 38, 181e–199e.
- Šimůnek, J., Van Genuchten, M.T., Šejna, M., 2008. Development and applications of the HYDRUS and STANMOD software packages and related codes. *Vadose Zone J.* 7, 587–600.
- Sparks, D.L., 1996. *Methods of Soil Analysis, Part 3—Chemical Methods*; Soil Science Society of America, Inc.: Madison, WI, USA.
- Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. In: Weaver, R.W. (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science society of America, Madison, WI. 903–947.
- Ulrich, U., Hörmann, G., Unger, M., Pfannerstill, M., Steinmann, F., Fohrer, N., 2018. Lentic small water bodies: variability of pesticide transport and transformation patterns. *Sci. Total Environ.* 618, 26–38.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1998. Pesticide Fact Sheet – Flufenacet. USEPA, Washington, DC (31 pp).

- Willkommen, S., Pfannerstill, M., Ulrich, U., Guse, B., Fohrer, N., 2019. How weather conditions and physico–chemical properties control the leaching of flufenacet, diflufenican, and pendimethalin in a tile–drained landscape. *Agric. Ecosyst. Environ.* 278, 107–116.
- Wösten, J.H.M., Lilly, A., Nemes, A., Le Bas, C. 1999. Development and use of a database of hydraulic properties of European soils. *Geoderma* 90, 169–185.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29, 111–129.





# RESULTADOS Y DISCUSIÓN





# CAPÍTULO 1

## RESUMEN



## **CAPÍTULO 1: Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: Effect of the temperature and the organic amendments.**

### **RESUMEN**

Los herbicidas son compuestos químicos muy utilizados para garantizar el desarrollo de los cultivos minimizando las pérdidas económicas causadas por las malas hierbas y aumentando su productividad. La producción de los cultivos depende a su vez de la calidad y fertilidad del suelo que está favorecida por una práctica agronómica habitual como es la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo. En la actualidad, los residuos orgánicos de bajo coste y con elevado contenido en carbono orgánico (CO), como aquellos procedentes de actividades agrícolas o industriales, se aplican al suelo como enmiendas orgánicas ya que permiten mantener o aumentar el contenido en materia orgánica (MO) del suelo mejorando su calidad. Sin embargo, esta práctica agrícola puede influir y/o controlar el destino medioambiental de los herbicidas aplicados simultáneamente al suelo modificando los procesos que gobiernan su dinámica, incluida su degradación. Por otra parte, la degradación de los herbicidas también depende de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los suelos, de las características de los propios herbicidas, y de las condiciones climáticas del lugar donde se aplican, siendo la temperatura una variable importante a tener en cuenta. El impacto de la temperatura y del contenido en agua del suelo en la velocidad de degradación de herbicidas ha sido estudiado, aunque generalmente en estos estudios no se consideran suelos enmendados. El efecto de la temperatura en la degradación de un herbicida se puede describir con el factor  $Q_{10}$ , que se define como el aumento de la velocidad de disipación del compuesto cuando la temperatura aumenta 10 °C. Este factor se determina mediante la relación de los tiempos de vida media del herbicida ( $DT_{50}$ ) determinados a dos temperaturas,  $T_1$  y  $T_2$ , ( $DT_{50}(T_1) / DT_{50}(T_2)$ ) siendo la temperatura  $T_1$  10 °C inferior a la temperatura  $T_2$ . El factor  $Q_{10}$  es un factor importante para predecir la disipación de los pesticidas en el suelo, por lo que se considera un factor crítico en la parametrización de los modelos matemáticos FOCUS de predicción del destino medioambiental de pesticidas utilizados para la evaluación de riesgos en el proceso de registro de pesticidas en Europa. El valor de  $Q_{10}$  recomendado por defecto por la EFSA para ser utilizado en estudios de modelización cuando no existen datos experimentales es de 2.58. Sin embargo, este valor es recomendado para suelos sin enmendar, mientras que no existen valores de referencia para suelos enmendados.

De acuerdo con lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron: i) estudiar la cinética de degradación de dos herbicidas, clortoluron (CTL) y flufenacet (FNC), que presentan diferente carácter hidrofóbico, en un suelo agrícola sin enmendar (S) y enmendado con sustrato postcultivo de hongos (S + SMS) o compost verde (S + GC), bajo condiciones de laboratorio a dos temperaturas diferentes (6 °C y 16 °C) con el fin de calcular los respectivos factores  $Q_{10}$  esenciales para el posterior estudio de simulación de su comportamiento con modelos FOCUS, y ii) evaluar la formación de los principales metabolitos de ambos herbicidas con potencial para la contaminación del agua durante el tiempo de degradación en las condiciones indicadas.

Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de laboratorio y los suelos sin enmendar y enmendados se tomaron del horizonte superficial (0 – 10 cm) de nueve parcelas experimentales (tres réplicas por tratamiento), ubicadas en la finca experimental Muñovela del IRNASA, CSIC. Las enmiendas orgánicas SMS y GC se aplicaron *in situ* al suelo a las dosis de 140 y 85 t de residuo  $ha^{-1}$  en peso seco, respectivamente. Los herbicidas se utilizaron bajo las formulaciones comerciales Erturon<sup>®</sup> (CTL 50% p/v) y Herold<sup>®</sup> (FNC 40% p/v) a dosis de 14 mg de CTL + 5.5 mg de FNC  $kg^{-1}$  de suelo seco. Las muestras de suelo se ajustaron al 40% de la capacidad de campo del suelo y se incubaron en oscuridad a 6 °C (temperatura promedio de invierno) y 16 °C. También se preparó una muestra de suelo estéril por cada tratamiento para comprobar la degradación química de los herbicidas. La evolución de los herbicidas en los suelos y la formación de los metabolitos, desmetilclortoluron, FNC-OA y FNC-ESA, se determinó a partir del análisis de los residuos de cada uno de los compuestos en extractos de suelo en acetonitrilo en función del tiempo y su cuantificación por HPLC – DAD – MS.

Las enmiendas orgánicas y la temperatura de incubación no mostraron ninguna influencia relevante en el tipo de modelo cinético que mejor describió la degradación de los herbicidas. El modelo cinético dependió exclusivamente del propio herbicida. Así, las curvas de degradación del CTL durante los 273 y 67 días de incubación a 6 °C y 16 °C, respectivamente, se ajustaron a modelos cinéticos de primer orden (SFO), mientras que las curvas de degradación del FNC durante los 273 días de incubación se ajustaron a modelos cinéticos de primer orden multicompartimental (FOMC). Solo una réplica de S + GC a 6 °C se ajustó mejor al modelo FOMC para CTL. La aplicación de las enmiendas orgánicas al suelo disminuyó la velocidad de disipación de ambos herbicidas aumentando sus valores de vida media ( $DT_{50}$ ) a 6 °C (1.3 – 1.9 veces) y a 16 °C (1.4 – 1.9 veces),

debido a su mayor adsorción y consecuentemente, menor biodisponibilidad para ser degradados. Sin embargo, el efecto de la enmienda orgánica fue diferente dependiendo del herbicida y de la temperatura de incubación. Los valores de  $DT_{50}$  aumentaron en el orden  $S < S + GC < S + SMS$  para FNC a ambas temperaturas de incubación y para CTL a 16 °C, de acuerdo con el mayor contenido en MO de los suelos enmendados, excepto por el CTL a 6 °C que siguió el orden  $S < S + SMS < S + GC$ , debido probablemente a otro mecanismo de degradación. Los herbicidas mostraron una degradación más rápida a 16 °C que la observada a 6 °C ( $Q_{10}=1.9 - 2.8$ ) debido al aumento de la biomasa y/o la actividad microbiana con la temperatura. La degradación de FNC, el herbicida más hidrofóbico, fue más lenta que la de CTL en todos los tratamientos y temperaturas de incubación estudiadas. Además, se demostró que la degradación de ambos herbicidas fue causada principalmente por microorganismos, al observarse una leve degradación o ausencia de la misma en los tratamientos estériles.

Los metabolitos desmetilclortoluron, FNC-ESA y FNC-OA se detectaron en todos los tratamientos del suelo a ambas temperaturas de incubación. Sin embargo, las concentraciones máximas y acumuladas fueron distintas en los suelos sin enmendar y/o enmendados de acuerdo con los mecanismos de degradación diferentes de ambos herbicidas. La cantidad total formada de cada uno de los metabolitos fue mayor en los tratamientos S y S + GC que en el S + SMS.

Los valores del factor  $Q_{10}$  variaron entre 1.9 y 2.8 para CTL, y entre 2.3 y 2.5 para FNC. Este factor fue similar para ambos herbicidas en el suelo sin enmendar, mientras que en los suelos enmendados el impacto de la temperatura fue diferente para ambos herbicidas. El valor  $Q_{10}$  de los herbicidas en el suelo sin enmendar fue ligeramente más bajo que el valor por defecto ( $Q_{10} = 2.58$ ) recomendado por la EFSA para estudios de modelización. Sin embargo, esta comparación no debería hacerse para suelos enmendados, ya que su extrapolación podría subestimar o sobreestimar el efecto de la temperatura en la velocidad de degradación de herbicidas en estudios de simulación que incluyen esta práctica agronómica, razón por la cual resulta necesario realizar este tipo de estudios con suelos enmendado.





**CAPÍTULO 1**  
**ARTÍCULO PUBLICADO**





## Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: Effect of the temperature and the organic amendments

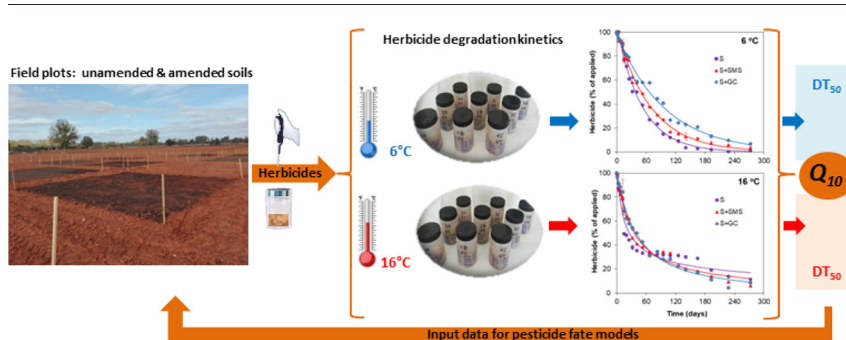
Jesús M. Marín-Benito <sup>\*</sup>, M. José Carpio, María J. Sánchez-Martín, M. Sonia Rodríguez-Cruz

Institute of Natural Resources and Agrobiological of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain

### HIGHLIGHTS

- Impact of organic amendments and temperature on two herbicides degradation in soil was evaluated.
- Degradation rate decreased by application of organic amendments and increased by temperature.
- Major metabolites of both herbicides were found and evaluated in all conditions assayed.
- Kinetic parameters at different temperatures allowed calculation of  $Q_{10}$  factor in amended soils.
- $Q_{10}$  values will allow simulating pesticide leaching in amended soils with FOCUS models.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 June 2018

Received in revised form 9 October 2018

Accepted 2 November 2018

Available online 5 November 2018

#### Keywords:

Degradation

Herbicide

Soil

Spent mushroom substrate

Green compost

Temperature

### ABSTRACT

A laboratory study was designed to assess the following: i) the degradation kinetics of chlorotoluron and flufenacet at two different temperatures, 6 °C and 16 °C, in an unamended agricultural soil and one amended with spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC), and ii) the formation of the main metabolites of both herbicides with potential risk for water pollution over degradation time. The aim was to determine the dependence of these herbicide degradations on temperature ( $Q_{10}$  factor) using kinetic parameters, which is essential information for the later simulation of herbicide environmental fate with FOCUS models. SMS and GC were applied in situ to the natural soil as organic amendments at rates of 140 or 85 t residue ha<sup>-1</sup>, respectively. Unamended and amended soils were taken from the 0–10 cm topsoil of experimental plots (three replicates/treatment) located on an agricultural farm. Samples of soil + herbicides were incubated at 6 °C or 16 °C under laboratory conditions. The degradation curves of chlorotoluron and flufenacet were fitted to single first-order and first-order multicompartiment kinetic models, respectively. The flufenacet degradation, the more hydrophobic herbicide, was slower than that of chlorotoluron in all the treatments. The application of the organic amendments to soil increased the half-lives (DT<sub>50</sub>) for both herbicides incubated at 6 °C (1.3–1.9 times) and 16 °C (1.4–1.9 times) due to their higher sorption and lower bioavailability for degradation in amended soils. The herbicides recorded a faster degradation at 16 °C than at 6 °C ( $Q_{10}$  = 1.9–2.8) due to the increased microbial biomass and/or activity with temperature. The metabolites desmethyl chlorotoluron, flufenacet ESA and flufenacet OA were detected in all the soil treatments at both incubation temperatures. The determination of  $Q_{10}$  factors in amended soils is very valuable for generating accurate input data for pesticide fate models such as FOCUS in order to improve the evaluation of the leaching of herbicides and their transformation products, which is a relevant goal to maintain the sustainability of agricultural systems.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: [jesusm.marin@imasa.csic.es](mailto:jesusm.marin@imasa.csic.es) (J.M. Marín-Benito).

## 1. Introduction

The main challenge facing agriculture now and in the future is to ensure a food supply for the world's growing population while preserving the environment. The increase in crop yields is often based on the use of pesticides (AEPLA, 2018). The omnipresent competition between crops and weeds for soil nutrients turns herbicides into the most commonly used type of pesticides to ensure crop development and boost yields (FAOSTAT, 2018). Productive agriculture, however, depends not only on the use of pesticides but also on soil quality and fertility. Accordingly, the application to the soil of organic residues rich in nutrients and organic matter (OM) as organic amendments is a common practice in sustainable agriculture for stopping it from degrading (Bastida et al., 2015; Yazdanpanah et al., 2016). The herbicide-organic amendment combination is therefore an attractive farming practice from a productive viewpoint. However, the addition of organic amendments to the soil can control the environmental fate of herbicides through the modification of the processes that govern their dynamics in natural soil, including degradation (Briceño et al., 2007; Marín-Benito et al., 2016, 2018; Rodríguez-Cruz et al., 2012a; Rodríguez-Liébana et al., 2014). The combination of both farming practices needs to be carefully studied in order to assess and minimize their potential environmental risk on soil and water quality, especially considering the increasing presence of herbicides in aquatic media and the consequent social concern (Carabias-Martínez et al., 2003; Guzzella et al., 2006; Herrero-Hernández et al., 2013, 2017; Kotriklá et al., 2006; Ulrich et al., 2018).

Multiple factors besides the pesticides' own properties are responsible for controlling their degradation rates in the soil, ranging from their physicochemical properties (e.g., pH, texture, OM and clay content/composition), biological properties (variety, density and activity of microbial population), pesticide combinations, and/or weather conditions, through to the regulation of other main variables such as soil water content and soil temperature (varying throughout the day and on a seasonal scale from site to site) (García-Delgado et al., 2018; Gupta and Gajbhiye, 2002; Hussain et al., 2015; Kah et al., 2007; Walker et al., 1992, 1997). Numerous studies have been conducted to assess how the herbicides' degradation rate is modified, and consequently their environmental fate, by altering one or several of these factors through the application of organic amendments to the soil. In some cases, a decreased bioavailability of herbicides to be degraded by soil microbial communities has been reported as a result of their enhanced sorption by the OM of the amendments (Coppola et al., 2011; Marín-Benito et al., 2014a; Rodríguez-Cruz et al., 2012b). In other cases, the opposite effect has been observed, with higher herbicide degradation promoted by the soluble carbon from the organic amendments or by the activity of added microbial communities (García-Delgado et al., 2018; Grenni et al., 2012; Hussain et al., 2015; Marín-Benito et al., 2014a). The numerous residues potentially used as organic amendments include those from agricultural and industrial activities, such as composted spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC) (García-Delgado et al., 2018; Marín-Benito et al., 2014a).

The impacts temperature and soil water content have on the degradation rate of herbicides has been widely investigated (Alletto et al., 2006; Jurado-Exposito and Walker, 1998; Walker et al., 1992, 1997). In general, a higher temperature and more soil moisture increase the biodegradation rate. Natural soils were used in all these studies, although no similar studies including amended soils have yet been published. In reference to the particular dependence of degradation on temperature, the use of the Arrhenius equation is generally accepted for properly describing that dependence through the activation energy  $E_a$  (Walker and Brown, 1983). This dependence can also be described with the  $Q_{10}$  factor, which is defined as the ratio of pesticide degradation rate coefficients ( $k_2/k_1$ ) at temperatures  $T_2$  and  $T_1$ , with  $T_1$  being 10 °C lower than  $T_2$  (EFSA, 2007). The  $Q_{10}$  factor or the equated  $E_a$  in the Arrhenius equation is used as an input in the four pesticide fate models PELMO, PRZM, PEARL and MACRO used for risk assessment in

European pesticide registration to account for the impact of different temperatures (FOCUS, 2000; Marín-Benito et al., 2014b). As a default, the value of  $Q_{10} = 2.2$  was proposed by FOCUS (1997) and updated to  $Q_{10} = 2.58$  by the European Food Safety Authority (EFSA, 2007). EFSA recommends using pesticide-specific  $Q_{10}$  values instead of the default value in modeling or risk assessment whenever they are available because it means models provide more accurate predictions of residues in the soil and/or water (Mamy et al., 2008). In addition, the default  $Q_{10}$  value reported by EFSA is the result of multiple pesticide degradation studies including only natural soils. Thus, its extrapolation to modeling studies with amended soils could under- or overestimate the effect of temperature on pesticide degradation rates and not properly reproduce their environmental fate (Marín-Benito et al., 2015) in a model of sustainable agriculture.

On the other hand, and besides the pesticide half-life ( $DT_{50}$ ) and sorption characteristics, the  $Q_{10}$  factor is considered to have the biggest influence on the prediction of pesticide loss, so it is critical information used in pesticide fate modeling and risk assessment (Dubus et al., 2003). Despite the sensitivity of FOCUS models toward these parameters, to the best of our knowledge no studies have been published assessing the influence of temperature on rates of herbicide degradation in amended soils.

The herbicides chlorotoluron (3-(3-chloro-*p*-tolyl)-1,1-dimethylurea) and flufenacet (4'-fluoro-*N*-isopropyl-2-[5-(trifluoromethyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yloxy] acetanilide) are widely used in the pre- and post-emergence control of grasses and some broad-leaved weeds in cereal and potato crops. Chlorotoluron is a phenylurea with a high potential for leaching due to its moderate solubility in water and low hydrophobicity (EC, 2005; PPDB, 2018). Indeed, chlorotoluron has frequently been detected in surface and ground waters, and in some cases at higher concentrations than those permitted by the EU for individual pesticides in drinking water ( $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Carabias-Martínez et al., 2003; Kotriklá et al., 2006). Under laboratory conditions, chlorotoluron  $DT_{50}$  values ranged between 13 and 92 days (EC, 2005). The dissipation of this herbicide is mainly due to microbial transformation (ElGouzi et al., 2015). Its major metabolite in soil is desmethyl chlorotoluron (3-(3-chloro-*p*-tolyl)-1-methylurea), which is characterized by a high mobility and  $DT_{50}$  values ranging from 52 to 66 days (EC, 2005; PPDB, 2018).

Flufenacet belongs to the chemical group oxyacetamide and is moderately soluble in water, with high sorption and hydrophobicity (EC, 2003). Flufenacet  $DT_{50}$  values ranged between 15 and 64 days under laboratory conditions, with flufenacet ESA (2-[(4-fluorophenyl)-isopropyl-amino]-2-oxo-ethanesulfonic acid) and flufenacet OA (2-[(4-fluorophenyl)-isopropyl-amino]-2-oxo-acetic acid) being its two major degradation products in soil (EC, 2003). The persistence of flufenacet ESA in soil ( $DT_{50} = 230$  days) is higher than that of flufenacet OA ( $DT_{50} = 11$  days), posing a serious threat to water quality due to its huge potential for leaching (GUS index = 7.20) (EC, 2003; PPDB, 2018; Ulrich et al., 2018). By contrast, low mobility has been reported for flufenacet (Milan et al., 2015; Rouchaud et al., 1999), although the risk of groundwater contamination in highly permeable soils is also high (USEPA, 1998).

Very few studies have been published on flufenacet degradation and its transformation products in soil (Gupta et al., 2001; Gupta and Gajbhiye, 2002; Rouchaud et al., 1999), and none including amended soils. By contrast, more and more varied studies have reported on chlorotoluron degradation and its major metabolite in soil (Badawi et al., 2009; Hussain et al., 2015; Kördel et al., 1995) although again, the effect of organic amendment on their degradation/formation has been little studied (Rodríguez-Liébana et al., 2014).

Accordingly, the objectives here were to study the following: i) the degradation kinetics of chlorotoluron and flufenacet at two different temperatures, 6 °C and 16 °C, in an unamended agricultural soil and one amended with spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC) under laboratory conditions in order to determine the

respective  $Q_{10}$  factors essential for the later simulation of their environmental fate with FOCUS models, and ii) the formation of the main metabolites of both herbicides over degradation time in soils with different treatments to assess the effect of organic amendments and temperature in the formation of these metabolites with a potential risk for water pollution. This work contributes to get relevant sustainable development goals inside an ongoing project on the evaluation of the leaching of these herbicides and their transformation products applied to experimental field plots cropped with wheat in soils previously amended with SMS or GC.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Herbicides

The soils were spiked with the commercial formulations Erturon® (chlorotoluron 50% w/v, Cheminova Agro S.A., Madrid, Spain) and Herold® (flufenacet 40% w/v, Bayer Crop Science S.L., Valencia, Spain). Analytical standards of chlorotoluron, flufenacet (>99.5% purity) and their metabolites desmethyl chlorotoluron, flufenacet ESA sodium salt and flufenacet OA (>99.3% purity) were supplied by Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). Their main characteristics are included in Table 1 (PPDB, 2018).

### 2.2. Organic residues

Spent mushroom substrate (SMS) from *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* (2:1) cultivation was composted under aerobic conditions (Sustratos de la Rioja S.L., Pradejon, Spain). Green compost (GC) is a vegetal residue from the pruning of plants and trees in parks and gardens (El Arca, S.L., Salamanca, Spain), also composted under aerobic conditions. Their main characteristics were determined by the methods reported previously (Marín-Benito et al., 2012) for air-dried samples (Table 2).

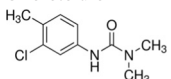
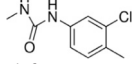
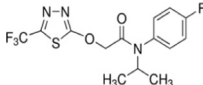
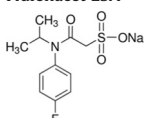
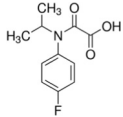
### 2.3. Soils and treatments

Topsoil samples (0–10 cm) were collected from experimental field plots (9 m × 9 m) corresponding to an experimental layout designed to simulate the environmental fate of herbicides. The field experiment was in a Eutric-Chromic Cambisol soil with sandy loam texture (14.9% clay, 4.7% silt, and 80.4% sand) located in the Muñovela experimental farm belonging to the Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca, Spain. Experimental plots corresponded to unamended soil (S), SMS-amended soil (S + SMS) at a rate of 140 t SMS ha<sup>-1</sup>, and GC-amended soil (S + GC) at a rate of 85 t GC ha<sup>-1</sup> on a dry weight basis. SMS and GC were homogeneously spreading with a tractor at field and then they were incorporated into the 20 cm topsoil with a rotavator. The soil's characteristics were determined by standard analytical methods (Marín-Benito et al., 2012; Sparks, 1996) (Table 2). Samples were collected and characterized after 30 days of organic residue application just before the application of herbicides in the field experiment to reproduce as faithfully as possible the initial state of the soil samples at field conditions. This time was considered appropriate for previous conditioning of the organic residue in the soil.

### 2.4. Degradation experiment

Freshly collected samples of unamended and amended soils were individually homogenized and sieved (<2 mm). Triplicate soil samples (600 g) for each treatment (S, S + SMS and S + GC) were then spiked with a combined dose of chlorotoluron (14 mg) and flufenacet (5.5 mg) per kg of dry soil using the commercial formulations Erturon and Herold, respectively. The soil moisture content was adjusted to 40% of the maximum soil water holding capacity in agreement with the moisture content of each sample previously determined. Then herbicide doses corresponding to five times the recommended agronomic doses for natural soils were applied. The samples were subsequently incubated for different time periods in the dark at two temperatures, 6 °C

**Table 1**  
Main characteristics of herbicides and their metabolites.

Common name / chemical structure	IUPAC name	WS <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Log Kow <sup>b</sup>	Koc/Kfoc <sup>c</sup> (mL g <sup>-1</sup> )	DT <sub>50</sub> <sup>d</sup> (days)	GUS index <sup>e</sup>
Chlorotoluron 	3-(3-chloro- <i>p</i> -tolyl)-1,1-dimethylurea	74	2.5	196	59	3.02
Desmethyl chlorotoluron 	3-(3-chloro- <i>p</i> -tolyl)-1-methylurea	–	–	248	60	2.84
Flufenacet 	4'-fluoro- <i>N</i> -isopropyl-2-[5-(trifluoromethyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yloxy]acetanilide	51	3.5	273.3	19.7	2.02
Flufenacet ESA 	2-(4-fluoro- <i>N</i> -propan-2-ylanilino)-2-oxoethanesulfonic acid	5500	–	12.5	302	7.20
Flufenacet OA 	((4-fluorophenyl) (isopropyl)amino) (oxo)acetic acid	–	–	14.0	11.1	2.98

<sup>a</sup> WS, water solubility at 20 °C.

<sup>b</sup> Octanol/water partition coefficient at pH 7 and 20 °C.

<sup>c</sup> Sorption coefficient normalized to organic carbon content.

<sup>d</sup> Time to degradation 50% of compound.

<sup>e</sup> Gustafson mobility index (PPDB, 2018).

**Table 2**  
Characteristics of the organic residues and unamended and amended soil (0–10 cm depth).

	SMS	GC	S <sup>c</sup>	S + SMS	S + GC
pH	7.9	7.2	6.34	7.11	6.99
OM (%) <sup>a</sup>	59.4	46.0	1.33	4.36	2.81
DOC (%) <sup>b</sup>	0.8	0.7	0.008	0.023	0.018
N (%)	2.3	1.1	0.05	0.24	0.14
C/N	15.2	24.3	14.5	10.7	12.0

<sup>a</sup> Organic matter, <sup>b</sup> Dissolved organic carbon, <sup>c</sup> Unamended soil.

(average winter temperature where the experimental plots were located) or 16 °C. A sterilized soil sample was also prepared for each soil treatment by autoclaving soil at 120 °C for 1 h on three consecutive days. The sterilized soils were treated with the herbicides and incubated as indicated above, and these samples were used as controls to check the chemical degradation of the herbicides. Soil sampling was performed at different times up to 67 or 273 days according to each herbicide's degradation rate.

### 2.5. Herbicide extraction and analysis

At each sampling time, duplicate soil samples (6 g) of each triplicate treatment of S, S + SMS and S + GC were extracted with acetonitrile (12 mL) with an ultrasonic bath for 1 h at 20 °C and shaking for 24 h at 20 °C in glass test-tubes. The samples were then centrifuged at 5045g for 15 min, and the herbicide extracts were filtered (<0.45 µm). Extracts (8 mL) were evaporated until dry at 25 °C under a nitrogen stream using an EVA-EC2-L evaporator (VLM GmbH, Bielefeld, Germany). The residue was dissolved in 0.5 mL of acetonitrile and transferred to a glass vial for analysis. The recoveries of the extraction method were determined by spiking three soil samples in each treatment with analytical grade herbicide to a final concentration of 3 mg kg<sup>-1</sup>, performing the extraction procedure as described above. The mean recovery values varied between 101% and 115% for chlorotoluron, and 95% and 101% for flufenacet.

The herbicides were determined by HPLC-DAD-MS using a Waters chromatograph (Waters Assoc., Milford, USA) with a Phenomenex Luna (3 µm C18, 150 × 4.6 mm) column. The mobile phase was acetonitrile:water +1% formic acid (80:10). The flow rate was 0.4 mL min<sup>-1</sup> and the sample injection volume was 20 µL. The detection by DAD was at 243 nm for chlorotoluron and 232 nm for flufenacet. The positive molecular ions (*m/z*) [M + H<sup>+</sup>] monitored with a MS detector were 213.04 for chlorotoluron and 364.03 for flufenacet. The retention times were 6.1 min for chlorotoluron and 7.9 min for flufenacet. Monitoring also involved positive molecular ions (*m/z*) [M + H<sup>+</sup>] 198.65 for desmethyl chlorotoluron, and negative molecular ions (*m/z*) [M-Na<sup>+</sup>] 274.26 for flufenacet ESA and [M-H<sup>+</sup>] 224.15 for flufenacet OA, respectively. The formation of metabolites during the dissipation experiment was quantified. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for flufenacet ranged from 0.003 (S + SMS) to 0.005 µg mL<sup>-1</sup> (S + GC), and from 0.009 (S + SMS) to 0.016 µg mL<sup>-1</sup> (S + GC), respectively. In the case of chlorotoluron, the LOD was 0.002 µg mL<sup>-1</sup> for all the soil treatments, and the LOQ varied between 0.006 (S + GC) and 0.008 µg mL<sup>-1</sup> (S + SMS).

### 2.6. Sorption study

The possible effect of sorption on herbicide degradation was assessed by determining the amount of herbicide sorbed in the unamended and amended soils. Duplicate samples of soils (5 g) were equilibrated with 10 mL of a 0.01 M CaCl<sub>2</sub> Milli-Q ultrapure water solution of both herbicides (commercial formulations) at concentrations of 10 µg mL<sup>-1</sup>. The suspensions were shaken at 6 °C or 16 °C for 24 h in a thermostatted chamber, with intermittent shaking for 2 h at three-hour intervals. The suspensions were subsequently centrifuged at

5045g for 15–30 min, and the herbicide's equilibrium concentrations (C<sub>e</sub>, µg mL<sup>-1</sup>) were determined. The amount of herbicide sorbed (C<sub>s</sub>, µg g<sup>-1</sup>) was considered to be the difference between that initially present in the solution and that remaining after equilibration with the soil.

### 2.7. Data analysis

The degradation kinetics for each herbicide and soil treatment was fitted to a single first-order (SFO) kinetic model or first order multi-compartment (FOMC) model. FOCUS work group guidelines were followed (FOCUS, 2006) for selecting the kinetic model that best describes the degradation results. The coefficient of determination and the chi-square test were calculated as indicators of the goodness of fit. The time to 50% degradation, or DT<sub>50</sub> value (days), was used to characterize the decay curves and compare variations in degradation rates. The kinetic models' parameters were estimated using the Excel Solver add-in Package (FOCUS, 2006).

The incubation temperature's effect on herbicide degradation was determined by the factor  $Q_{10} = DT_{50}(6\text{ °C})/DT_{50}(16\text{ °C})$ .

The distribution coefficients, K<sub>d</sub> (mL g<sup>-1</sup>), for each herbicide and soil treatment were determined from the relationship between C<sub>s</sub> and C<sub>e</sub>.

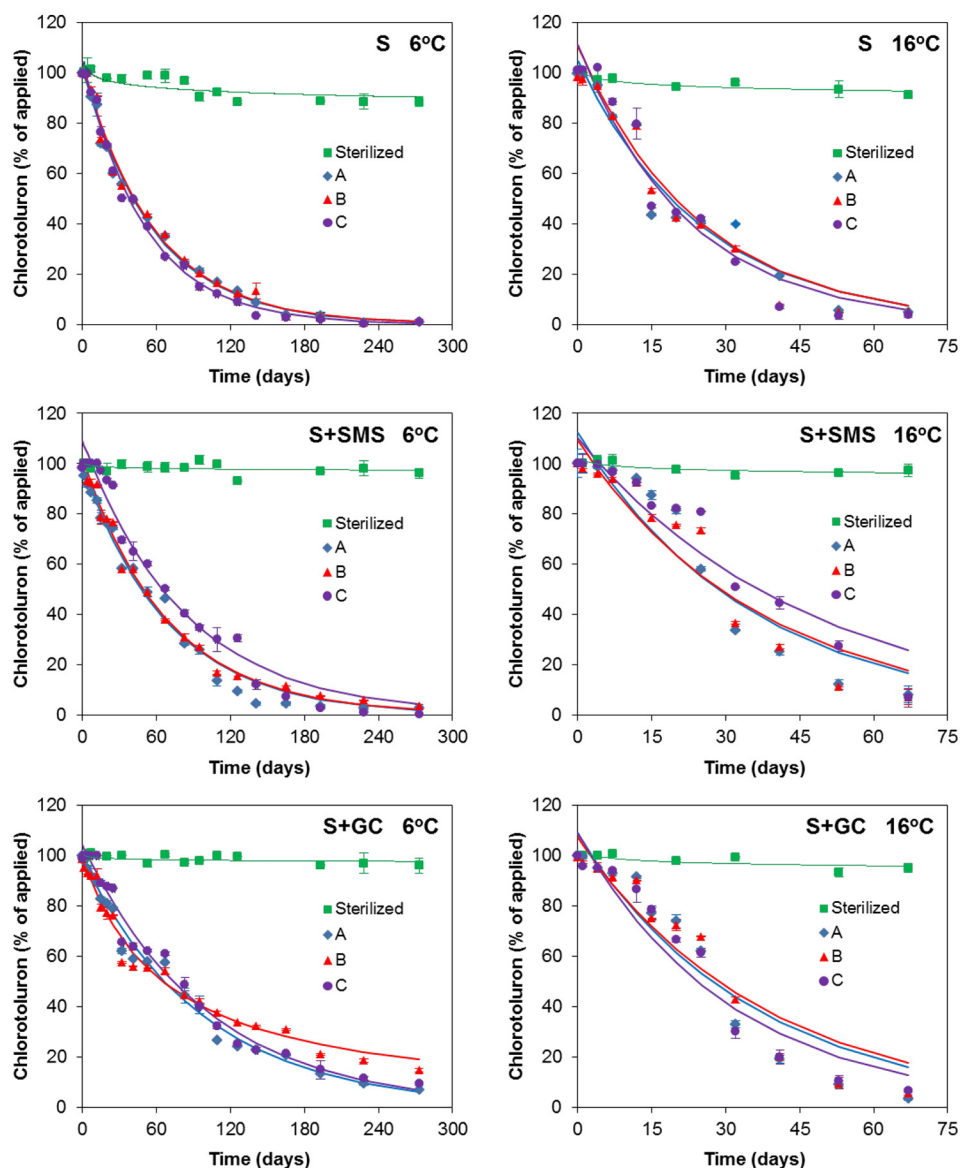
Analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the effects the different factors (soil treatment and temperature) had on herbicide dissipation. Standard deviation (SD) was used to indicate variability among replicates, and the least significant difference (LSD), at a confidence level of 95%, was determined to evaluate the effects of different soil treatments and temperatures on DT<sub>50</sub> values. Statgraphics Plus version 5.1 statistical software (Statgraphics Plus Corp., Princeton, NJ) was used.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Degradation kinetics of herbicides in unamended and amended soils at different temperatures

Figs. 1 and 2 include the degradation curves of herbicides in the unamended and amended soils during the incubation times of 273 and 67 days for chlorotoluron at 6 °C and 16 °C, and 273 days for flufenacet at both temperatures assayed, respectively. The degradation curves of chlorotoluron indicate a continuous degradation with time and, in general, they fitted the SFO model well for all the soil treatments and temperatures (Fig. 1). Only one replicate of soil amended with GC fitted the FOMC model better. Degradation was almost complete at the end of the incubation periods, with the percentages of herbicide residues being 1–10% after 273 days at 6 °C and 5–8% after 67 days at 16 °C. The degradation of flufenacet was initially fast for both temperatures and soil treatments, but the degradation rate subsequently slowed down (Fig. 2). The degradation curves of flufenacet always fitted the FOMC model better, independently of the incubation temperature and the treatment studied. In contrast to this research, other authors have reported that the degradation curves of flufenacet in unamended soil fit the SFO model well (Bloomberg et al., 2002; Gupta and Gajbhiye, 2002; Rouchaud et al., 1999). The percentages of flufenacet residues at the end of the incubation (273 days) were higher than those of chlorotoluron: 36–38% at 6 °C and 5–9% at 16 °C.

Tables 3 and 4 include the DT<sub>50</sub> values for chlorotoluron and flufenacet in S, S + SMS and S + GC at 6 °C and 16 °C, respectively. The degradation rates of flufenacet were lower than those of chlorotoluron for all the soil treatments and incubation temperatures, according to the longer persistence of flufenacet at 273 days, as previously indicated. Both herbicides have a moderate solubility in water, but a different hydrophobic nature. Flufenacet records a higher hydrophobicity, sorption and persistence in soil than chlorotoluron (PPDB, 2018). The DT<sub>50</sub> values reported for flufenacet in agricultural soils at 25 °C (10.1–31.0 days) were close to the value found in this work at 16 °C (21.2 days) (Gupta and Gajbhiye, 2002), although as expected



**Fig. 1.** Degradation kinetics of chlorotoluron in sterilized and non-sterilized unamended (S) and SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils incubated at 6 °C (273 days) and 16 °C (67 days). Bars indicate the standard deviation of the mean ( $n = 2$ ). A, B and C correspond to the three replicates per soil treatment.

they were different under other laboratory incubation conditions (49.3 days, at 6 °C). Gupta and Gajbhiye (2002) have observed that the degradation of flufenacet is slower in soils with a high adsorption capacity and slower desorption. Under laboratory conditions, the mean  $DT_{50}$  value for chlorotoluron in unamended soils was 59 days at 20 °C (PPDB, 2018), which was higher than the value calculated here at 16 °C (16.8 days).

The application of SMS and GC to the soil increased the  $DT_{50}$  values of both herbicides incubated at 6 °C and 16 °C (Tables 3 and 4). In amended soils, the  $DT_{50}$  values increased between 1.3 and 1.7 times for chlorotoluron, and between 1.7 and 1.9 times for flufenacet when compared with the values for the unamended soil. The  $DT_{50}$  values followed the order:  $S < S + GC < S + SMS$  for flufenacet at both incubation temperatures and for chlorotoluron at 16 °C, with this order being consistent with the higher soil OM content. However, for chlorotoluron incubated at 6 °C, the  $DT_{50}$  values followed the order:  $S < S + SMS < S + GC$  (Table 2).

The slower degradation in amended soils than in unamended soils is related to the higher sorption of chlorotoluron and flufenacet by amended soils, and therefore a lower bioavailability of the herbicides to be degraded. Sorption was evaluated by the distribution coefficients

determined at temperatures of 6 °C and 16 °C (Table 5). The  $K_d$  values indicate that the sorption of chlorotoluron by amended soils increased, being up to 4.6 times higher for S + SMS and up to 2.8 times for S + GC than for the unamended soil, comparing all  $K_d$  values at both temperatures. Similar increases were recorded for the sorption of flufenacet by amended soils. Small increases in the sorption coefficients of both herbicides for the amended soils were recorded at higher temperatures, as reported for some compounds (Kaur and Kaur, 2018), although it has also been reported that an increase, decrease or no change in sorption could be caused by an increase in temperature (Ten Hulscher and Cornelissen, 1996). However, the small increases in the sorption of herbicides by amended soils or by the higher temperature did not help to explain the different degradation rate of both herbicides.

The higher  $DT_{50}$  values found for flufenacet than for chlorotoluron could only be explained by the higher sorption in the SMS amended soil. The influence of sorption for decreasing the degradation rate has also been observed for other pesticides (Álvarez-Martín et al., 2016; Marín-Benito et al., 2014a; Marín-Benito et al., 2012). The more rapid dissipation of chlorotoluron could be due to an apparent dissipation, as reported for other phenylurea herbicides such as linuron, which was explained by the formation of non-extractable bound residues in

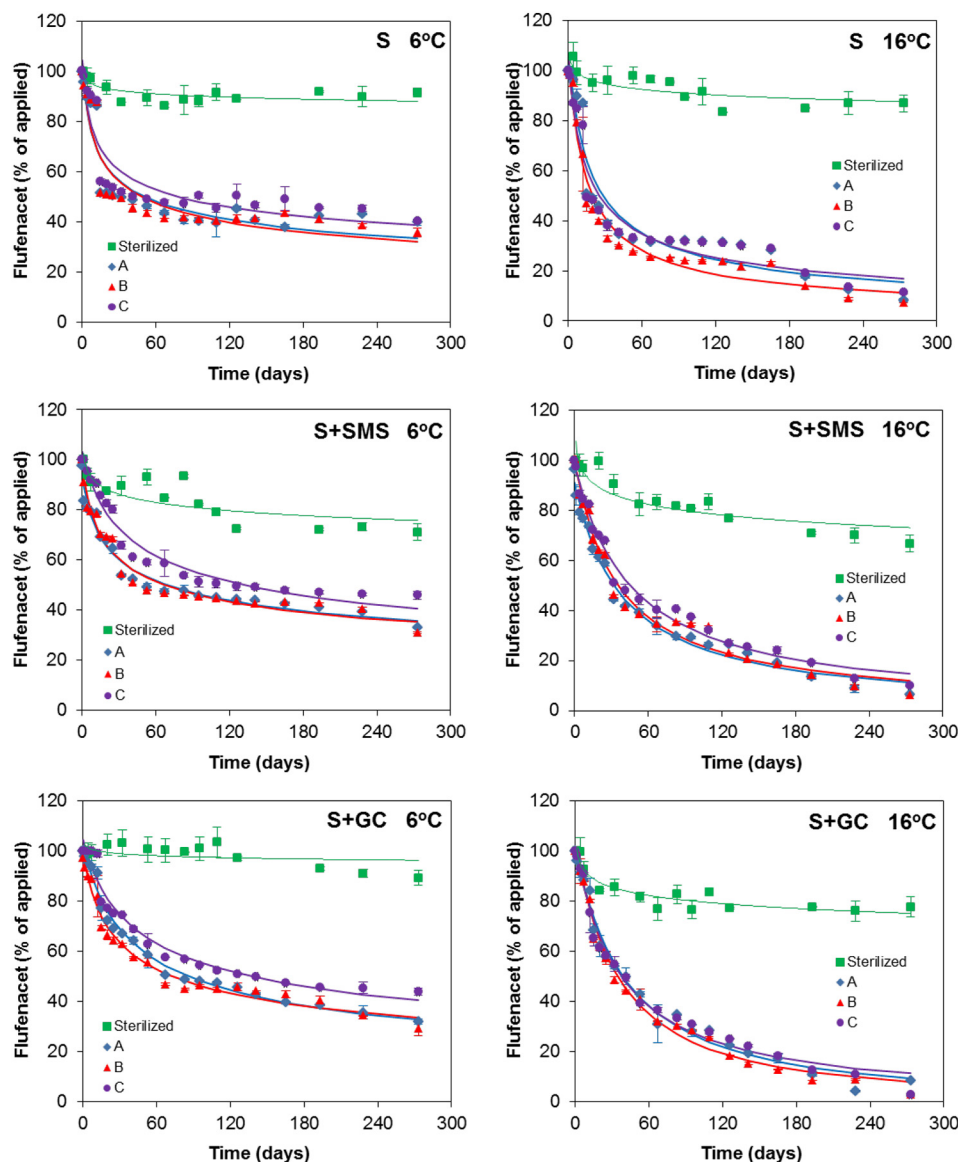


Fig. 2. Degradation kinetics of flufenacet in sterilized and non-sterilized unamended (S) and SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils incubated at 6 °C and 16 °C (273 days). Bars indicate the standard deviation of the mean (n = 2). A, B and C correspond to the three replicates per soil treatment.

amended soils (Marín-Benito et al., 2014a). The influence of the herbicide's chemical structure for the formation of non-extractable bound residues and for subsequent biodegradation has also been reported (Barriuso et al., 2008). These results would indicate that degradation rates depend on the soil amendment and herbicide characteristics.

The degradation of herbicides was also studied in sterilized soils. No degradation of chlorotoluron was observed in either of the treatments at both temperatures (89–96% remaining at 273 days) (Fig. 1). For flufenacet a slower degradation in sterilized soils than in non-sterilized ones was observed (Fig. 2), with the percentages of residues remaining at 6 °C being slightly higher (71–92%) than at 16 °C (67–87%). The dissipation of flufenacet in sterilized soils may be influenced by other abiotic factors over the incubation time. Herbicide photodegradation was not considered, as soils were kept in the dark during incubation. It is also possible that soil sterilization was incomplete, especially in the amended soils with higher soil microbial biomass and activity, as indicated previously (ElGouzi et al., 2015). These results show that the degradation of chlorotoluron and flufenacet was mainly

caused by microorganisms, as reported previously (ElGouzi et al., 2015; EC, 2003).

### 3.2. Metabolism of the herbicides in unamended and amended soil at different temperatures

Simultaneously to the degradation of herbicides, some metabolites of chlorotoluron and flufenacet were produced in all the soil treatments. The concentrations of desmethyl chlorotoluron, flufenacet OA and flufenacet ESA ( $\mu\text{g}$  metabolite  $\text{g}^{-1}$  dry soil) were evaluated over the incubation period of herbicides in the soils (Fig. 3).

Different amounts of desmethyl chlorotoluron were detected in unamended and amended soils. Peaks of metabolite concentrations were detected at short times at the beginning of the experiment conducted at 6 °C (up to 25 days), and they could explain the degradation of chlorotoluron in S and in S + GC. The concentrations detected were 0.49 and 0.59  $\mu\text{g}$   $\text{g}^{-1}$  dry soil in S and S + GC, respectively, and the total cumulative amount accounted for 21.9 and 18.1% of the dose of herbicide applied. Lower concentration peaks were



**Table 3**

Dissipation parameters and goodness of fit for chlorotoluron in unamended and SMS- or GC-amended soils incubated at 6 °C and 16 °C calculated by fitting the data to a SFO model.

Sample/temperature	k (days <sup>-1</sup> )	DT <sub>50</sub> (days)	χ <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Q <sub>10</sub> <sup>a</sup>
S/6 °C	0.017	40.0	5.2	0.993	2.3
	0.017	40.4	5.8	0.992	
	0.020	35.5	9.5	0.994	
S/16 °C		38.6 ± 2.72c	11.2	0.952	
	0.039	17.6			
	0.040	17.2			
	0.045	15.5			
S + SMS/6 °C		16.8 ± 1.12a	6.7	0.987	
	0.014	48.2			
	0.014	48.0			
S + SMS/16 °C		57.6	14.9	0.906	
	0.012	51.3 ± 5.49d			
	0.028	24.4			
	0.027	25.5			
S + GC/6 °C		32.0	5.1	0.986	
	0.010	27.3 ± 4.11b			
	1.034–69.0 <sup>b</sup>	67.7			
	0.010	65.9			
S + GC/16 °C		69.3	14.8	0.926	
	0.029	67.6 ± 1.70e			
	0.027	24.3			
	0.032	25.8			
		21.5	12.8	0.924	
		23.9 ± 2.18ab			14.9

<sup>a</sup> Estimated from  $Q_{10} = DT_{50}(6\text{ °C})/DT_{50}(16\text{ °C})$ .

<sup>b</sup> α and β values from the fitting of the degradation curve to the FOMC model.

Different letters in DT<sub>50</sub> values indicate significant differences among samples and treatments (LSD = 8.91,  $p < 0.05$ ).

determined throughout the degradation process. The maximum concentration of desmethyl chlorotoluron (0.12 μg g<sup>-1</sup>) and the cumulative amount (5.14% of herbicide applied) were lower in S + SMS, indicating that the herbicide's degradation mechanism was different to that observed in S and S + GC treatments. The highest sorption of chlorotoluron by S + SMS could explain a lower bioavailability of the herbicide to be degraded and the lower amount of metabolite produced in this soil. However, the degradation rate was higher than

**Table 4**

Dissipation parameters and goodness of fit for flufenacet in unamended and SMS- or GC-amended soils incubated at 6 °C and 16 °C calculated by fitting the data to a FOMC model.

Sample/temperature	α	β	DT <sub>50</sub> (days)	χ <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Q <sub>10</sub> <sup>a</sup>
S/6 °C	0.245	2.7	43.6	11.3	0.870	2.3
	0.262	3.2	41.9	11.8	0.872	
	0.211	2.4	62.3	10.4	0.857	
S/16 °C			49.3 ± 11.3a	14.4	0.924	
	0.590	10.7	23.9			
	0.656	9.1	17.1			
	0.501	7.5	22.5			
S + SMS/6 °C			21.2 ± 3.59a	4.8	0.963	
	0.257	6.6	91.3			
	0.262	5.6	73.1			
	0.307	13.7	117.4			
S + SMS/16 °C			93.9 ± 22.3b	6.1	0.983	
	1.000	38.8	38.8			
	0.950	32.8	35.2			
	0.967	44.4	46.5			
S + GC/6 °C			40.2 ± 5.77a	3.6	0.982	
	0.419	19.1	81.0			
	0.328	10.5	76.7			
	0.337	17.2	117.4			
S + GC/16 °C			91.7 ± 22.4b	4.7	0.964	
	1.381	59.1	38.6			
	1.380	50.8	33.2			
	1.069	39.9	36.4			
		36.1 ± 2.72a	6.1	0.984		
					5.8	0.989
			6.1	0.984		

<sup>a</sup> Estimated from  $Q_{10} = DT_{50}(6\text{ °C})/DT_{50}(16\text{ °C})$ . Different letters in DT<sub>50</sub> values indicate significant differences among samples and treatments (LSD = 38.4,  $p < 0.05$ ).

**Table 5**

Sorption coefficients (K<sub>d</sub>) for chlorotoluron and flufenacet in unamended and SMS- and GC-amended soils incubated at 6 °C and 16 °C calculated for an initial concentration of 10 μg mL<sup>-1</sup>.

	Chlorotoluron		Flufenacet	
	6 °C	16 °C	6 °C	16 °C
	K <sub>d</sub> ± SD (mL g <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> ± SD (mL g <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> ± SD (mL g <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> ± SD (mL g <sup>-1</sup> )
S	1.56 ± 0.37a	1.57 ± 0.24a	1.62 ± 0.22a	1.54 ± 0.03a
S + SMS	6.93 ± 0.47c	7.28 ± 0.92c	7.44 ± 0.26c	8.24 ± 0.08c
S + GC	4.05 ± 0.73b	4.37 ± 0.43b	3.98 ± 0.27b	4.36 ± 0.55b

SD, standard deviation of replicates (n = 2). Different letters in K<sub>d</sub> values indicate significant differences among samples and treatments (LSD = 1.81,  $p < 0.05$ ).

in S + GC, which means another chlorotoluron degradation pathway could be involved in this soil, such as mineralization or the formation of other metabolites.

The degradation rate of chlorotoluron in the soils was faster when the temperature increased to 16 °C, but the pattern of metabolite formation was similar to that observed at 6 °C. However, the maximum peaks were obtained at lower times (up to 15 days), and the total cumulative amounts were lower than those determined at 6 °C (9.8, 15.7 and 3.4% of herbicide applied in S, S + GC and S + SMS, respectively) (Fig. 3). Desmethyl chlorotoluron is reported to be the main metabolite of chlorotoluron detected in soils (EC, 2005; PPDB, 2018) in amounts > 10% of the chlorotoluron applied (Badawi et al., 2009; EC, 2005). Furthermore, the degradation mechanism of chlorotoluron by demethylation in soil prevails over the oxidation of the ring-methyl group (Gross et al., 1979).

The metabolites flufenacet OA and flufenacet ESA were also detected in unamended and amended soils. At 6 °C, maximum concentration peaks of 0.34 and 0.08 μg g<sup>-1</sup> were detected in S for flufenacet OA and flufenacet ESA after 12 and 109 days of herbicide application, respectively. At the end of the experiment (273 days), the cumulative amount of flufenacet OA (2.2 μg g<sup>-1</sup>) and flufenacet ESA (0.32 μg g<sup>-1</sup>) reached 40.0% and 5.8% of the amount of herbicide applied, respectively. In S + GC, peaks of flufenacet OA and flufenacet ESA were also recorded, although their concentrations were lower (0.15 and 0.03 μg g<sup>-1</sup>) and were delayed or advanced compared to S, respectively (Fig. 3). The total formation of flufenacet OA (0.66 μg g<sup>-1</sup>) and flufenacet ESA (0.23 μg g<sup>-1</sup>) represented 12.0% and 4.2% of the amount of herbicide applied to S + GC after 273 days, respectively. In S + SMS, the maximum concentrations of flufenacet OA (0.06 μg g<sup>-1</sup>) and flufenacet ESA (0.05 μg g<sup>-1</sup>) were observed after 32 and 41 days of herbicide application. Similar to results in S + GC, these concentrations were lower in S + SMS than in S, and smaller amounts of flufenacet OA and flufenacet ESA were accumulated at the end of the experiment (0.48 and 0.33 μg g<sup>-1</sup> representing 8.7% and 6.0% of the herbicide applied, respectively). These results indicate a different herbicide degradation mechanism in this soil. The higher sorption of flufenacet by S + SMS could explain a lower bioavailable amount of compound and the lower amount of metabolite produced.

The flufenacet degradation rate in soils was faster when the temperature increased to 16 °C than for chlorotoluron (Fig. 3). Only a slight change in the metabolites concentrations was recorded in S + GC and S + SMS with increasing temperature. The formation of these metabolites was reported in studies on flufenacet degradation in unamended soils under laboratory or field conditions (Bloomberg et al., 2002).

The results reflect the influence of organic residues for modifying the herbicide degradation mechanism, possibly being determined by the sorption characteristics and the influence of this process on the bioavailability of herbicide, or by the nature of microorganisms provided by the organic residues for enhancing degradation.

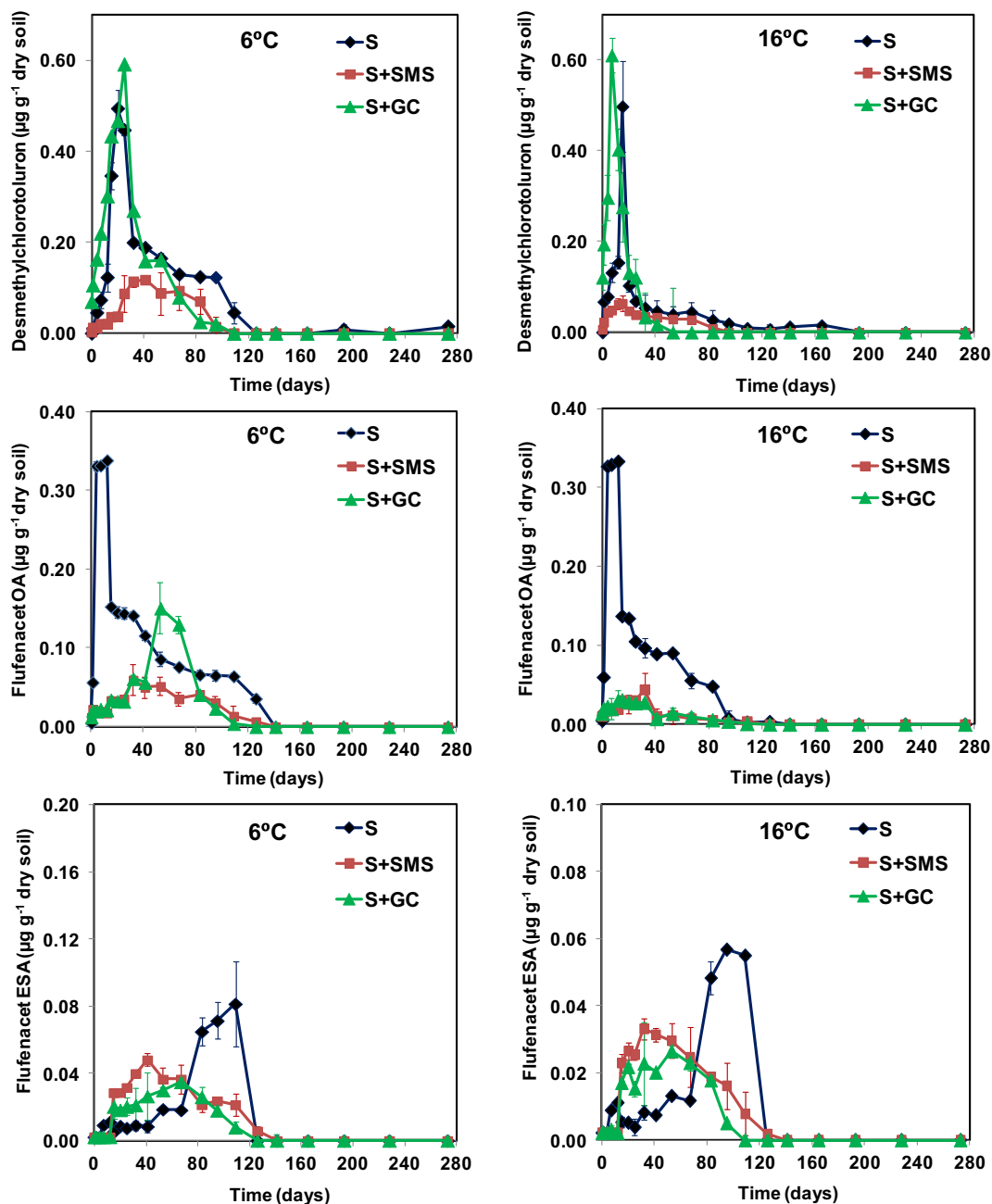


Fig. 3. Formation of desmethyl chlorotoluron, flufenacet OA and flufenacet ESA in non-sterilized unamended (S) and SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils incubated at 6 °C and 16 °C over time. Bars indicate the standard deviation of the mean ( $n = 6$ ).

### 3.3. Influence of soil treatment in the $Q_{10}$ factor

The degradation of both herbicides was more rapid at 16 °C than at 6 °C, as observed for other pesticides (El Azhari et al., 2018; Walker et al., 1992; Walker and Jurado-Exposito, 1998) probably due to the increase in microbial structure and/or activity with temperature. Temperature can regulate the structure and functions of the soil microbiome. In fact, it has been reported that microbial communities in soil collected during the summer and winter differ not only in composition, but also in their overall function (Reedich et al., 2017).

The  $DT_{50}$  values determined at two temperatures permitted the calculation of the  $Q_{10}$  factor. The  $Q_{10}$  factor values varied between 1.9 and 2.8 for chlorotoluron (Table 3) and between 2.3 and 2.5 for flufenacet (Table 4). This factor was the same for both herbicides in

the unamended soil, while the effect of temperature on the degradation rate of herbicides in the amended soils was greater for flufenacet ( $Q_{10} = 2.3$ ) in the S + SMS than for chlorotoluron ( $Q_{10} = 1.9$ ). However, incubation temperature had a greater impact on S + GC for chlorotoluron ( $Q_{10} = 2.8$ ) than for flufenacet ( $Q_{10} = 2.5$ ).

The  $Q_{10}$  values determined for the unamended soil agree with those reported for herbicides, as well as for other pesticides under laboratory conditions. Mamy et al. (2008) have simulated the fate of the herbicides glyphosate, trifluralin and metazachlor in a clay loam calcareous soil using  $Q_{10}$  values ranging from 1.7 to 2.3, which were determined experimentally at 18 °C and 28 °C. El Azhari et al. (2018) have also reported a  $Q_{10}$  value of 2.3 for tebuconazole in a laboratory study under two temperature regimes (20 °C and 2–9 °C simulating winter conditions), differing by approximately 10 °C. Previously, Rouchaud et al. (1999) have

observed decreasing  $DT_{50}$  values (up to 1.75 times) of flufenacet at higher temperatures (spring and summer) than at lower temperatures (winter) under field conditions, being due to higher soil microbial activities. For chlorotoluron, an increase in  $DT_{50}$  values of 2.66 times was reported when the temperature decreased from 20 °C to 10 °C under aerobic laboratory conditions (EC, 2005).

The  $Q_{10}$  values calculated in this work for chlorotoluron and flufenacet considering both unamended and amended soils include the value of 2.58 recommended by default for modeling studies (EFSA, 2007). From a comparative viewpoint, the  $Q_{10}$  values determined for both herbicides in the unamended soil were slightly lower than the default value. However, this comparison cannot, or at least should not, be made for amended soils, as the default value recommended by EFSA was averaged from a database that includes degradation studies of pesticides from different chemical groups, being carried out solely with unamended soils due to the lack of similar studies with amended soils. It is important to obtain these data for amended soils through laboratory experiments because they are required for highly accurately parameterizing pesticide fate models (e.g. FOCUS models) in order to avoid overestimating or underestimating the temperature effect on the pesticide degradation rate in simulation studies that include this agricultural practice.

#### 4. Conclusions

Incubation temperature and organic amendments had no significant impact on the kinetic model that best fits the experimental degradation curves of chlorotoluron and flufenacet in an agricultural soil. This impact depended solely on the herbicide. However, the application of the organic amendments to soil decreased the degradation rates of both herbicides due to their higher sorption and lower bioavailability for degrading. This effect of the amendments differed depending on the herbicide and incubation temperature. An expected faster degradation was observed for both herbicides at 16 °C than that at 6 °C, possibly because the increased microbiological activity with the higher temperature meant a significant presence of metabolites in all the soil treatments and incubation temperatures. The estimated  $Q_{10}$  values showed the need to carry out these laboratory studies for amended soils, as the parameterization of pesticide fate models with the default values recommended for  $Q_{10}$  factor by EFSA (2007) could overestimate or underestimate the effect of temperature on the degradation rate of pesticides in amended soils. These effects have consequences on the environmental impact of pesticides and their consideration is relevant in order to maintain a sustainable development agricultural systems.

#### Acknowledgements

This work has been funded by MINECO/FEDER UE (Project AGL2015-69485-R). J. M. Marín-Benito thanks MINECO for his Juan de la Cierva-Incorporación contract and M. J. Carpio thanks Junta de Castilla y León for his predoctoral contract. The authors thank J. M. Ordax for technical assistance.

#### References

AEPLA, 2018. Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas. Available online. [www.aepla.es](http://www.aepla.es), Accessed date: 21 May 2018.

Alletto, L., Coquet, Y., Benoit, P., Bergheaud, V., 2006. Effects of temperature and water content on degradation of isoproturon in three soil profiles. *Chemosphere* 64, 1053–1061. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.004>.

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. *Sci. Total Environ.* 550, 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.151>.

El Azhari, N., Dermou, E., Barnard, R.L., Storck, V., Tourna, M., Beguet, J., Karas, P.A., Lucini, L., Rouard, N., Botteri, L., Ferrari, F., Trevisan, M., Karpouzias, D.G., Martin-Laurent, F., 2018. Science of the total environment the dissipation and microbial ecotoxicity of tebuconazole and its transformation products in soil under standard laboratory and

simulated winter conditions. *Sci. Total Environ.* 637–638, 892–906. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.088>.

Badawi, N., Rønne, S., Olsson, S., Kragelund, B.B., Johnsen, A.H., Jacobsen, O.S., Aamand, J., 2009. Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus *Mortierella* sp. *Environ. Pollut.* 157, 2806–2812. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.019>.

Barriuso, E., Benoit, P., Dubus, I.G., 2008. Formation of pesticide nonextractable (bound) residues in soil: magnitude, controlling factors and reversibility. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1845–1854. <https://doi.org/10.1021/es7021736>.

Bastida, F., Selevsek, N., Torres, I.F., Hernández, T., García, C., 2015. Soil restoration with organic amendments: linking cellular functionality and ecosystem processes. *Sci. Rep.* 5, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep15550>.

Bloomberg, A.M., Shadrack, B.A., Arthur, E.L., Clay, V.E., 2002. Outdoor soil metabolism of [phenyl- $^{14}C$ ] flufenacet on California. *Soil*, 167–182. <https://doi.org/10.1021/bk-2002-0813.ch012>.

Briceño, G., Palma, G., Durán, N., 2007. Influence of organic amendment on the biodegradation and movement of pesticides. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 37, 233–271. <https://doi.org/10.1080/10643380600987406>.

Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Fernández-Laespada, M.E., Calvo-Serono, L., Sánchez-San Román, F.J., 2003. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res.* 37, 928–938. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00366-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00366-4).

Coppola, L., Castillo, P., Del, M., Vischetti, C., 2011. Degradation of isoproturon and bentazone in peat- and compost-based biomixtures. *Pest Manag. Sci.* 67, 107–113. <https://doi.org/10.1002/ps.2040>.

Dubus, I.G., Brown, C.D., Beulke, S., 2003. Sensitivity analyses for four pesticide leaching models. *Pest Manag. Sci.* 59, 962–982. <https://doi.org/10.1002/ps.723>.

EC (European Commission. Directorate-General Health & Consumer Protection), 2003. *Review Report for the Active Substance Flufenacet* (30 pp).

EC (European Commission. Directorate-General Health & Consumer Protection), 2005. *Review Report for the Active Substance Chlorotoluron* (54 pp).

EFSA, 2007. *Scientific opinion of the panel on plant protection products and their residues on a request from EFSA related to the default  $Q_{10}$  value used to describe the temperature effect on transformation rates of pesticides in soil.* *EFSA J.* 6, 1–32.

Elgouzi, S., Draoui, K., Chtoun, E.H., Dolores Mingorance, M., Peña, A., 2015. Changes in the persistence of two phenylurea herbicides in two Mediterranean soils under irrigation with low- and high-quality water: a laboratory approach. *Sci. Total Environ.* 538, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.146>.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018. Available online. <http://faostat3.fao.org>, Accessed date: 24 May 2018.

FOCUS, 1997. *Soil Persistence Models and EU Registration* 29.2.97 (77 pp).

FOCUS, 2000. *Focus groundwater scenarios in the EU review of active substances. Report of the FOCUS Groundwater Scenarios Workgroup* EC Document Reference Sanco/321/2000 Rev.2 (202 pp).

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

García-Delgado, C., Barba, V., Marín-Benito, J.M., Igual, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2018. Simultaneous application of two herbicides and green compost in a field experiment: implications on soil microbial community. *Appl. Soil Ecol.* 127, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.03.004>.

Grenni, P., Rodríguez-Cruz, M.S., Herrero-Hernández, E., Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Caracciolo, A.B., 2012. Effects of wood amendments on the degradation of terbuthylazine and on soil microbial community activity in a clay loam soil. *Water Air Soil Pollut.* 223, 5401–5412. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1289-z>.

Gross, D., Laanio, T., Dupuis, G., Esser, H.O., 1979. The metabolic behavior of chlorotoluron in wheat and soil. *Pestic. Biochem. Physiol.* 10, 49–59. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(79\)90007-5](https://doi.org/10.1016/0048-3575(79)90007-5).

Gupta, S., Gajbhiye, V.T., 2002. Effect of concentration, moisture and soil type on the dissipation of flufenacet from soil. *Chemosphere* 47, 901–906. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00017-6).

Gupta, S., Gajbhiye, V.T., Agnihotri, N.P., 2001. Adsorption – desorption, persistence, and leaching behavior of flufenacet in alluvial soil of India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 9–16. <https://doi.org/10.1007/s001280000198>.

Guzzella, L., Pozzoni, F., Giuliano, G., 2006. Herbicide contamination of surficial groundwater in northern Italy. *Environ. Pollut.* 142, 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.037>.

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. *J. Hydrol.* 486, 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2013.01.025>.

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). *Sci. Total Environ.* 609, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.113>.

Hussain, S., Arshad, M., Springael, D., Sørensen, S.R., Bending, G.D., Devers-Lamrani, M., Maqbool, Z., Martin-Laurent, F., 2015. Abiotic and biotic processes governing the fate of phenylurea herbicides in soils: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 1947–1998. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.1001141>.

Jurado-Exposito, M., Walker, A., 1998. Degradation of isoproturon, propyzamide and alachlor in soil with constant and variable incubation conditions. *Weed Res.* 38, 309–318. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.1998.00099.x>.

Kah, M., Beulke, S., Brown, C.D., 2007. Factors influencing degradation of pesticides in soil. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4487–4492. <https://doi.org/10.1021/jf0635356>.

- Kaur, P., Kaur, P., 2018. Time and temperature dependent adsorption-desorption behaviour of pretilachlor in soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.081>.
- Kördel, W., Wahle, U., Knoche, H., Hund, K., 1995. Degradation capacities of chlorotoluron and simazine in subsoil horizons. *Sci. Total Environ.* 171, 43–50. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04688-2](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04688-2).
- Kotrikla, A., Gatidou, G., Lekkas, T.D., 2006. Monitoring of triazine and phenylurea herbicides in the surface waters of Greece. *J. Environ. Sci. Health B* 41, 135–144. <https://doi.org/10.1080/03601230500364336>.
- 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 Manag. Sci.* 64, 262–275. <https://doi.org/10.1002/ps>.
- 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. *J. Soils Sediments* 12, 1111–1123. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0525-x>.
- Marín-Benito, J.M., Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2014a. Effect of different organic amendments on the dissipation of linuron, diazinon and metolachlor in an agricultural soil incubated for different time periods. *Sci. Total Environ.* 476–477, 611–621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.052>.
- Marín-Benito, J.M., Pot, V., Alletto, L., Mamy, L., Bedos, C., Barriuso, E., Benoit, P., 2014b. Comparison of three pesticide fate models with respect to the leaching of two herbicides under field conditions in an irrigated maize cropping system. *Sci. Total Environ.* 499, 533–545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.143>.
- Marín-Benito, J.M., Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Mamy, L., 2015. Modeling fungicides mobility in undisturbed vineyard soil cores unamended and amended with spent mushroom substrates. *Chemosphere* 134, 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.103>.
- Marín-Benito, J., Sánchez-Martín, M., Rodríguez-Cruz, M., 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. <https://doi.org/10.3390/toxics4030017>.
- Marín-Benito, J.M., Barba, V., Ordax, J.M., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2018. Application of green compost as amendment in an agricultural soil: Effect on the behaviour of triasulfuron and prosulfocarb under field conditions. *J. Environ. Manag.* 207, 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.024>.
- Milan, M., Ferrero, A., Fogliatto, S., Piano, S., Vidotto, F., 2015. Leaching of S-metolachlor, terbuthylazine, desethyl-terbuthylazine, mesotrione, flufenacet, isoxaflutole, and diketonitrile in field lysimeters as affected by the time elapsed between spraying and first leaching event. *J. Environ. Sci. Health B* 50, 851–861. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1062650>.
- PPDB, 2018. Pesticide Properties Data Base. University of Hertfordshire, UK <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>.
- Reedich, L.M., Millican, M.D., Koch, P.L., 2017. Temperature impacts on soil microbial communities and potential implications for the biodegradation of turfgrass pesticides. *J. Environ. Qual.* 46, 490–497. <https://doi.org/10.2134/jeq2017.02.0067>.
- Rodríguez-Cruz, M.S., Herrero-Hernández, E., Ordax, J.M., Marín-Benito, J.M., Draoui, K., Sánchez-Martín, M.J., 2012a. Adsorption of pesticides by sewage sludge, grape marc, spent mushroom substrate and by amended soils. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 92, 933–948. <https://doi.org/10.1080/03067319.2011.609933>.
- Rodríguez-Cruz, M.S., Marín-Benito, J.M., Ordax, J.M., Azejjel, H., Sánchez-Martín, M.J., 2012b. Influence of pine or oak wood on the degradation of alachlor and metalaxyl in soil. *J. Environ. Manag.* 95, S228–S232. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.043>.
- Rodríguez-Liébana, J.A., ElGouzi, S., Mingorance, M.D., Castillo, A., Peña, A., 2014. Irrigation of a Mediterranean soil under field conditions with urban wastewater: effect on pesticide behaviour. *Agric. Ecosyst. Environ.* 185, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.12.026>.
- Rouchaud, J., Neus, O., Cools, K., Bulcke, R., 1999. Flufenacet soil persistence and mobility in corn and wheat crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 460–466. <https://doi.org/10.1007/s001289901002>.
- Sparks, D.L., 1996. *Methods of Soil Analysis. Part 3—Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI.
- Ten Hulscher, T.E.M., Cornelissen, G., 1996. Effect of temperature on sorption equilibrium and sorption kinetics of organic micropollutants - a review. *Chemosphere* 32, 609–626. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00345-2](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00345-2).
- Ulrich, U., Hörmann, G., Unger, M., Pfannerstill, M., Steinmann, F., Fohrer, N., 2018. Lentic small water bodies: variability of pesticide transport and transformation patterns. *Sci. Total Environ.* 618, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.032>.
- USEPA, 1998. *United States Environmental Protection Agency Pesticide Fact Sheet – Flufenacet*. USEPA, Washington, DC (31 pp).
- Walker, A., Brown, P.A., 1983. Measurement and prediction of chlorsulfuron persistence in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 365–372. <https://doi.org/10.1007/BF01610146>.
- Walker, A., Jurado-Exposito, M., 1998. Adsorption of isoproturon, diuron and metsulfuron-methyl in two soils at high soil:solution ratios. *Weed Res.* 38, 229–238. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.1998.00087.x>.
- Walker, A., Moon, Y.-H., Welch, S.J., 1992. Influence of temperature, soil moisture and soil characteristics on the persistence of alachlor. *Pestic. Sci.* 35, 109–116. <https://doi.org/10.1002/ps.2780350203>.
- Walker, A., Helweg, A., Jacobson, O.S., 1997. *Temperature and pesticide degradation. Soil Persistence Models and European Union Pesticide Registration: Final Report of the FOCUS Working Group*. European Union Document DOC 7617/VI/96, pp. 10–21.
- Yazdanpanah, N., Mahmoodabadi, M., Cerdà, A., 2016. The impact of organic amendments on soil hydrology, structure and microbial respiration in semiarid lands. *Geoderma* 266, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.11.032>.

# CAPÍTULO 2

## RESUMEN



## **CAPÍTULO 2: Mobility monitoring of two herbicides in amended soils: A field study for modeling applications.**

### **RESUMEN**

La agricultura actual considera cada vez más importante la aplicación de residuos orgánicos al suelo como enmiendas para incrementar su fertilidad, y la aplicación de pesticidas para incrementar la productividad de los cultivos. Sin embargo, la materia orgánica (MO) de los residuos, dependiendo de su naturaleza y composición, puede modificar los procesos que gobiernan la dinámica de los pesticidas en el suelo. Este hecho puede tener un impacto en su destino medioambiental que puede dar lugar a la contaminación de aguas superficiales y subterráneas no prevista inicialmente. El carbono orgánico sólido (CO) de los residuos orgánicos tiene influencia en los procesos de adsorción de los pesticidas, mientras que el carbono orgánico disuelto (COD) tiene influencia en los procesos de movilidad de estos compuestos. No obstante, son poco frecuentes los estudios que abordan este impacto en condiciones reales de campo, donde existe una interacción de múltiples variables capaces de mostrar un comportamiento diferente al observado en estudios de laboratorio, permitiendo obtener conclusiones más representativas.

Por tanto, los objetivos de este trabajo fueron: i) evaluar el efecto de dos residuos orgánicos, sustrato postcultivo de hongos (SMS) y compost verde (GC), sobre la movilidad y el balance total de dos herbicidas, clortoluron (CTL) y flufenacet (FNC), en un experimento de campo basado en un suelo agrícola cultivado con trigo de invierno, y ii) obtener un conjunto de datos completo que incluye contenido volumétrico de agua del suelo, y concentraciones de  $\text{Br}^-$  y herbicidas en los perfiles de suelo sin enmendar y enmendados para simular posteriormente su destino ambiental con modelos FOCUS de lixiviación de pesticidas.

Se realizó un experimento de campo de dos años de duración (2016 – 2018) en un suelo de textura franco – arenosa en la finca experimental Muñozvela del IRNASA, CSIC. Se diseñaron nueve parcelas distribuidas al azar (tres réplicas por tratamiento) que consistieron en suelo sin enmendar (S), y suelo enmendado con SMS (S + SMS) y GC (S + GC) a la dosis de 140 y 85 t ha<sup>-1</sup> en peso seco, respectivamente. Las parcelas fueron equipadas con un tubo de PVC de 120 cm de largo para medir periódicamente el contenido volumétrico en agua del perfil del suelo con una sonda eléctrica y evaluar su

evolución temporal. Los herbicidas, pertenecientes a distintas familias químicas y con diferente comportamiento de movilidad, fueron aplicados bajo las formulaciones comerciales Erturon<sup>®</sup> (CTL 50% p/v) y Herold<sup>®</sup> (FNC 40% p/v). Las características dispersivas de los herbicidas en el perfil de suelo se evaluaron a partir del comportamiento de movilidad del ion bromuro (KBr) aplicado como trazador. Los herbicidas CTL, FNC y el ion Br<sup>-</sup> se aplicaron una vez por cada ciclo de cultivo a 15, 5 y 53 kg i.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente. La dosis de herbicida utilizada fue cinco veces la dosis agronómica, y los compuestos se aplicaron conjuntamente en la pre-emergencia del trigo. Las concentraciones residuales de los productos químicos se determinaron en perfiles de suelo (0 – 100 cm) muestreados regularmente. Los herbicidas se cuantificaron mediante HPLC – DAD – MS y el ion Br<sup>-</sup> se cuantificó por cromatografía iónica con detector de conductividad. Las variables climáticas se monitorizaron durante todo el experimento en una estación meteorológica de la AEMET ubicada *in situ*.

El orden de movilidad en el perfil del suelo en todos los tratamientos fue FNC < CTL < Br<sup>-</sup>. Durante todo el experimento, se observó que la aplicación de residuos orgánicos aumentó la capacidad de retención de agua en la capa superficial del suelo (0–20 cm), siguiendo el orden S < S + GC < S + SMS, de acuerdo al mayor contenido de CO, contribuyendo de esta manera a aumentar la fertilidad del suelo y la adsorción de los herbicidas, y a ralentizar la percolación y la lixiviación de solutos. Este efecto se observó principalmente para FNC, el herbicida más hidrofóbico, en el cual se observó una menor movilidad hacia tramos de suelo más profundos en comparación con el CTL en todos los tratamientos.

La aplicación de las enmiendas orgánicas dio lugar a cambios en los contenidos de CO y COD en superficie y en el perfil del suelo. El CO aumentó las cantidades residuales de CTL y FNC en la capa superficial, disminuyéndolas en el perfil del suelo y observándose un lavado mayor de los compuestos en el suelo sin enmendar. Los resultados están de acuerdo con los coeficientes de adsorción de ambos herbicidas, más elevados por los suelos enmendados que por el suelo sin enmendar, y más elevados para el FNC que para el CTL. El COD de las enmiendas orgánicas contribuyó en gran medida al transporte de ambos herbicidas a horizontes más profundos del suelo, así como a aumentar la biodisponibilidad de CTL para ser degradado. Durante el primer período experimental (2016 – 2017) los tres compuestos se lixiviaron hasta 100 cm de profundidad en todos los tratamientos con cantidades residuales < 2.6%, debido a los eventos de lluvia registrados poco después de la aplicación inicial de los compuestos en los suelos y al alto



contenido inicial de humedad del suelo. Sin embargo, durante el segundo período experimental (2017 – 2018), la alta cantidad de lluvia registrada controló la movilidad de grandes cantidades de  $\text{Br}^-$  (< 20%) hasta los 100 cm en todos los tratamientos, y cantidades bajas de los herbicidas (< 1.0%) alcanzaron la capa más profunda sólo en S + SMS. La persistencia del FNC, en la capa superior del suelo (0–10 cm) y en los tres perfiles del suelo fue mayor que la del CTL durante todo el experimento.

El bajo balance total de los tres compuestos en los perfiles del suelo al final de ambos períodos experimentales no está de acuerdo con las bajas cantidades de ambos herbicidas lixiviados por debajo de 1 m, por lo que otros procesos de disipación podrían estar implicados en la pérdida de los compuestos. En el caso del  $\text{Br}^-$ , la absorción de este elemento por las plantas de trigo podría representar un sumidero importante para explicar la pérdida del mismo en el perfil del suelo. En el caso de los herbicidas, otros mecanismos de disipación diferentes a la movilidad (degradación, mineralización, formación de residuos enlazados no extraíbles y/o absorción por el cultivo) podrían estar involucrados, especialmente en los suelos enmendados. La detección de metabolitos, principalmente de CTL, confirmó la degradación como una de sus posibles vías de disipación.

Los resultados mostraron que el SMS y el GC son útiles como enmiendas orgánicas para preservar la calidad del suelo y el agua, pero en el caso del SMS, su mayor contenido de COD podría implicar un mayor riesgo potencial de contaminación del agua subterránea en comparación con el GC. El conjunto de datos obtenido de este estudio será utilizado en simulaciones con modelos FOCUS de lixiviación de pesticidas para predecir la posible contaminación del agua bajo este tipo de escenarios, así como para optimizar las dosis de aplicación de residuos orgánicos dirigido a minimizar y/o evitar riesgos de contaminación ambiental.



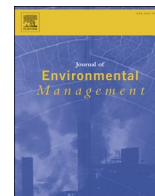
**CAPÍTULO 2**  
**ARTÍCULO PUBLICADO**





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Environmental Management

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jenvman>

Research article

# Mobility monitoring of two herbicides in amended soils: A field study for modeling applications

María J. Carpio<sup>a</sup>, M. Sonia Rodríguez-Cruz<sup>a</sup>, Carlos García-Delgado<sup>a,b</sup>, María J. Sánchez-Martín<sup>a</sup>, Jesús M. Marín-Benito<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Natural Resources and Agrobiological of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008, Salamanca, Spain

<sup>b</sup> Department of Geology and Geochemistry, Autonomous University of Madrid, 28049, Madrid, Spain



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Leaching  
Chlorotoluron  
Flufenacet  
Bromide tracer  
Soil profile  
Experimental amended plots

## ABSTRACT

This paper reports the mobility and total balance of chlorotoluron (CTL), flufenacet (FNC) and bromide ion ( $\text{Br}^-$ ) throughout a sandy soil profile after the application of spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC). Obtaining mobility dataset is crucial to simulate the herbicides' fate under amended soil scenarios by application pesticide leaching models with regulatory application (FOCUS models). The application of organic residues is nowadays increased to improve the crop yields and there is a gap in the simulations of this kind of amended scenarios. A two-year field experiment involving unamended soil (S) and SMS- or GC-amended soil plots was conducted. CTL, FNC, and  $\text{Br}^-$  were annually applied and their residual concentrations were determined in soil profiles (0–100 cm) regularly sampled. In all the treatments the order of mobility is followed as  $\text{FNC} < \text{CTL} < \text{Br}^-$ . SMS and GC increased herbicide retention in the top 10 cm by the higher organic carbon (OC) content than the unamended soil, and their ability to increase the soil's water-holding capacity and to decrease water percolation. Simultaneously dissolved organic carbon (DOC) content facilitated herbicide transport being it favoured by the initial soil moisture content and the rainfall shortly after the chemicals' initial application. Over the first year, residual amounts (<2.6%) of  $\text{Br}^-$ , CTL and FNC were leached down to 90–100 cm depth in the three treatments. However, over the second year low CTL and FNC amounts (<1.0%) reached the bottom layer only in S + SMS although high  $\text{Br}^-$  concentrations did so in the three treatments (<20%). According to the total balance of  $\text{Br}^-$ , CTL, and FNC in the soil profiles other processes (degradation, mineralisation, bound residues formation, and/or crop uptake) different from leaching below 1 m depth might play a key role in their dissipation especially in the amended soil profiles. SMS and GC are likely to be used as organic amendments to preserve the soil and water quality but in the case of SMS, its higher DOC content could imply a higher potential risk for groundwater contamination than GC.

## 1. Introduction

Different strategies are being applied in agriculture today to increase crop yields and obtain the corresponding benefits. The use of pesticides and the application of organic residues to the soil as organic amendments are two such strategies. The losses in the crop yield due to the non-application of pesticides can be as high as 40% (AEPLA, 2019). The impact of the use of organic amendments on the crop yield is based on the amount of nutrients and the addition of OM on the soil and on their ability to maintain the soil's properties and, therefore, its fertility (Ingelmo Sánchez and Rubio Delgado, 2008; Yazdanpanah et al., 2016).

Both agricultural practices are fully compatible, and often organic amendments and pesticides coexist in the soil. However, their combination can have significant environmental impacts, as the main processes governing the fate of pesticides (adsorption-desorption, degradation, mobility, etc.) may be modified in the presence of organic residues, with their solid OC and/or DOC content playing a key role (Yang et al., 2005; Marín-Benito et al., 2012a, 2016; López-Piñero et al., 2013).

Pesticide mobility changes in amended soils have especial interest because they can reach the groundwater leading to contamination not foreseen (Postigo et al., 2010). In addition, the evaluation of their

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [mjose.carpio@irnasa.csic.es](mailto:mjose.carpio@irnasa.csic.es) (M.J. Carpio), [msonia.rodriguez@irnasa.csic.es](mailto:msonia.rodriguez@irnasa.csic.es) (M.S. Rodríguez-Cruz), [carlos.garciadelgado@uam.es](mailto:carlos.garciadelgado@uam.es) (C. García-Delgado), [mjesus.sanchez@irnasa.csic.es](mailto:mjesus.sanchez@irnasa.csic.es) (M.J. Sánchez-Martín), [jesusm.marin@irnasa.csic.es](mailto:jesusm.marin@irnasa.csic.es) (J.M. Marín-Benito).

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110161>

Received 19 November 2019; Received in revised form 17 January 2020; Accepted 17 January 2020

Available online 24 January 2020

0301-4797/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

environmental risks under amended soils is not considered over the pesticide registration tests. Changes in pesticide mobility have been frequently assessed in presence of organic wastes of different origins (urban, livestock, agricultural, and agro-industrial activities). In most cases, these studies have been carried out under laboratory conditions (Kodešová et al., 2012; Marín-Benito et al., 2013; Álvarez-Martín et al., 2017), and less frequently so at field scale (Cabrera et al., 2009; Herrero-Hernández et al., 2015; Marín-Benito et al., 2018). Working at laboratory scale involves doing this under controlled conditions geared towards target variables. This allows reaching relevant conclusions about the influence of individual variables, such as the application of organic amendments to soils on a selected process (e.g., pesticide mobility). Nevertheless, and as opposed to field studies, their extrapolation is limited because they are not representative of real conditions, where the interaction of multiple variables informs a different behaviour to that observed one under laboratory studies (Ahmad et al., 2003; Herrero-Hernández et al., 2015).

Accordingly to this, the need for more robust conclusions on the impact that organic amendments have on pesticide mobility calls for field-scale trials that allow compiling wide dataset including real pesticide concentrations in the soil profile. These dataset would allow the calibration and validation of pesticide leaching models in amended soils. Then, they could be used as a tool for the prediction of the environmental fate of pesticides under amended soil conditions and for the optimization of pesticide application jointly with organic amendments aimed to avoid the water pollution. Modelling studies based on amended soil scenarios are rarely due to the lack of complete dataset as it is proposed in this paper (Boesten and van der Pas, 2000; Filipović et al., 2014).

A representative scenario was chosen in the Spanish region of Castilla and Leon to evaluate herbicide mobility under amending agricultural practices at field scale. This location is vulnerable to pesticide contamination, consisting of a soil with a predominantly sandy texture, low in OM content and with continuous cereal cropping. The assays involved two herbicides with different mobility behaviour: CTL and FNC. They are widely used to control broad-leaved weeds and grasses in the pre- and post-emergence of wheat crops. Wheat (*Triticum* spp.) was selected because it is one of the most widely grown crops worldwide (OECD-FAO, 2019).

CTL is a phenylurea that is fairly soluble in water and records a moderate persistence in the soil, low hydrophobicity, and a high potential for leaching (EC European Commission. Directorate General Health & Consumer Protection, 2005; PPDB, 2019), as evidenced by its frequent presence in surface, ground and drinking waters (Chilton et al., 2005; Fingler et al., 2017; Casado et al., 2019). CTL degradation leads mainly to the formation of desmethylchlorotoluron in soil, which persistence and mobility are similar to that of the parent compound (PPDB, 2019).

FNC is an oxycetamide moderately soluble in water, with high adsorption in the soil. This herbicide has a higher hydrophobicity and persistence in soil than CTL, but a lower leachability (PPDB, 2019). FNC has also been detected in surface waters (Casado et al., 2019), while it is unlikely to leach to groundwater (Gajbhiye and Gupta, 2001; Novohatska et al., 2018), hence this may depend on weather conditions, the time lapse between the application date and the first precipitation event, and soil properties (USEPA, 1998; Milan et al., 2015; Willkommen et al., 2019). However, FNC degrades in the soil mainly into two metabolites, flufenacet oxoacetic acid (FNC-OA) and flufenacet oxoethanesulfonic acid (FNC-ESA), with a higher or much higher potential, respectively, for leaching to groundwater than FNC (EC European Commission. Directorate General Health & Consumer Protection, 2003; PPDB, 2019).

The mobility behaviour of CTL in soil has been studied mainly in undisturbed and hand-packed soil columns under laboratory conditions, as well as in outdoor lysimeter experiments (Renaud et al., 2004; Walker et al., 2005; Navarro et al., 2012; Langeron et al., 2014). However, there are hardly any studies involving CTL transport under field conditions

(Kodešová et al., 2004; Chilton et al., 2005; Kočárek et al., 2010). In turn, and to the best of our knowledge, the effect of organic amendments on the mobility of this herbicide has been assessed in a somewhat unusual manner, involving only packed soil cores under controlled laboratory conditions (Kodešová et al., 2012). By contrast, only a handful of studies have been published on FNC mobility in soil (Rouchaud et al., 1999; Vasilakoglou et al., 2001; Milan et al., 2015; Willkommen et al., 2019), and none including amended soils.

Therefore, the aims of this paper are to assess: i) the mobility and the total balance of the herbicides CTL and FNC, and of the Br<sup>-</sup> tracer ion through an unamended and SMS and GC amended soil profile, and ii) the effect that two organic residues, SMS and GC, have on the environmental fate of these herbicides. Real concentrations of Br<sup>-</sup> and herbicides and volumetric soil water content were obtained at different times over two years throughout a field experiment to obtain a complete dataset. This dataset is necessary for the subsequent simulation of the environmental fate of the herbicides with FOCUS pesticide leaching models (those used for pesticide registration purposes at European level according to recommendations of the Forum for Co-ordination of pesticide fate models and their Use group) under amended soil scenarios.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and organic amendments

The field study used the commercial formulations Erturon® (chlorotoluron 50% w/v, Cheminova Agro S.A., Madrid, Spain), and Herold® (flufenacet 40% w/v, Bayer Crop Science S.L., Valencia, Spain). Analytical standards of both herbicides (>99.5% purity) were supplied by Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). The major metabolites of both herbicides, desmethylchlorotoluron, FNC-ESA sodium salt, and FNC-OA (>99.3% purity, Sigma) (PPDB, 2019) were also analysed throughout the experiment. These compounds' characteristics are presented in Supplementary Material Table S1 (PPDB, 2019). Conservative tracer transport using Br<sup>-</sup> as an ion tracer (KBr, 99.8% purity) was applied to describe the dispersive characteristics of the unamended and amended soil systems for the herbicide mobility study.

The SMS from *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* (2:1) cultivation and the GC from the pruning of plants and trees in parks and gardens were supplied following an aerobic composting process by Sustratos de la Rioja S.L. (Pradejon, Spain) and Viveros El Arca S.L. (Salamanca, Spain), respectively. The main characteristics of both organic residues were determined in air-dried and sieved (<2 mm) samples (Table S2) using the methods included in Supplementary Material.

### 2.2. Experimental set-up, sampling and processing of soil profiles

A two-year (2016–2018) field experiment was set up at the Muñovela experimental farm belonging to the Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca, Spain (40°54'15''N latitude and 5°46'26''W longitude). The soil was a Eutric-Chromic Cambisol (IUSS Working Group WRB, 2015) with sandy-loam (0–90 cm depth) and a sandy-clay (90–160 cm depth) texture (Table S3). The experimental layout consisted of randomised complete blocks including nine experimental plots of 9 m × 9 m, with three treatments and three plot replicates per treatment, corresponding to unamended soil (S), soil amended with spent mushroom substrate (S + SMS), and soil amended with green compost (S + GC). SMS and GC were applied to the soil at rates on a dry weight basis of 140 and 85 t ha<sup>-1</sup>, respectively. A rototiller was used to incorporate the organic amendments into the top 20 cm in November 2016. Before the chemicals (herbicides and Br<sup>-</sup> ion tracer) were applied, three soil profiles (one per treatment) were opened in three additional plots for the pedological characterization of soil profile in the field site. Soil samples were taken from each one of the five observed horizons of their respective soil profiles after 30 days of organic residue application.

Soil samples were air-dried, sieved (<2 mm), and their physicochemical characteristics determined as indicated in Supplementary Material (Table S3).

Polyvinyl chloride (PVC) pipes with hermetically sealed bases (120 cm length  $\times$  5.2 cm  $\varnothing$ ) were installed in each one of the experimental plots (one pipe per plot) for regular monitoring of the volumetric soil water content in sections of 20 cm from the surface down to 1 m using a portable Troxler Sentry 200-AP electrical probe (Troxler International Ltd., NC, USA). All the plots were annually cropped with winter wheat and managed according to best agricultural practices. After the harvest, the soil was maintained bare during the fallow period. The field experiment ended on Nov. 30, 2018.

CTL, FNC, and the Br<sup>-</sup> tracer were sprayed once per crop cycle at 15, 5, and 53 kg a.i. ha<sup>-1</sup>, respectively, under the commercial formulations previously indicated. The chemicals were applied jointly in pre-emergence using a sprayer attached to a tractor on Dec. 1, 2016 and on Nov. 13, 2017 (346 days after the first application). According to the experimental farm's records, none of the chemicals assayed had ever been applied to the experimental field, as an initial onsite background analysis did not detect any residues.

Rainfall and minimum and maximum air temperature were recorded throughout the experiment at an onsite weather station operated by the Spanish Agency of Meteorology.

The chemicals' mobility assessment involved sampling unamended, SMS- and GC-amended soil profiles at 1, 17, 33, 60, 80, 151, 229, and 339 days after their first application, and after 1, 29, 64, 127, 142, 181, and 225 days after their second application (corresponding to 347, 376, 411, 474, 489, 528, and 572 days). At each sampling time, five 100-cm soil cores (of 3-cm inner diameter) were randomly sampled in each plot and sectioned into 10 segments, each with a 10-cm thickness. Representative average soil samples of each plot were obtained by mixing the five subsamples corresponding to the same depth. Composite samples were put into plastic bags and transported in portable refrigerators to the laboratory, where they were homogenised and sieved (<2 mm) for their analysis. The amounts of CTL, FNC and Br<sup>-</sup> determined were expressed as percentages of the initial amount. The pH, OC and DOC values were determined at different times after the chemicals' applications to assess their influence on herbicide mobility.

The adsorption capacity of CTL and FNC for each unamended and SMS- and GC-amended soil horizon was determined as a single-point concentration (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) at the beginning of the experiment through the joint use of the active ingredients of both herbicides, and with 6 °C as the working temperature, replicating that registered in the field at the time of herbicide application. The distribution coefficients ( $K_d$ ) were calculated as indicated in Marín-Benito et al. (2019) (Table S4).

### 2.3. Chemical extraction and analysis

The extraction and analysis of herbicides and their major metabolites formed during the experiment was carried out as indicated in Marín-Benito et al. (2019). Triplicate subsamples of moist soil (6 g) from each 10-cm segment of unamended or amended soil cores taken at each sampling time were extracted with acetonitrile and the herbicides and their metabolites were determined by HPLC-DAD-MS using a Waters chromatograph (Waters Assoc., Milford, USA). Extraction efficiencies and quality indicators of detailed analytical method are included in Supplementary Material.

Br<sup>-</sup> concentrations were determined following the same method as described for the herbicides, albeit using deionised water as extractant and without the concentration step. They were quantified using a Metrohm Ion Chromatograph (Metrohm Ltd., Switzerland) with a conductivity detector.

### 2.4. Meteorological conditions over the field experiment

Rainfall and air temperature data were recorded throughout the two

experimental periods (Fig. 1). The first experimental period ran from Dec. 1, 2016 to Nov. 12, 2017 (346 days), and the second one from Nov. 13, 2017 to Nov. 30, 2018 (382 days). The average air temperature in both periods was similar, ranging from -3.8 °C to 27 °C and from -3 °C to 27.6 °C, respectively. However, differences in average air temperature and precipitation regime were recorded between both periods, and this played an important role in chemical mobility through the soil profile. The average air temperature was higher for the first period (13.1 °C) than for the second one (11.6 °C). Accumulated precipitation at the end of first period was 273.2 mm compared to 525.4 mm recorded over the entire second period, with their respective average intensity being 2.5 and 2.8 mm h<sup>-1</sup>. There were only seven major rainfall events (>10 mm) during the first period (Fig. 1a), which was characterized by intensive rainfall in winter and less so in spring and summer. Seventeen rainfall events higher than 10 mm were recorded during the second period. The winter and spring in this latter period were especially wet for the geographical area of study whose average annual rainfall is about 400 mm (Fig. 1b).

## 3. Results

### 3.1. Assessment of soil profile characteristics over time

Temporal variation of the parameters pH, OC and DOC was determined as they can be modified by adding organic residues and they can affect the behaviour of herbicides in soils (Thevenot et al., 2009; Marín-Benito et al., 2013, 2018) (Data Analysis is described in Supplementary Material). A significant increase ( $p < 0.01$ ) in the mean pH values of S topsoils (6.28–7.13) was observed after treatment with the organic residues (7.33–7.54 in S + SMS and 7.37–7.81 in S + GC) at different sampling times in the first experimental period (Fig. S1).

When adding the organic residues, the OC contents for the S topsoil (0.79–0.75%, mean  $0.77 \pm 0.02$ ) increased to 2.61–2.22% (mean  $2.44 \pm 0.16$ ) in the S + SMS and to 1.87–1.65% (mean  $1.78 \pm 0.09$ ) in the S + GC over the entire experimental period (range 10–572 days after the application of herbicides) (Fig. S1). ANOVA analysis indicated significant differences between OC mean values in all the samples (S + SMS > S + GC > S,  $p < 0.001$ ), depths ( $p < 0.001$ ) and times ( $p < 0.01$ ). The OC content in S was constant down to 40 cm, decreasing below this depth, and no significant changes were observed over time. In amended soils, the OC mean values decreased down to 50 cm, but they increased 3.17–1.22 times (S + SMS) and 2.31–1.07 times (S + GC) in relation to S at 10–50 cm. The increase in soil OC content by the SMS or GC effect was maintained at the different depths throughout the two-year experiment, therefore it indicates that the application of these residues to the soil could improve long-term soil properties.

The DOC contents ranged between 0.12 and 0.48 mg OC g<sup>-1</sup> soil (mean  $0.33 \pm 0.14$ ) for the S topsoil and they increased to 0.50–0.79 mg OC g<sup>-1</sup> soil (mean  $0.65 \pm 0.15$ ) (S + SMS) and to 0.38–0.72 mg OC g<sup>-1</sup> soil (mean  $0.54 \pm 0.16$ ) (S + GC) over different times (Fig. S1). Significant differences were found between the mean DOC values of amended and unamended soils (S + SMS = S + GC > S,  $p < 0.001$ ), depths ( $p < 0.001$ ), and times ( $p < 0.001$ ). In the amended soils, the mean DOC values decreased down to 50 cm although they increased 1.98–1.39 times in S + SMS, and 1.65–1.47 times in S + GC in relation to S, in the different soil layers from 10 to 50 cm. In general, these DOC contents increased throughout the whole experiment, being significantly different in S + SMS ( $p < 0.001$ ) and in S + GC ( $p < 0.001$ ) (Fig. S1).

### 3.2. Soil water content profiles over time

Soil water content was recorded every 20 cm down in the soil profiles (0–100 cm) at different times throughout the experiment (a total of 38 times). Fig. 2 restricts the information available on the moisture profiles to five selected times per experimental period. During the first experimental period, the soil water content at a depth of 0–20 cm followed the

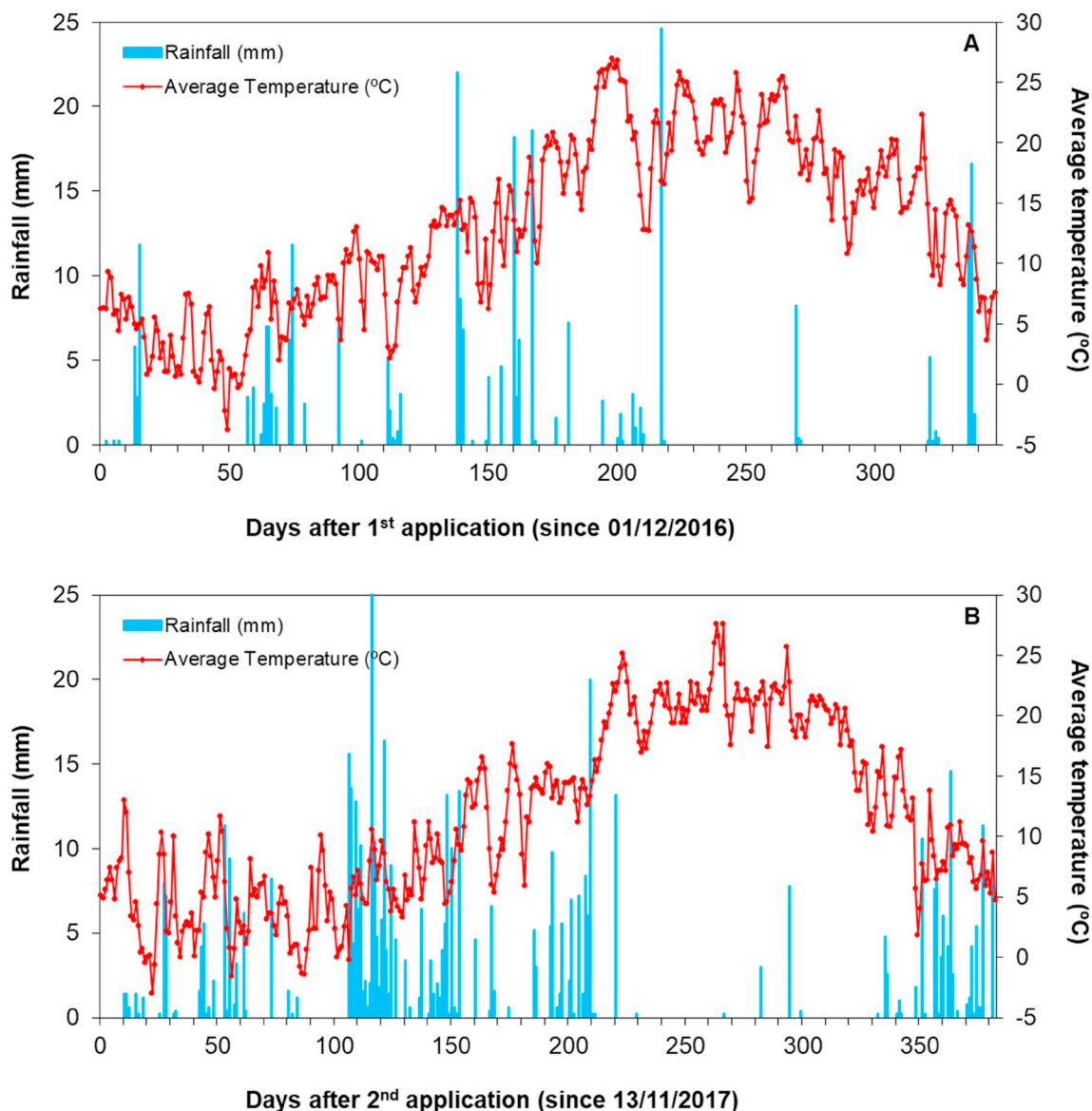


Fig. 1. Rainfall and average temperature monitored over first (a) and second (b) experimental period.

order S ( $0.100\text{--}0.184\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ ) < S + GC ( $0.155\text{--}0.244\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ ) < S + SMS ( $0.196\text{--}0.279\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ ) (Fig. 2) at different sampling times according to the soil OM content. The standard deviation of the mean values at each depth and replicate plots was <14%, indicating homogeneity and close agreement between plots with the same treatment (Fig. 2). A sharp increase in soil moisture down to a depth of 40 cm at different treatment times was recorded by the unamended soil profile (control) together a continuous decrease with depth which only increased seven months later. In the second experimental period, the soil water content followed a similar trend as in the first one. It increased in the top 20 cm in the order S ( $0.136\text{--}0.232\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ ) < S + GC ( $0.145\text{--}0.260\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ ) < S + SMS ( $0.149\text{--}0.251\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ ), and in the three treatments increased at different sampling times at 80–100 cm (Fig. 2).

### 3.3. Mobility of ion bromide in unamended and amended soil profiles

The distribution of  $\text{Br}^-$  in the S, S + SMS, and S + GC profiles (0–100 cm) at different sampling times after their application (Fig. 3) revealed that the tracer was not mobile below 0–10 cm at the initial sampling time for both experimental periods when ~100% of applied dose was

recovered in the topsoil. However, 3–10 days after its first application,  $\text{Br}^-$  mobility in S was observed down to 50 cm (2–4% of the amount applied). The tracer ion reached a depth of 100 cm 33 days after its application (<0.5%), and it was detected throughout the entire soil profile up to 229 days. After two months,  $\text{Br}^-$  concentrations in the topsoil decreased to 50% of the amount applied, and varied between 5 and 17% down to 60 cm and <1% in the deepest soil layers (60–100 cm) five months after application.  $\text{Br}^-$  was still recorded from 0 to 70 cm eleven months after its application showing peak concentrations of 13–11% at 10–30 cm (339 days), but no presence or concentrations below its detection limit were observed after 70 cm. A total balance of  $\text{Br}^- \approx 100\%$  was maintained in the S profile up to 80 days after application, indicating no mobility below 1 m.  $\text{Br}^-$  concentrations progressively decreased over time, and the total balance was <40% 339 days after application.

$\text{Br}^-$  mobility in both amended soils was detected mainly in the top 30 cm two months after the first application.  $\text{Br}^-$  concentrations (>12%) below 30 cm were detected only 80 days after its application, and residual concentrations (<1%) reached the bottom layer (90–100 cm) at 151 days in both treatments.  $\text{Br}^-$  was still found 339 days after its application from 0 to 90 cm (S + SMS) and from 0 to 60 cm (S + GC),



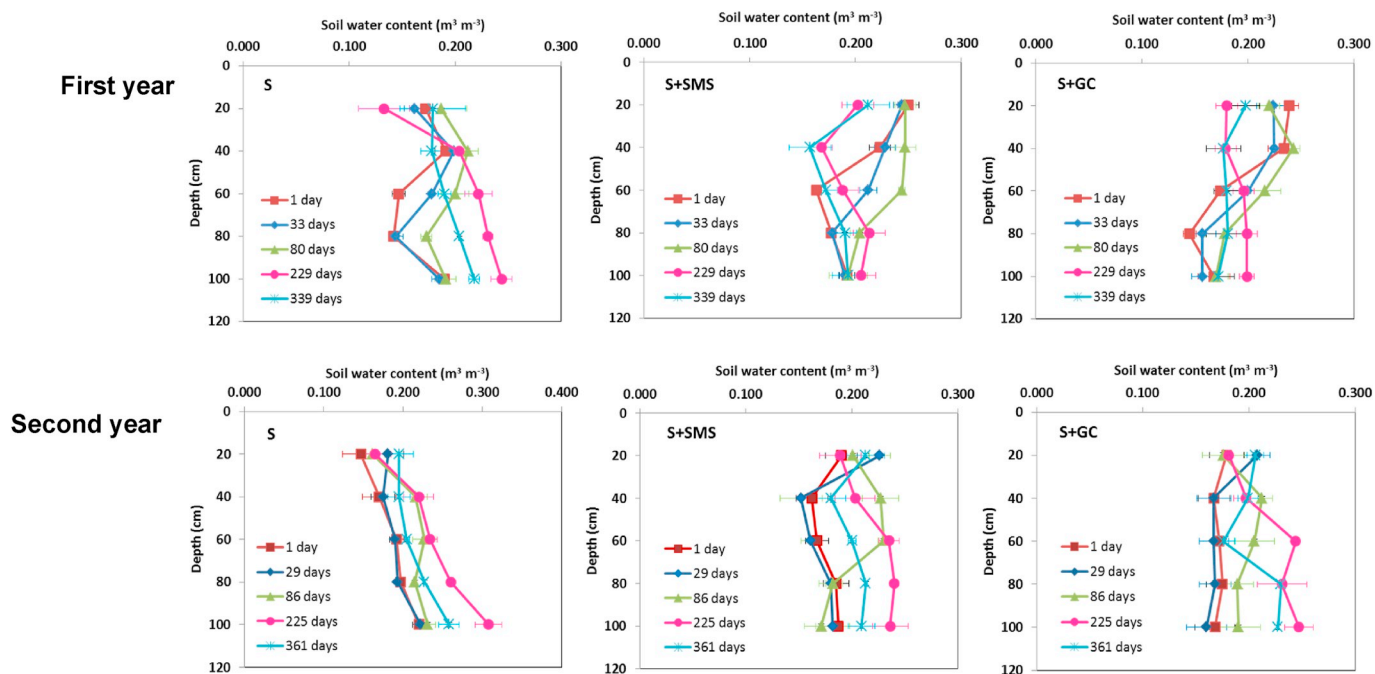


Fig. 2. Mean values of soil water content monitored for each 20-cm depth in unamended (S) and SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils at different sampling times after the herbicides' application (above graphics correspond to the first application and below graphics correspond to the second application). Error bars represent the standard deviation of mean values of plots treated (n = 3).

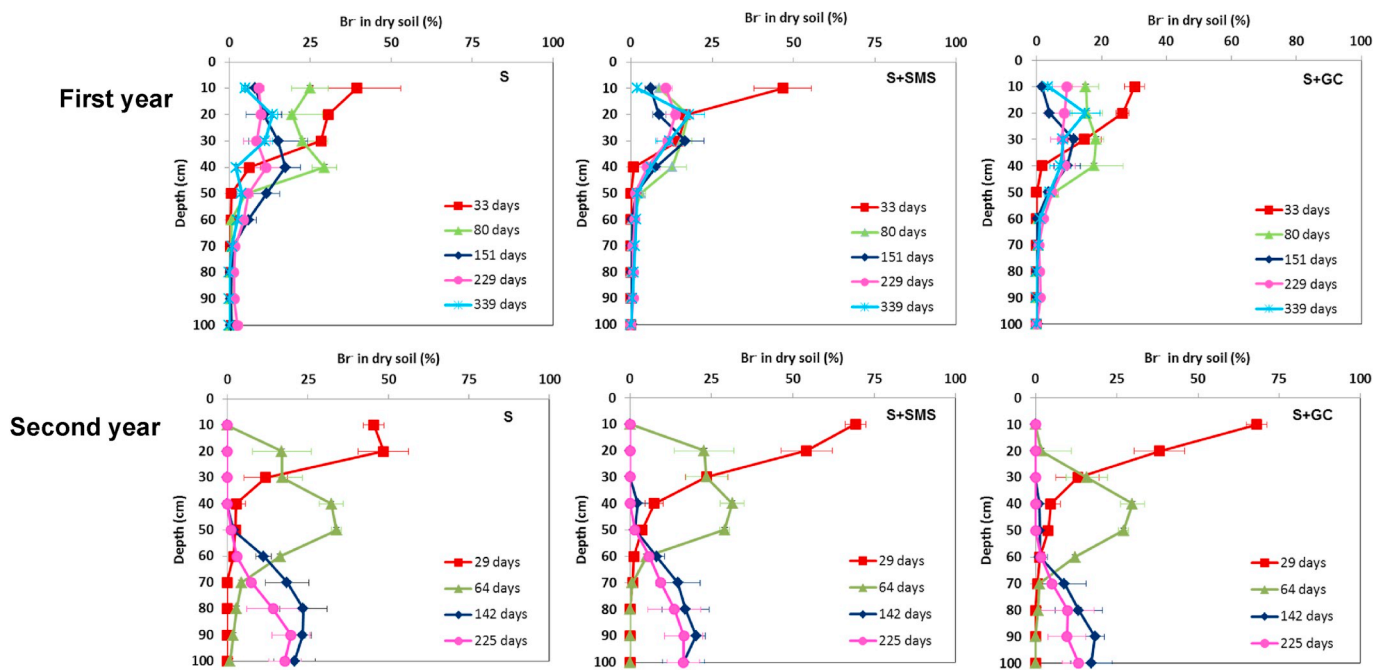


Fig. 3. Distribution profiles of bromide in unamended (S) and SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils at different sampling times after the bromide application (above graphics correspond to the first application and below graphics correspond to the second application). Error bars represent the standard deviation of mean values of plots treated (n = 3).

with a peak concentration of 8–18% at 10–30 cm. The total Br<sup>-</sup> balance in the amended soil profiles was <80% from one month after application, and it decreased to 40–44% at the end of the first experimental period (339 days), as it was also observed in the S treatment.

The dynamics of Br<sup>-</sup> through the soil profiles changed over the second experimental period. Following the application of the respective chemicals (Fig. 1) it recorded almost twice as much rainfall as the first, being 2.5 times higher than in the two first months. A more relevant

displacement of the Br<sup>-</sup> through the S profile was observed during these two months and a Br<sup>-</sup> peak of 66% was recorded at 30–50 cm, with decreasing concentrations in the range 16–1% at 60–100 cm. From the second to the fourth months the high accumulated rainfall (164.8 mm, Fig. 1b), with seven rainfall events between 10.2 and 26 mm, contributed largely to the movement of high concentrations of Br<sup>-</sup> (10–18%), which remained below 2% in the top 50 cm. Br<sup>-</sup> peaks in the 60–100 cm layers (11–24%) were recorded five months after the second application,

and at the last sampling time (225 days) this peak was recorded at 70–100 cm, with a concentration range of 14–18%. A total balance of  $\text{Br}^- \approx 100\%$  was maintained in all the soil profiles up to 64 days and then, when  $\text{Br}^-$  recorded a residual percentage of 40–64% in the soil profiles, it decreased progressively from 127 days (53–78%) to 225 days.

### 3.4. Mobility of chlorotoluron in unamended and amended soil profiles

The CTL concentrations in the soil profiles (0–100 cm) after the first and second applications were determined at different times in S, S + SMS and S + GC and expressed as percentages of the amount initially applied (Fig. 4). Initial CTL concentrations determined in the unamended and amended topsoil layer corresponded to  $\sim 100\%$  of the applied dose. In S, an increase in herbicide concentrations in the soil layers down to 40–50 cm (after 17 days) or down to 1 m (from 33 to 229 days after application) was observed. After two months, a decrease in CTL concentration in the topsoil (remaining amount  $< 56\%$  of that applied) was followed by a progressive decrease over time through the end of the first experimental period (339 days,  $< 15\%$ ). In general, peak concentrations were always detected in the top 20 cm (Fig. 4). The application of SMS and GC to soil increased significantly the mean remaining amounts of CTL in the topsoil over the sampling time (S + SMS = S + GC  $>$  S,  $p < 0.02$ ), while decreasing them in the soil profile (Fig. 4). At the end of the first experimental period (339 days), higher concentrations of CTL were detected in the top 10 cm of S than of S + SMS or S + GC (S  $>$  S + SMS = S + GC,  $p < 0.01$ ) and residual concentrations were observed down to 40 cm in S and S + SMS, and down to 20 cm in S + GC (Fig. 4). The total CTL balance remained  $\geq 100\%$  in the S profile up to 60 days after its application, and up to 80 days in S + SMS and S + GC. This percentage decreased to 20% (S), 8% (S + SMS), and 11% (S + GC) 339 days after their application.

Like  $\text{Br}^-$ , the CTL leaching dynamics observed in the second experimental period was different (Fig. 4). The residual amounts of CTL decreased quickly in the S topsoil to 55% of the initial amount only one month after its application, and it decreased to  $\approx 2\%$  six months later. The application of the organic residues to soil decreased the CTL residual amounts in the S + SMS profile over the whole second period. In S + GC, they decreased two months after herbicide application, with its behaviour then being similar to the one observed in the S + SMS. Significant differences among the mean residual amounts in soil profiles were observed at 20–40 cm (S  $>$  S + SMS = S + GC,  $p < 0.01$ ), and no CTL residues were observed in the amended soils below this depth. The total CTL balance in the soil profile remained  $\geq 100\%$  in the S + GC treatment 29 days after its application, varying between 65% and 71% in S and S + SMS. These percentages decreased to 3.98% (S), 0.91% (S + SMS), and 0.58% (S + GC) at the last sampling time (225 days), when residual concentrations of CTL were detected at 30, 20 and 10 cm in S (0.35%), S + SMS (0.24%), and S + GC (0.58%), respectively.

### 3.5. Mobility of flufenacet in unamended and amended soil profiles

Initial FNC concentrations determined in the top 10 cm of the three soil treatments corresponded to 100% of the applied dose. The FNC concentrations determined at different times (Fig. 5), indicated the herbicide mobility in S with increasing concentrations detected down to 30 cm (from 17 to 33 days after application) or down to 60 cm (after 60 days), although no herbicide was recorded down to 1 m in this period as indicated for CTL. The maximum depth reached by FNC was observed after 80 days with residual concentrations ( $< 1\%$ ) detected in the deepest S layers (70–100 cm). At this time, a decrease in FNC concentration was observed in the topsoil (remaining amount  $< 50\%$  of that applied) followed by a progressive decrease over time through to the end of the first experimental period (7%). The peak concentrations were always observed in the top 10 cm (Fig. 5). The residual amounts of FNC increased in the topsoil after SMS and GC application over the sampling time (S + SMS = S + GC  $>$  S,  $p < 0.009$ ), as previously observed for CTL

(Figs. 4 and 5). FNC concentrations at this depth ranged from 80% to 94% in the amended soils for the 17 to 80-day period. However, herbicide concentrations were higher in S than in the amended soils below 10 cm although differences were not significant ( $p < 0.10$ ). FNC was detected in the whole S + SMS profile 33 days after its application, while the maximum depth reached by FNC in S + GC was observed at 151 days, when residual concentrations ( $< 1\%$ ) were detected in the soil layers from 30 to 100 cm.

FNC persistence was higher in the topsoils than that of CTL in the first experimental period, with dissipation of the herbicide  $\approx 50\%$  in S after 80 days and after 151 days in S + SMS and S + GC. However, FNC dissipation increased over time and similar residual amounts of herbicide were found in the top 10 cm in all three treatments (S 7.03%, S + SMS 7.92%, S + GC 2.65%) after the first experimental period. At the end of this period (339 days), FNC was detected at 10–20 cm in S and S + GC, and down to 30 cm in S + SMS. The total FNC balance in the soil profiles recorded the same behaviour as CTL, remaining  $\geq 100\%$  in the S treatment up to 60 days after its application, and up to 80 days in both amended soils. After 339 days of application, this percentage decreased to 12% (S), 10% (S + SMS), and 5% (S + GC), following the same order as CTL.

As observed for CTL, the residual amounts of FNC determined in the S topsoil indicated a decrease in herbicide retention during the second experimental period, considering similar sampling times to those in the first period, and its mobility was detected only down to 50–60 cm (Fig. 5). The application of SMS and GC generally increased the residual amounts of FNC in the surface horizons of S + SMS and S + GC (S  $<$  S + GC = S + SMS,  $p < 0.004$ ). Nonetheless, the residual amounts of FNC were increased in the next soil layer (10–20 cm) and in all the soil treatments compared to the first period.

Contrary to CTL, FNC dissipation increased progressively in all the soils over time, and no significant decrease in their total balance was observed in any of the soils two months after herbicide application and with a high accumulated rainfall (68.4 mm). Like CTL and unlike  $\text{Br}^-$ , after this rainy period, no relevant displacements of the maximum peak of FNC to deep soil horizons were observed in any soil treatment (Fig. 5). This means FNC behaviour in the soils was similar to that one observed over the first period. However, FNC never reached the deepest soil layer (90–100 cm) in S or S + GC. The maximum depth this herbicide reached during the second experimental period was 60 cm in S and 80 cm in S + GC 181 days after its application, whereas the compound reached 90–100 cm in S + SMS 127 days after its application. The total FNC balance in the soil profiles varied between 67% and 100% in S and S + SMS up to 142 days after its application, and after 181 days in S + GC. These percentages decreased to 26% (S), 36% (S + SMS), and 32% (S + GC) after 225 days (the last sampling time during the second experimental period), and they were higher than those for CTL (Figs. 4 and 5). Marín-Benito et al. (2019) reported similar results for FNC applied in the same soils under laboratory conditions at the end of an incubation period of 273 days.

## 4. Discussion

### 4.1. Changes in soil water content profiles over time

A logical downward water movement over time was described for explaining the percolation behaviour, in line with the precipitations recorded. The application of SMS and GC to the soil into the top 20 cm increased this layer's water-holding capacity, and influenced the water (and chemicals) dynamics in all the amended soil profiles. The organic amendments regulated the percolation rate to deeper layers and a more regular and continuous movement of water was promoted from the topsoil toward deeper layers over time (Ingelmo Sánchez and Rubio Delgado, 2008). The movement was not as abrupt and slower than observed in the unamended soil. This meant that the sections from 20 to 40 cm or even to 60 cm in the amended soils tended to record higher soil

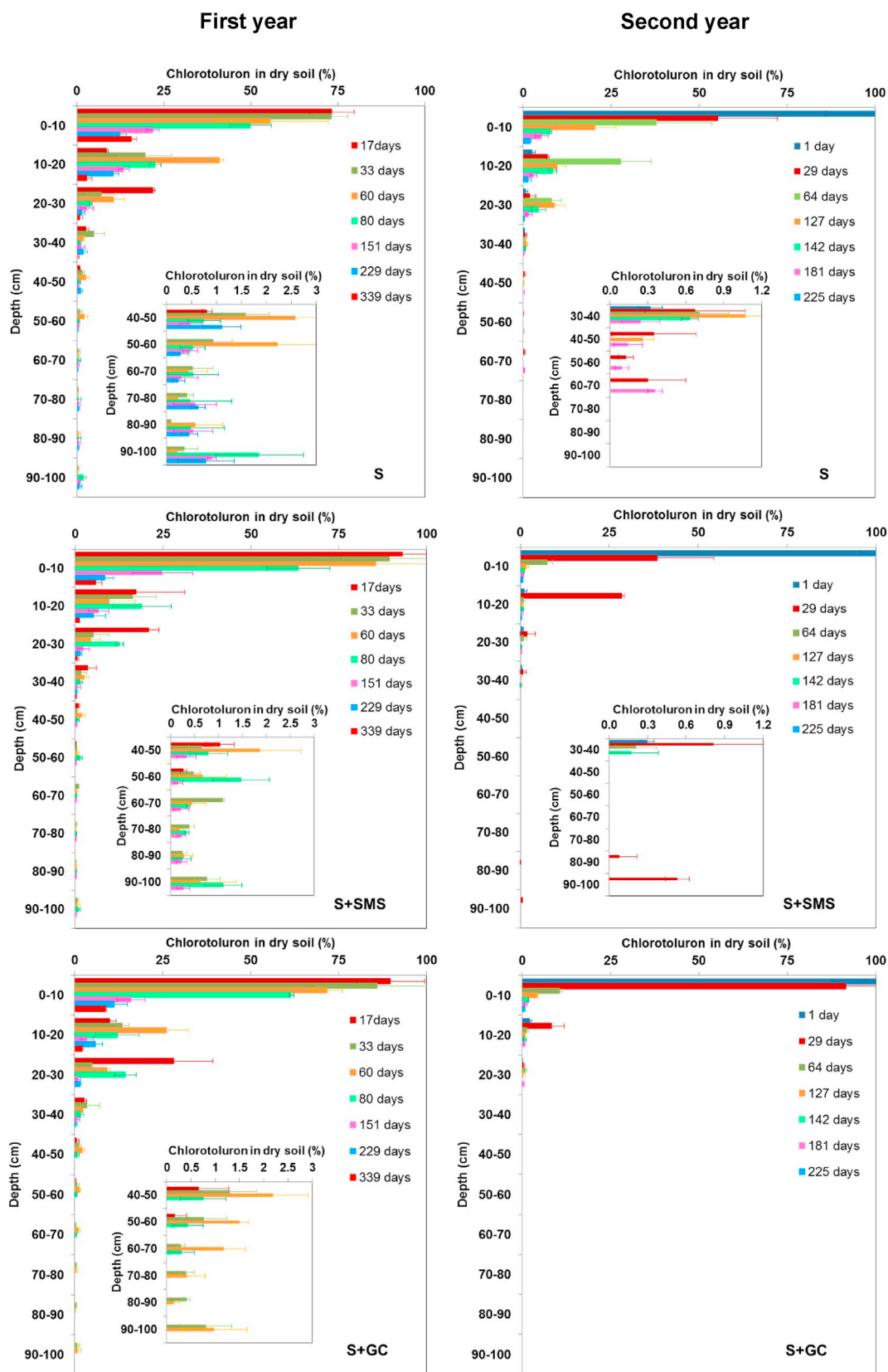


Fig. 4. Distribution profiles of chlorotoluron in unamended (S) and SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils at different sampling times after the herbicide application (left graphics correspond to the first application and right graphics correspond to the second application). Error bars represent the standard deviation of mean values of plots treated (n = 3).

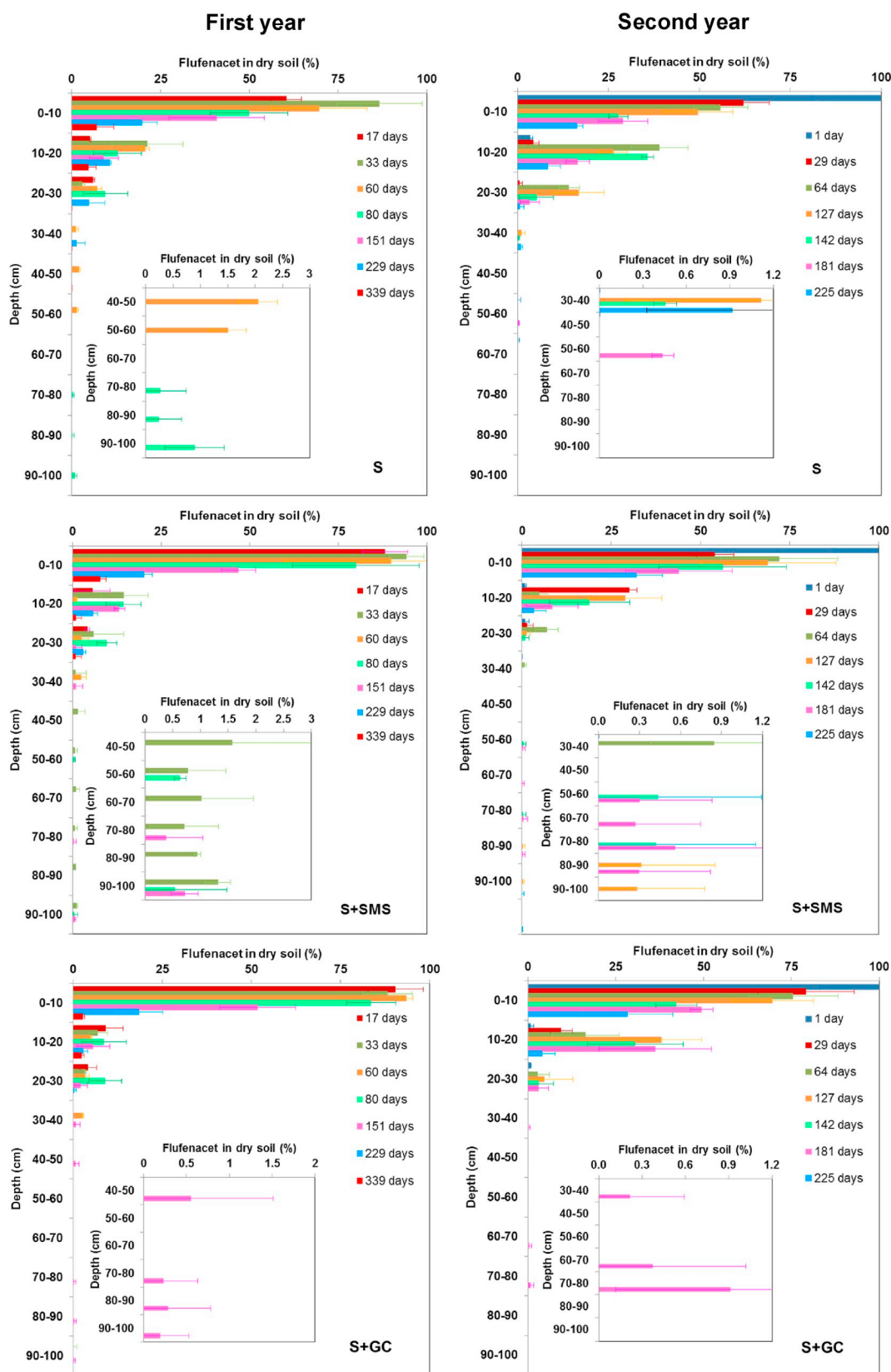


Fig. 5. Distribution profiles of flufenacet in unamended (S) and SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils at different sampling times after the herbicide application (left graphics correspond to the first application and right graphics correspond to the second application). Error bars represent the standard deviation of mean values of plots treated (n = 3).

water content than the ones corresponding to the unamended soil, and did so for longer time period. This also explains why the soil water content observed at a depth of 0–20 cm, following the order  $S < S + GC < S + SMS$ , increased (S) or decreased (S + SMS and S + GC) at a depth of 80–100 cm at different sampling times. Changes in soil porosity, aggregation state, pore size and connectivity, water-holding capacity, and hydraulic conductivity induced by the presence of organic amendments rich in OM have been reported (Ingelmo Sánchez and Rubio Delgado, 2008; Yazdanpanah et al., 2016; Marín-Benito et al., 2018) revealing their ability to modify water dynamics.

Compared to the first experimental period, higher soil water contents were recorded at 80–100 cm as a result of a rainy period that drove percolation down to deeper soil layers in the second year of experimentation. This effect was observed especially in the unamended soil, showing again how SMS and GC can regulate the percolation. However, the organic amendments' impact on the soil water content profiles was minimised compared to that of the high rainfall recorded between 64 and 127 days after the second application (Fig. 1b). This high rainfall (164.8 mm) homogenised the percolation behaviour in both unamended and amended soil profiles.

#### 4.2. Mobility of ion bromide in soil profiles: influence of soil water content

The mobility of  $Br^-$  down to the deepest soil horizons was fast and probably enhanced by the soil's high moisture in the top 40 cm at the application date (53.6 mm of rainfall were recorded in the previous 27 days, including 34.2 mm in the last 11 days, being compounded by an already rainy autumn) and by the rainfall accumulated in the 15 days after the application (21 mm) (Fig. 1a). Some authors have reported rainfall's major influence on overall leachate losses in the period shortly after the application of chemicals (Walker et al., 2005; Willkommen et al., 2019). The  $Br^-$  behaviour in both amended soils indicated lower mobility than that in S and it is consistent with the slower water percolation observed in these soils through the soil profile, as previously indicated.

A hypothetical loss of  $Br^-$  by leaching below 1 m linked to the accumulated rainfall of 203.4 mm from 80 to 339 days could be responsible for the low  $Br^-$  balances after 80 days. However, its low concentration (<2%) below 60 cm 151 days after its application and the peak concentrations always upper than 40 cm do not seem to support this hypothesis. Other  $Br^-$  sinks could play an important role in the loss of the total balance in the soil including its uptake by wheat plants. This hypothesis is supported by Shtangeeva et al. (2017) investigations on uptake and accumulation of large amounts of  $Br^-$  in roots and leaves of wheat plants through a phytoextraction study that includes soils contaminated with KBr.

The dynamics of  $Br^-$  changed over the second experimental period because it was wetter. An important loss of  $Br^-$  by leaching below 1 m was suggested, in contrast to one observed during the first period although S now recorded a similar behaviour to both amended soils. As previously indicated, the important rainfall events recorded between 64 and 127 days after the second application are likely to be homogenised water percolation and  $Br^-$  behaviour in the three soil treatments, minimising the effects of the organic amendments. Nevertheless, the lowest total balances of  $Br^-$  were again recorded generally in the amended soil profiles, albeit with smaller differences than those previously observed.

#### 4.3. Mobility of chlorotoluron in soil profiles as affected by different processes

A fast mobility of the herbicide to deeper soil horizons was observed in the S profile in a similar way to the one indicated previously for  $Br^-$ . CTL is a polar compound slightly soluble in water, and it may be easily transported through the sandy-loam soil profile after its application in wet soil and the rainfall events 15 days later (Walker et al., 2005) (Fig. 1a). In general, a greater washing of CTL in S than in the amended

soils occurred in the whole soil profile, however no significant differences were observed at any depth. These results are consistent with the adsorption coefficients ( $K_d$ , mL  $g^{-1}$ ) of CTL by soils from 0 to 10 cm (0.773 (S), 4.773 (S + SMS), and 2.563 (S + GC), Table S4), and the relation between herbicide adsorption and initial OC in the soils (increasing in the order  $S < S + GC < S + SMS$ , Fig S1) which has also been reported to other phenylurea compounds (Cabrera et al., 2007; Hiller et al., 2008; Kodešová et al., 2012; Rodríguez-Cruz et al., 2012). The dissipation of CTL in the surface soil increased in all the treatments over time and the herbicide was simultaneously detected in the entire soil profiles 33 days after its application.

In amended soils, CTL mobility was reduced relative to the unamended soil by the water-holding capacity of the 20 cm topsoil layers increased with the SMS and GC application (S 0.230  $m^3 m^{-3}$ , S + SMS 0.290  $m^3 m^{-3}$ , S + GC 0.260  $m^3 m^{-3}$ ), which would decrease water percolation in relation to S (Fig. 2) (Marín-Benito et al., 2018). On the other hand, CTL mobility through the unamended and amended soil profiles depends on the properties of each soil layer, mainly OC and DOC contents. These are the main soil parameters influencing herbicide behaviour in soil (Thevenot et al., 2009; Marín-Benito et al., 2013, 2018), and they were modified by the addition of organic residues as previously indicated in section 3.2. In fact, a significant correlation coefficient was found between residual concentrations of CTL and OC content in the amended soil profile after 10, 80, and 229 days, for S + SMS ( $r = 0.902-0.975$ ,  $p < 0.05$ ), and S + GC ( $r = 0.880-0.954$ ,  $p < 0.01$ ) and it was not significant for S ( $r = 0.559-0.759$ ,  $p < 0.1$ ). OC content was lower in the S profile than in the S + SMS and S + GC profiles down to 50 cm (Fig. S1), and it could explain the mobility and presence of herbicide residues at all depths up to 229 days after their application, while they were only detected in S + GC and S + SMS up to 60 and 151 days, respectively.

CTL leaching dynamics was closer to that detected for  $Br^-$  in S than in the amended soils. The lowest total CTL balance in the amended soil profiles could be explained by a greater leaching of compound below a depth of 1 m or a higher degradation in these soil profiles. In our study, DOC content was higher in amended soils than in unamended soil down to 50 cm and increased over time (Fig. S1). DOC content could affect the behaviour of CTL controlling the sorption/desorption of the herbicide as reported by Song et al. (2008) and enhancing its mobility. Yang et al. (2005) have also observed greater CTL adsorption in soils without DOC. The leaching of another phenylurea herbicide, diuron, was also promoted in amended soils, most likely due to the formation of diuron-DOC mobile complexes (Thevenot et al., 2009).

The influence of OC and DOC of S + SMS or S + GC on the CTL residual amounts was explored through soil profiles by a multiple correlation analysis considering jointly data down to 50 cm after 10, 80 and 229 days. The equations obtained:  $CTL\% = 3.13 - 985 DOC(\%) + 42.7 OC(\%)$  ( $p = 0.001$ ) in S + SMS, and  $CTL\% = -6.99 - 1258 DOC(\%) + 62.8 OC(\%)$  ( $p = 0.002$ ) in S + GC explained 66% and 59% of the CTL residual amounts in the respective amended soil. These equations indicate that DOC had a higher negative effect (mobility increasing) than the positive effect (adsorption increasing) of OC on CTL residual amounts. No significant results were found for S. The results indicated that in the amended soils CTL could remain adsorbed by the soil OC or remain in solution adsorbed by DOC, enhancing the mobility and/or the degradation of the herbicide by microorganisms (Marín-Benito et al., 2012b). The CTL degradation process was consistent with the detection of a CTL metabolite (desmethylchlorotoluron) (Table S1) in the top 10 cm of the soils over the entire first experimental period (339 days) (S + SMS (2.8%) < S + GC (10.6%) < S (23.5%) (Fig. S2) and it was not found below 30 cm in any soil treatment (data not shown). The formation of this metabolite was previously revealed under laboratory conditions at 6 °C (Marín-Benito et al., 2019).

Other additional dissipation pathways, such as CTL mineralisation and/or the formation of bound residues by the parent herbicide, could also have occurred simultaneously to CTL leaching (EC, 2005) and

support the low total balance of herbicide obtained. Both dissipation pathways would have been facilitated in the S + SMS and S + GC soils by the presence of a higher content of both DOC (more herbicide in solution) and OC (higher adsorption of herbicide in the topsoil), respectively, compared to S, as observed for other pesticides (Marín-Benito et al., 2012b). Finally, it is important to stress that the uptake by wheat roots has been reported as a sink for CTL and other phenylureas (Song et al., 2008; Pascal-Lorber et al., 2010). The scope of this uptake process could be also controlled by DOC content (Song et al., 2008) and affect the total CTL balance although it was not evidenced in this paper.

After the second experimental period with higher rainfall, the presence of CTL was higher in the S profile than in S + SMS and S + GC, again indicating a greater leaching of CTL in S than in the amended soils. Unlike the first period, no significant correlation between the residual amounts of CTL, and OC and DOC contents in S + GC profile was found for the second period, and it was of little significance in the S + SMS profile ( $R^2 = 22.8\%$ ,  $p = 0.084$ ). The variable soil water content did not improve the multiple correlations obtained with OC and DOC for explaining the residual amounts of CTL. These results indicate that CTL dissipation after the second application and under a higher rainfall regime was faster than after the first one, as previously indicated for this and other herbicides under field conditions (Rouchaud et al., 2000; Marín-Benito et al., 2018). The CTL dissipation was more explained by degradation rather than by mobility process, especially in the amended soils. The higher DOC content recorded in all the soil profiles in the second period could enhance the amount of CTL in solution, and its availability for the biodegradation. The presence of desmethylchlorotoluron was also detected in the three soil treatments assayed, again being detected mainly in the top 10 cm. The total amounts of metabolite formed at this depth over the entire second period (225 days) followed the same order as the first period: S + SMS (4.9%) < S + GC (7.1%) < S (9.0%) (Fig. S2).

#### 4.4. Mobility of flufenacet in soil profiles as affected by different processes

FNC mobility in soil profiles was low as also reported by Rouchaud et al. (1999) in a sandy loam with 2.2% of MO, although the results in our experiment indicated that this compound could reach the groundwater in highly permeable soils (USEPA, 1998). The application of SMS and GC to the soil enhanced the residual amounts of FNC as previously observed for CTL (Figs. 4 and 5) but FNC persistence was higher in the topsoils than that of CTL in the first experimental period. FNC is more hydrophobic than CTL, and this could explain this compound's higher persistence in soils (PPDB, 2019). The data are in accordance with the adsorption coefficients ( $K_d$ , mL g<sup>-1</sup>) of FNC by soils from the 0–10 cm layer determined in the laboratory (1.038 (S), 6.340 (S + SMS), and 2.909 (S + GC), Table S4). Herbicide adsorption by topsoils was consistent with their initial OC, which increased in the order S < S + GC < S + SMS (Fig. S1) (Gajbhiye and Gupta, 2001). FNC mobility was reduced in amended soils as that of CTL by its adsorption by soil OC. A positive relationship between residual concentrations of FNC at 10, 80 and 229 days after treatment and OC content in the soil profile was found in the amended soils. Nevertheless, increasing the ageing time in the soil could increase FNC mobility, with this process being favoured by the high accumulated rainfall (39 mm) from 80 to 151 days after its application or by the soil DOC content. A significant multiple correlation was found between residual concentrations of FNC, and the OC and DOC contents when jointly considering data down to 50 cm after 10, 80 and 229 days in S + SMS (FNC% =  $-6.13 - 844 \text{ DOC}(\%) + 44.6 \text{ OC}(\%)$ ) ( $R^2 = 72.6$ ,  $p = 0.0002$ ) and in S + GC (FNC% =  $-17.5 - 1111 \text{ DOC}(\%) + 67.3 \text{ OC}(\%)$ ) ( $R^2 = 59.3$ ,  $p = 0.002$ ). These correlations corroborate again the negative or positive influence of DOC and OC, respectively, on herbicide residual amounts as observed for CTL. No significant results were found for S. The variable soil water content did not improve the multiple correlations obtained with OC and DOC for explaining the residual amounts of FNC.

The lowest total FNC balance observed in the amended soil profiles at the end of the first experimental period could be attributed either to a greater leaching of compound below 1 m or to a higher degradation of the compound in these soil profiles, both enhanced by their higher DOC, as previously explained. However, the presence of the two main metabolites of FNC (FNC-ESA and FNC-OA) was not relevant in any of the three soil profiles over the entire first experimental period. These metabolites were detected in a dissipation study under laboratory conditions with topsoil samples taken *in situ* from the experimental plots (Marín-Benito et al., 2019). Only the FNC-OA metabolite was detected, and its presence was observed mainly in the topsoil of the three treatments at different sampling times, but always at concentration levels below the limit of quantification (LOQ). As reported previously for CTL, other dissipation pathways could also have occurred and to a greater extent in the amended soils. Mineralisation and the formation of non-extractable bound residues were reported for FNC after 100 days varying between 10.2% and 31.9% and between 6.0% and 56.2%, respectively (EC European Commission. Directorate General Health & Consumer Protection, 2003). Like CTL, FNC uptake by the wheat plants could be an additional sink for this herbicide, although no related studies have been found.

During the second experimental period, the residual amounts of FNC in the S topsoil decreased as observed for CTL but the residual amounts of FNC increased in the next soil layer (10–20 cm) and in all the soil treatments compared to the first period. DOC and the higher amount of rainfall accumulated during the second experimental period explained this greater residual amount of FNC detected in all the 10–20 cm sections. FNC leaching pattern in the soils was similar to that one observed over the first period. However, it was detected that the losses of FNC below 1 m were null in S and S + GC due to leaching process, and were non relevant in S + SMS due to the low amounts of herbicide detected at this depth over the experimental period (Fig. 5). DOC could favour herbicide mobility in the amended soils after the second application, as previously indicated for the first period, or its degradation. In fact the FNC-OA metabolite was again detected mainly in the topsoil for the three treatments at different sampling times, but always at lower concentrations than the LOQ.

#### 4.5. Remarks on the environmental role of organic amendments in herbicides mobility

The effect of SMS and GC on the mobility of the herbicides CTL and FNC and the Br<sup>-</sup> tracer in a sandy soil was assessed over a 2-year field experiment. SMS and GC increased the water-holding capacity of the 20-cm topsoil affecting percolation and leaching of chemicals. However, in unamended and amended soils the rapid mobility of chemicals was initially more affected by the rainfall events recorded shortly after their first application than by the high rainfall recorded. SMS and GC increased the soil OC and DOC with opposite effect on the herbicides' dynamics. While the soil OC enhanced the herbicides' adsorption and/or persistence in the upper soil layers decreasing their downward mobility (especially for the most hydrophobic herbicide FNC), the soil DOC enhanced the herbicides' transport to deeper soil horizons and their bioavailability to be degraded (especially for CTL). Residual Br<sup>-</sup> and herbicides amounts leached down to 1 m in all the treatments over the first period while during the second period large amounts of Br<sup>-</sup> leached down to 1 m in the three treatments and only residual amounts of herbicides (<1% of the amount applied) reached the deepest soil layer in S + SMS. A total balance of both herbicides in the soil profile at the end of both experimental periods was not in accordance with the amounts leached below 1 m depth in all treatments. It indicates that other processes different from mobility (degradation, mineralisation, formation of non-extractable bound residues, and/or crop uptake) could be involved in the dissipation of the herbicides, especially in the amended soils. The degradation was one of the possible dissipation pathways and it was confirmed by the detection of herbicide metabolites, mainly of

CTL.

## 5. Conclusions

The results obtained show that the application of SMS and GC to soil could reduce groundwater contamination by these herbicides by enhancing the adsorption. However, DOC from amendments have to be considered to optimize the amendment doses applied because of its higher DOC content could imply a higher potential risk for groundwater contamination as observed here for SMS relative to GC. Additional studies (now in progress) supported on the dataset obtained in this paper will be carried out for simulations with FOCUS pesticide leaching models. These models integrate the main processes involved in the dynamics of pesticides in the soil and allow predicting possible water contamination and consequently to adopt and assess preventive strategies to avoid it when an amendment is applied.

## CRedit authorship contribution statement

**María J. Carpio:** Investigation, Visualization. **M. Sonia Rodríguez-Cruz:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Carlos García-Delgado:** Investigation. **María J. Sánchez-Martín:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing - review & editing. **Jesús M. Marín-Benito:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft, Supervision, Project administration, Writing - review & editing.

## Acknowledgements

This work has been funded by MINECO/FEDER UE (Project AGL 2015-69485-R) and MCIU/AEI/FEDER,UE (Project RTI 2018-101587-J-I00). M. J. Carpio thanks for her predoctoral contract co-funded by European Social Fund (ESF) and the Condecería de Educación (Junta de Castilla y León Government). C. García-Delgado and J.M. Marín-Benito thank MINECO for their respective Juan de la Cierva-Formación (JCFI-2015-23543) and Juan de la Cierva-Incorporación (LJCI-2014-19538) contracts. The authors thank J.M. Ordax for his technical assistance.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110161>.

## References

- AEPLA, 2019. Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas. Available online: [www.aepla.es](http://www.aepla.es). (Accessed 1 June 2019).
- Ahmad, R., James, T.K., Rahman, A., Holland, P.T., 2003. Dissipation of the herbicide clopyralid in an allophanic soil: laboratory and field studies. *J. Environ. Sci. Health B* 38, 683–695.
- Álvarez-Martín, A., Sánchez-Martín, M.J., Ordax, J.M., Marín-Benito, J.M., Rodríguez-Cruz, M.S., 2017. Leaching of two fungicides in spent mushroom substrate amended soil: influence of amendment rate, fungicide ageing and flow condition. *Sci. Total Environ.* 584–585, 828–837.
- Boesten, J.J.T.I., 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. *Agric. Water Manag.* 44, 21–42.
- Cabrera, A., Cox, L., Fernández-Hernández, A., García-Ortiz Civantos, C., Cornejo, J., 2009. Field appraisal of olive mills solid waste application in olive crops: effect on herbicide retention. *Agric. Ecosyst. Environ.* 132, 260–266.
- Cabrera, A., Cox, L., Velarde, P., Koskinen, W.C., Cornejo, J., 2007. Fate of diuron and terbuthylazine in soils amended with two-phase olive oil mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4828–4834.
- Casado, J., Brigden, K., Santillo, D., Johnston, P., 2019. Screening of pesticides and veterinary drugs in small streams in the European Union by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* 670, 1204–1225.
- Chilton, P.J., Stuart, M.E., Goody, D.C., Williams, R.J., Johnson, A.C., 2005. Pesticide fate and behavior in the UK Chalk aquifer, and implications for groundwater quality. *Q. J. Eng. Geol. Hydrogeol.* 38, 65–81.
- EC (European Commission. Directorate-General Health & Consumer Protection), 2003. Review Report for the Active Substance Flufenacet, p. 30.
- EC (European Commission. Directorate-General Health & Consumer Protection), 2005. Review Report for the Active Substance Chlorotoluron, p. 54.
- Filipović, V., Coquet, Y., Pot, V., Houot, S., Benoit, P., 2014. Modeling the effect of soil structure on water flow and isoproturon dynamics in an agricultural field receiving repeated urban waste compost application. *Sci. Total Environ.* 499, 546–559.
- Fingler, S., Mendaš, G., Dvorsčak, M., Stipičević, S., Vasilčić, Ž., Drenvenkar, V., 2017. Herbicide micropollutants in surface, ground and drinking waters within and near the area of Zagreb, Croatia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 11017–11030.
- Gajbhiye, V.T., Gupta, S., 2001. Adsorption-desorption behavior of flufenacet in five different soils of India. *Pest Manag. Sci.* 57, 633–639.
- Herrero-Hernández, E., Marín-Benito, J.M., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2015. Field versus laboratory experiments to evaluate the fate of azoxystrobin in an amended vineyard soil. *J. Environ. Manag.* 163, 78–86.
- Hiller, E., Kracszenits, Z., Cernansky, S., 2008. Sorption of acetochlor, atrazine, 2,4-D, chlorotoluron, MCPA, and trifluralin in six soils from Slovakia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 412–416.
- Ingelmo Sánchez, F., Rubio Delgado, J., 2008. Efecto de la aplicación del compost sobre las propiedades físicas y químicas del suelo. In: Moreno-Casco, J., Moral-Herrero, R. (Eds.), *Compostaje*. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, pp. 305–328.
- IUSS Working Group WRB, 2015. World Reference Base for Soil Resources 2014, Update 2015. *World Soil Resources Reports No. 106*. FAO, Rome. ISSN 0532-0488.
- Kočárek, M., Kodešová, R., Kozák, J., Drábek, O., 2010. Field study of chlorotoluron transport and its prediction by the BPS mathematical model. *Soil Water Res.* 5, 153–160.
- Kodešová, R., Kočárek, M., Hajková, T., Hýbler, M., Drábek, O., Kodeš, V., 2012. Chlorotoluron mobility in compost amended soil. *Soil Res.* 118, 88–96.
- Kodešová, R., Kozák, J., Vacek, O., 2004. Field and numerical study of chlorotoluron transport in the soil profile. *Plant Soil Environ.* 50, 333–338.
- Langeron, J., Sayen, S., Couderchet, M., Guillon, E., 2014. Leaching potential of phenylurea herbicides in a calcareous soil: comparison of column elution and batch studies. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 4906–4913.
- López-Piñeiro, A., Peña, D., Albarrán, A., Becerra, D., Sánchez-Llerena, J., 2013. Sorption, leaching and persistence of metribuzin in Mediterranean soils amended with olive mill waste of different degrees of organic matter maturity. *J. Environ. Manag.* 122, 76–84.
- Marín-Benito, J., Sánchez-Martín, M., Rodríguez-Cruz, M., 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., 2012a. Changes in the sorption-desorption of fungicides over time in an amended sandy clay loam soil under laboratory conditions. *J. Soils Sediments* 12, 1111–1123.
- Marín-Benito, J.M., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2012b. Dissipation of fungicides in a vineyard soil amended with different spent mushroom substrates. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6936–6945.
- Marín-Benito, J.M., Barba, V., Ordax, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2018. Recycling organic residues in soils as amendments: effect on the mobility of two herbicides under different management practices. *J. Environ. Manag.* 224, 172–181.
- 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. *Sci. Total Environ.* 463–464, 589–599.
- Marín-Benito, J.M., Carpio, M.J., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2019. Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: effect of the temperature and the organic amendments. *Sci. Total Environ.* 653, 1301–1310.
- Milan, M., Ferrero, A., Fogliatto, S., Piano, S., Vidotto, F., 2015. Leaching of S-metolachlor, terbuthylazine, desethyl-terbuthylazine, mesotrione, flufenacet, isoxaflutole, and diketonitrile in field lysimeters as affected by the time elapsed between spraying and first leaching event. *J. Environ. Sci. Health B* 50, 851–861.
- Navarro, S., Hernández-Bastida, J., Cazaña, G., Pérez-Lucas, G., Fenoll, J., 2012. Assessment of the leaching potential of 12 substituted phenylurea herbicides in two agricultural soils under laboratory conditions. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5279–5286.
- Novohatska, O., Stavnicenko, P., Kondratiuk, M., Antonenko, A., Vavrinevich, O., Omelchuk, S., Bardov, V., 2018. Comparative hygienic evaluation of behavior of different pesticides groups in soil, prediction of risk of ground water contamination and its danger for human health in areas with irrigation farming. *Rawal Med. J.* 43, 129–136.
- OECD-FAO, 2019. OECD-FAO Agricultural Outlook (Edition 2018). OECD Agriculture Statistics (Database) accessed 28 March 2019.
- Pascal-Lorber, S., Alsayed, H., Jouanin, I., Debrauwer, L., Canlet, C., Laurent, F.O., 2010. Metabolic fate of [14C]diuron and [14C]linuron in wheat (*Triticum aestivum*) and radish (*Raphanus sativus*). *J. Agric. Food Chem.* 58, 10935–10944.
- Postigo, C., López de Alda, M.J., Barceló, D., Ginebreda, A., Garrido, T., Fraile, J., 2010. Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): an approach based on on-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry detection. *J. Hydrol.* 383, 83–92.
- PPDB, 2019. Pesticide Properties Data Base. University of Hertfordshire, UK accessed. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>. (Accessed 1 July 2019).
- Renaud, F.G., Brown, C.D., Fryer, C.J., Walker, A., 2004. A lysimeter experiment to investigate temporal changes in the availability of pesticide residues for leaching. *Environ. Pollut.* 131, 81–91.

- Rodríguez-Cruz, M.S., Herrero-Hernández, E., Ordax, J.M., Marín-Benito, J.M., Draoui, K., Sánchez-Martín, M.J., 2012. Adsorption of pesticides by sewage sludge, grape marc, spent mushroom substrate and by amended soils. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 92, 933–948.
- Rouchaud, J., Neus, O., Blucke, R., Cools, K., Eelen, H., Dekkers, T., 2000. Soil dissipation of diuron, chlorotoluron, simazine and propyzamide, and diflufenican herbicides after repeated application in fruit tree orchards. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 60–65.
- Rouchaud, J., Neus, O., Cools, K., Bulcke, R., 1999. Flufenacet soil persistence and mobility in corn and wheat crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 460–466.
- Shtangeeva, I., Niemelä, M., Perämäki, P., Ryumin, A., Timofeev, S., Chukov, S., Kasatkina, G., 2017. Phytoextraction of bromine from contaminated soil. *J. Geochem. Explor.* 174, 21–28.
- Song, N.H., Chen, L., Yang, H., 2008. Effect of dissolved organic matter on mobility and activation of chlorotoluron in soil and wheat. *Geoderma* 146, 344–352.
- Thevenot, M., Dousset, S., Hertkorn, N., Schmitt-Kopplin, P., Andreux, F., 2009. Interactions of diuron with dissolved organic matter from organic amendments. *Sci. Total Environ.* 407, 4297–4302.
- USEPA, 1998. United States Environmental Protection Agency Pesticide Fact Sheet – Flufenacet. USEPA, Washington, DC, p. 31.
- Vasilakoglou, I.B., Eleftherohorinos, I.G., Dhima, K.B., 2001. Activity, adsorption and mobility of three acetanilide and two new amide herbicides. *Weed Res.* 41, 535–546.
- Walker, A., Rodríguez-Cruz, M.S., Mitchell, M.J., 2005. Influence of ageing of residues on the availability of herbicides for leaching. *Environ. Pollut.* 133, 43–51.
- Willkommen, S., Pfannerstill, M., Ulrich, U., Guse, B., Fohrer, N., 2019. How weather conditions and physico-chemical properties control the leaching of flufenacet, diflufenican, and pendimethalin in a tile-drained landscape. *Agric. Ecosyst. Environ.* 278, 107–116.
- Yang, H., Wu, X., Zhou, L.X., Yang, Z.M., 2005. Effect of dissolved organic matter on chlorotoluron sorption and desorption. *Pedosphere* 15, 432–439.
- Yazdanpanah, N., Mahmoodabadi, M., Cerdá, A., 2016. The impact of organic amendments on soil hydrology, structure and microbial respiration in semiarid lands. *Geoderma* 266, 58–65.



**CAPÍTULO 2**  
**MATERIAL SUPLEMENTARIO**



## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### **MOBILITY MONITORING OF TWO HERBICIDES IN AMENDED SOILS: A FIELD STUDY FOR MODELING APPLICATIONS**

María J. Carpio<sup>a</sup>, M. Sonia Rodríguez-Cruz<sup>a</sup>, Carlos García-Delgado<sup>a,b</sup>, María J. Sánchez-Martín<sup>a</sup>, Jesús M. Marín-Benito<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain*

<sup>b</sup> *Department of Geology and Geochemistry, Autonomous University of Madrid, 28049 Madrid, Spain (Present address)*

\*Corresponding author: [jesusm.marin@irnasa.csic.es](mailto:jesusm.marin@irnasa.csic.es) (Jesús M. Marín-Benito)

#### **Author's e-mails:**

María J. Carpio: [mjose.carpio@irnasa.csic.es](mailto:mjose.carpio@irnasa.csic.es)

M. Sonia Rodríguez-Cruz: [msonia.rodriguez@irnasa.csic.es](mailto:msonia.rodriguez@irnasa.csic.es)

Carlos García-Delgado: [carlos.garciadelgado@uam.es](mailto:carlos.garciadelgado@uam.es)

María J. Sánchez-Martín: [mjesus.sanchez@irnasa.csic.es](mailto:mjesus.sanchez@irnasa.csic.es)

Jesús M. Marín-Benito: [jesusm.marin@irnasa.csic.es](mailto:jesusm.marin@irnasa.csic.es)

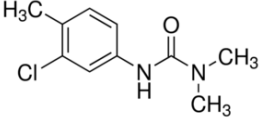
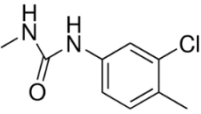
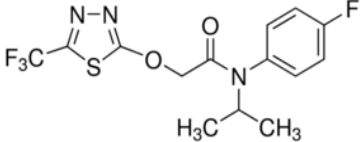
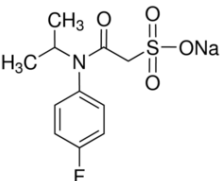
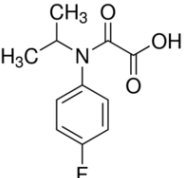
Number of Pages: 11

Number of Tables: 4

Number of Figures: 2

## Materials and Methods

Table S1. Main characteristics of herbicides and their metabolites.

Common name Chemical structure	IUPAC name	WS <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Log Kow <sup>b</sup>	Koc/Kfoc <sup>c</sup> (mL g <sup>-1</sup> )	DT <sub>50</sub> <sup>d</sup> (days)	GUS index <sup>e</sup>
Chlorotoluron 	3-(3-chloro-p-tolyl)- 1,1-dimethylurea	74	2.5	196	59	3.02
Desmethylchlorotoluron 	3-(3-chloro-p-tolyl)-1- methylurea	-	-	248	60	2.84
Flufenacet 	4'-fluoro- <i>N</i> -isopropyl- 2-[5-(trifluoromethyl)- 1,3,4-thiadiazol-2- yloxy]acetanilide	51	3.5	273.3	19.7	2.02
Flufenacet-ESA 	2-(4-fluoro- <i>N</i> -propan-2- ylanilino)-2- oxoethanesulfonic acid	5500	-	12.5	302	7.20
Flufenacet-OA 	((4-fluorophenyl) (isopropyl)amino) oxoacetic acid	-	-	14.0	11.1	2.98

<sup>a</sup> Water solubility at 20°C; <sup>b</sup> Octanol/water partition coefficient at pH 7 and 20°C; <sup>c</sup> Sorption coefficient normalized to organic carbon content; <sup>d</sup> Time to degradation 50% of compound; <sup>e</sup> Gustafson mobility index (PPDB, 2019)

## **Experimental**

### **Characterization of Organic Amendments**

The pH and the electric conductivity were determined in a residue/water suspension (1/2.5 and 1/5 w/v ratio, respectively). The electric conductivity was determined using a conductivimeter LF91 (WTW, Weilheim, Germany). Organic matter (OM) content was calculated as 100-% ash being ash percentage determined by weight difference after ignition at 540°C for 24 h. Dissolved organic carbon (DOC) was determined in a residue/ water suspension (1/100 w/v ratio) after shaking (24 h, 20°C), centrifuging (20 min at 10,000 rpm) and filtering (< 0.45 µm). The DOC content was determined using a Shimadzu 5050 (Shimadzu, Columbia, MD, USA) organic carbon analyzer. Total OC and N were determined using a LECO CN628 (LECO Corporation, Saint Joseph, MI) elemental analyzer. Assimilable P was determined by the Olsen method while assimilable K, Ca and Mg were extracted with ammonium acetate at pH 7 and quantified using a Varian model 720-ES inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (Varian Instruments, Palo Alto, CA).

Table S2. Characteristics of the organic amendments spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC) (% dry weight basis).

Parameter/Organic amendment	SMS	GC
pH	7.9	7.2
electric conductivity (S/m)	0.78	0.22
ash (%)	40.6	54.0
moisture (%)	37.7	48.6
OM <sup>a</sup> (%)	59.4	46.0
DOC <sup>b</sup> (mg g <sup>-1</sup> )	11.88	7.184
OC <sup>c</sup> (%)	35.0	26.7
N (%)	2.3	1.1
C/N	15.2	24.3
CEC <sup>d</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	35.1	41.4
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	59.5	40.3
K <sub>2</sub> O (mg/100g)	858	458
CaO (mg/100g)	1774	757.3
MgO (mg/100g)	177.7	126.5

<sup>a</sup> Organic matter.

<sup>b</sup> Dissolved organic carbon.

<sup>c</sup> Organic carbon.

<sup>d</sup> Cationic exchange capacity.

## **Characterization of Soil Samples**

Soil particle size distribution was determined using the pipette method. Inorganic carbon was determined as  $\text{CaCO}_3$  with a Bernard calcimeter. Organic carbon (OC) content was calculated as difference between total C (measured with the LECO CN628 elemental analyser) and inorganic carbon. OM was calculated from the OC results multiplied by 1.724 and DOC was determined in a 1:2 (w/v) water extract as indicated for organic amendments. Clay minerals (montmorillonite, illite and kaolinite) were qualitatively identified in the soil clay fraction by the X-ray diffraction technique using a Philips PW1710 diffractometer (Eindhoven, The Netherlands).

## **Chemical extraction and analysis**

The extraction and analysis of herbicides and their major metabolites formed during the experiment was carried out as indicated in Marín-Benito et al. (2019). Briefly, triplicate subsamples of moist soil (6 g) from each 10-cm segment of unamended or amended soil cores taken at each sampling time were extracted with acetonitrile (12 mL), undergoing an ultrasonic bath (1 h, 20 °C), shaking (24 h, 20 °C), centrifugation (5045 g, 15 min), and filtration ( $< 0.45 \mu\text{m}$ ). Extracts (8 mL) were evaporated until dryness at 25 °C under a nitrogen stream using an EVA-EC2-L evaporator (VLM GmbH, Bielefeld, Germany). The residue was dissolved in 0.75 mL of acetonitrile and transferred to a glass vial for analysis.

The herbicides and their metabolites were determined by HPLC-DAD-MS using a Waters chromatograph (Waters Assoc., Milford, USA) with a Phenomenex Luna (3  $\mu\text{m}$  C18, 150  $\times$  4.6 mm) column. The mobile phase was acetonitrile:water + 1% formic acid (80:10). The flow rate was 0.4 mL  $\text{min}^{-1}$  and the sample injection volume was 20  $\mu\text{L}$ . The detection by DAD was at 243 nm for chlorotoluron and 232 nm for flufenacet.

The positive molecular ions ( $m/z$ )  $[M+H^+]$  monitored with a MS detector were 213.04 for chlorotoluron and 364.03 for flufenacet. The retention times were 6.1 min for chlorotoluron and 7.9 min for flufenacet. Monitoring also involved positive molecular ions ( $m/z$ )  $[M+H^+]$  198.65 for desmethyl chlorotoluron, and negative molecular ions ( $m/z$ )  $[M-Na^+]$  274.26 for flufenacet ESA and  $[M-H^+]$  224.15 for flufenacet OA, respectively. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for flufenacet ranged from 0.003 (S+SMS) to 0.005  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (S+GC), and from 0.009 (S+SMS) to 0.016  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (S+GC), respectively. In the case of chlorotoluron, the LOD was 0.002  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for all the soil treatments, and the LOQ varied between 0.006 (S+GC) and 0.008  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (S+SMS). The recoveries of the extraction method were determined by spiking three soil samples in each treatment with analytical grade herbicide to a final concentration of 3  $\text{mg kg}^{-1}$ , performing the extraction procedure as described above. The mean recovery values varied between 101% and 115% for chlorotoluron, and 95% and 101% for flufenacet.



Table S3. Initial characteristics of unamended (S) and SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soil profiles.

Treatment	Horizon	Texture	Sand	Silt	Clay	pH	Bulk density	CaCO <sub>3</sub>	OC <sup>a</sup>	OM <sup>b</sup>	DOC <sup>c</sup>	N	C/N	CEC <sup>d</sup>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	MgO	Clay
Depth	type		(%)	(%)	(%)		(g cm <sup>-3</sup> )	(%)	(%)	(%)	(mg g <sup>-1</sup> )	(%)		(cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	(mg/100g)	(mg/100g)	(mg/100g)	(mg/100g)	mineralogy <sup>e</sup>
S																			
0-10 cm	Ap	sandy loam	80.4	4.7	14.9	6.34	1.48	0.00	0.77	1.33	0.12	0.05	14.7	8.5	2.3	4.7	104.4	17.4	M, I, K
11-30 cm	Ap	sandy loam	79.7	4.9	15.4	6.62	1.45	0.19	0.91	1.57	0.13	0.07	12.4	7.7	1.5	3.9	108.4	19.3	M, I, K
31-55 cm	Bw	sandy loam	77.4	6.0	16.6	7.13	1.54	0.07	0.51	0.88	0.09	0.04	13.8	6.7	0.9	3.9	96.9	17.4	M, I, K
56-90 cm	2B1	sandy loam	72.9	7.4	19.7	7.36	1.61	0.13	0.27	0.47	0.04	0.02	17.3	6.8	0.6	4.4	93.2	17.8	M, I, K
91-160cm	2Bt/C	sandy clay	68.3	9.7	22.0	7.74	1.60	0.14	0.29	0.50	0.03	0.02	12.0	7.5	0.8	4.7	112.0	25.0	M, I, K
S+SMS																			
0-10 cm	Ap	sandy loam	76.7	6.8	16.5	7.11	1.23	1.01	2.64	4.56	0.50	0.24	11.2	10.9	12.6	149.6	512.8	43.7	M, I, K
11-30 cm	Ap	sandy loam	78.8	5.0	16.2	7.15	1.45	0.19	0.95	1.64	0.39	0.07	13.5	7.8	2.8	8.5	142.2	20.2	M, I, K
S+GC																			
0-10 cm	Ap	sandy loam	78.7	4.7	16.6	6.99	1.34	0.00	1.69	2.92	0.38	0.14	12.5	11.0	6.9	30.0	183.0	29.0	M, I, K
11-30 cm	Ap	sandy loam	79.2	4.7	16.1	6.70	1.45	0.19	0.94	1.63	0.27	0.07	13.0	8.3	3.1	5.8	123.6	21.6	M, I, K

<sup>a</sup> Organic carbon.

<sup>b</sup> Organic matter.

<sup>c</sup> Dissolved organic carbon.

<sup>d</sup> Cationic exchange capacity.

<sup>e</sup> M, montmorillonite; I, illite; K, kaolinite

## **Data Analysis**

Standard deviation (SD) was used to indicate variability among replicates. A two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the effects of the different soil treatments and times on soil characteristics and on bromide and herbicide mobility in the soil profile. Fisher's least significant difference (LSD) was determined at a confidence level of 95%. Simple and multiple linear regression models were used to relate chemical mobility to the OC, DOC and water content of soils. SPSS Statistics v22.0 software for Windows (IBM Inc. Chicago, ILL) was used.

## Results and Discussion

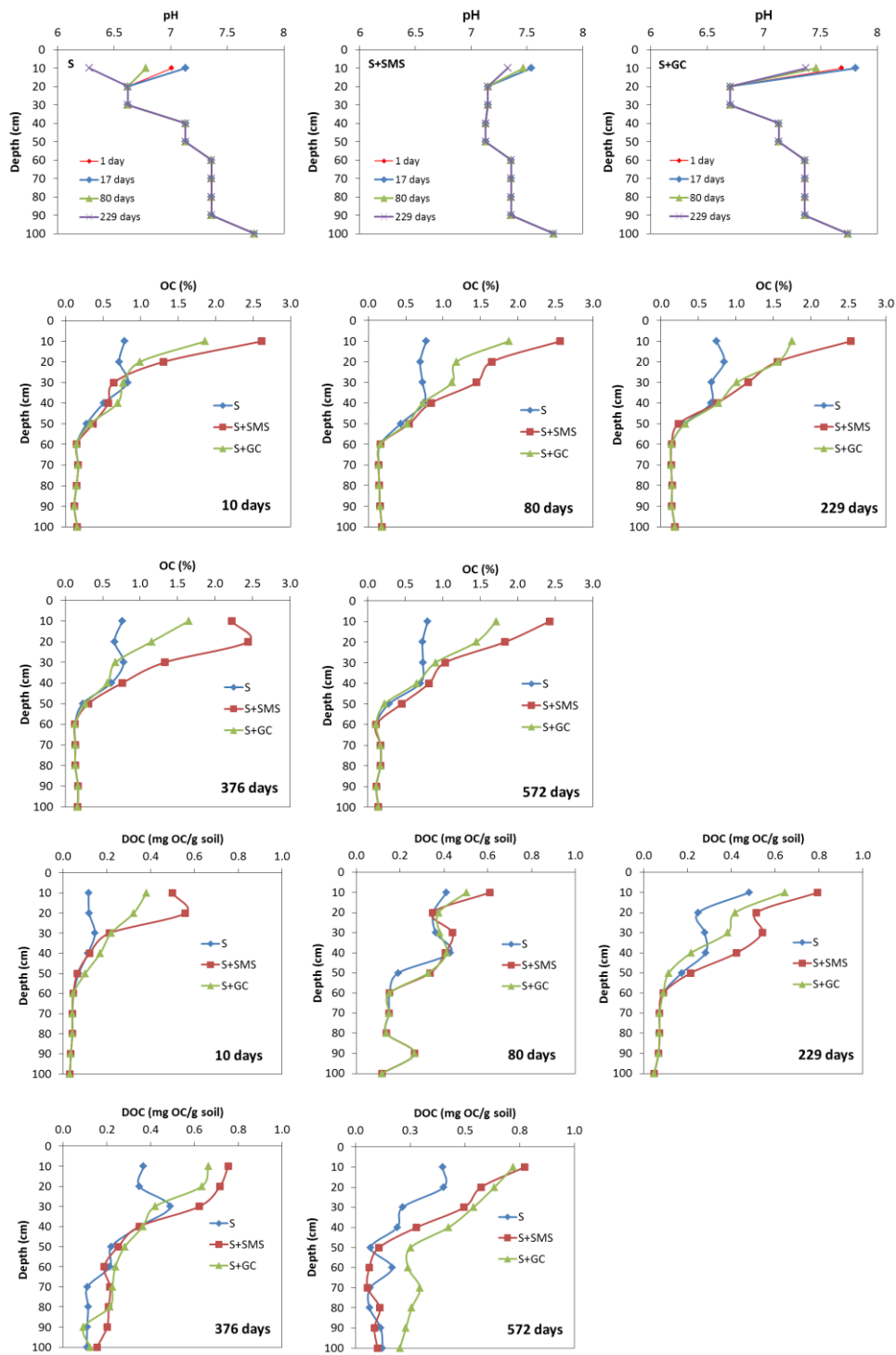


Fig. S1. Mean values of pH, organic carbon (OC) and dissolved organic carbon (DOC) for each 10-cm layer in soils unamended (S) and amended with composted spent mushroom substrate (S+SMS) or with green compost (S+GC) at different sampling times after the herbicides' application. Times 376 and 572 days correspond to 29 and 225 days after the second application of herbicides, respectively.

Table S4. Initial sorption coefficients ( $K_d$ , mL g<sup>-1</sup>) for chlorotoluron and flufenacet in the different horizons of the unamended (S) and SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils calculated for an initial concentration of 1 µg mL<sup>-1</sup>.

Depth (cm)/Treatment	S	S+SMS	S+GC
Chlorotoluron			
0-10	0.773±0.070	4.773±0.311	2.563±0.192
11-30	0.873±0.073	0.747±0.031	1.655±0.220
31-55	0.419±0.086		
56-90	0.155±0.029		
91-160	0.105±0.028		
Flufenacet			
0-10	1.038±0.055	6.340±0.335	2.909±0.310
11-30	1.118±0.049	1.092±0.204	1.180±0.304
31-55	0.316±0.037		
56-90	0.077±0.023		
91-160	0.073±0.028		

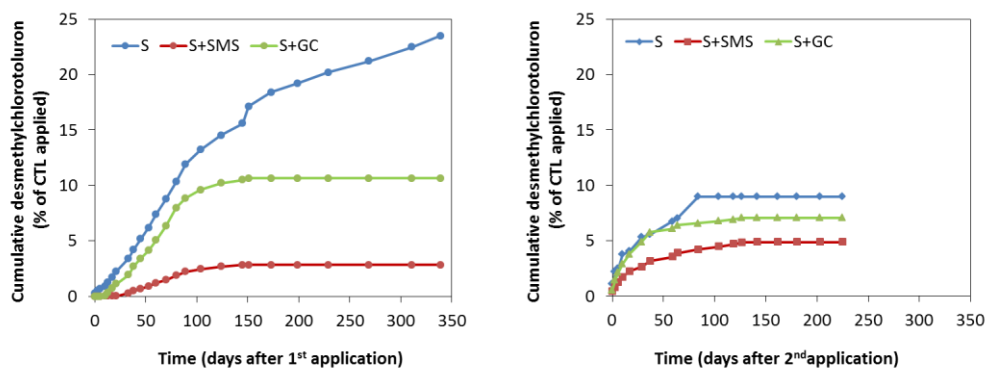


Fig. S2. Formation of desmethylchlorotoluron (cumulative amount) in the top 10 cm of the unamended (S) and SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils expressed as percentage of chlorotoluron (CTL) initially added.

## References

Marín-Benito, J.M., Carpio, M.J., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2019.

Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: Effect of the temperature and the organic amendments. *Sci. Total Environ.* 653, 1301–1310.

PPDB. 2019. Pesticide Properties Data Base. University of Hertfordshire, UK

<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> (accessed 1 July 2019).



# CAPÍTULO 3

## RESUMEN





### **CAPÍTULO 3: Modelling herbicides mobility in amended soils: Calibration and test of PRZM and MACRO.**

#### **RESUMEN**

La agricultura actual basada en el uso de pesticidas, especialmente herbicidas, para incrementar la productividad de los cultivos tiene como reto la implementación de sistemas de cultivo sostenibles para la producción de alimentos y la preservación de la calidad de suelos y aguas. Entre estas estrategias, está la aplicación al suelo de residuos orgánicos como enmiendas, cuya materia orgánica (MO) influye en la fertilidad del suelo y en el desarrollo de la planta. Sin embargo, la dinámica de los herbicidas en el suelo puede verse modificada por la MO de estos residuos cuando ambas prácticas agrícolas se llevan a cabo conjuntamente.

La integración de los principales procesos que determinan la dinámica de los pesticidas en el suelo (adsorción/desorción, degradación, lixiviación, volatilización, absorción por las plantas, erosión y/o escorrentía) en modelos matemáticos desarrollados para evaluar la conducta de estos compuestos en el medio ambiente permite realizar simulaciones fiables de su destino ambiental. Sin embargo, la práctica agrícola que incluye la aplicación de residuos orgánicos al suelo no se considera en los estudios de modelización que evalúan el riesgo medioambiental de los pesticidas a nivel de su reglamentación en Europa antes de su comercialización, a pesar de su impacto potencial en el destino medioambiental de los pesticidas.

En este sentido, en el presente trabajo se abordaron los siguientes objetivos: i) simular la movilidad de dos herbicidas ampliamente utilizados en agricultura, clortoluron (CTL) y flufenacet (FNC), y del ion trazador bromuro ( $\text{Br}^-$ ), aplicados en un suelo agrícola sin enmendar o control (S) y enmendado con sustrato postcultivo de hongos (S + SMS) o compost vegetal (S + GC) mediante dos modelos FOCUS de lixiviación de pesticidas, y ii) evaluar y comparar el rendimiento de ambos modelos para su utilización como herramienta predictiva de los riesgos de contaminación ambiental por estos herbicidas bajo este tipo de prácticas agronómicas.

Durante dos periodos experimentales (2016 – 2017 y 2017 – 2018) se monitorizó el contenido volumétrico en agua del suelo y las concentraciones del ion  $\text{Br}^-$  y de los dos herbicidas en el perfil de suelo (0 – 100 cm) en nueve parcelas experimentales (tres

réplicas por tratamiento) cultivadas con trigo de invierno. Los datos climáticos (lluvia y temperatura máxima, mínima y promedio del aire) se monitorizaron diariamente utilizando una estación meteorológica de la AEMET ubicada *in situ*, y se obtuvieron datos adicionales de evapotranspiración de una estación ubicada a 23 km de la finca experimental.

Las simulaciones se llevaron a cabo con los modelos PRZM y MACRO que se parametrizaron con todos los datos específicos del lugar experimental disponibles (medidas de laboratorio y de campo), datos procedentes de la bibliografía y calculados mediante funciones pedotransferencia. Las concentraciones experimentales de  $\text{Br}^-$  y herbicidas en los perfiles de suelo correspondientes al primer período experimental (2016 – 2017) se utilizaron para calibrar los parámetros de dispersión ( $\lambda$  y  $D$ ), y los coeficientes de distribución ( $K_d$ ) y tiempos de vida media ( $DT_{50}$ ), respectivamente, por comparación con los resultados de simulación de cada uno de los tratamientos. Posteriormente, la validación de los modelos se realizó por comparación con los datos experimentales correspondientes al segundo período experimental (2017 – 2018) sin llevar a cabo ninguna calibración adicional.

Los resultados de modelización mostraron que el rendimiento de MACRO para simular todo el conjunto de datos en los tres tratamientos del suelo fue mayor que el de PRZM. MACRO simuló satisfactoriamente el contenido en agua observado experimentalmente en los perfiles de suelo sin enmendar y enmendado, sin embargo, PRZM no predijo bien la dinámica del agua a lo largo del perfil de suelo independientemente del tratamiento.

Ambos modelos simularon correctamente la distribución vertical de  $\text{Br}^-$ , CTL y FNC a lo largo de los tres perfiles del suelo durante todo el período de simulación. La movilidad de  $\text{Br}^-$  tanto en el suelo control como en los suelos enmendados fue muy bien reproducida por ambos modelos después del ajuste de los parámetros de dispersión a las observaciones. Para el caso de los herbicidas, los parámetros  $K_d$  y  $DT_{50}$  tuvieron que ser calibrados. La calibración de estos parámetros fue diferente para cada tratamiento de suelo, herbicida y modelo. Los dos modelos reprodujeron correctamente la movilidad de los herbicidas en el perfil del suelo control sin realizar ninguna calibración. Sin embargo, PRZM necesitó una calibración de las  $K_d$  y  $DT_{50}$  de los herbicidas en los suelos enmendados para obtener un ajuste aceptable entre observaciones y predicciones. Por su

parte, MACRO también simuló correctamente la dinámica del FNC en los suelos enmendados sin necesidad de calibrar ninguno de los dos parámetros, aunque para el CTL, los valores experimentales de  $K_d$  requirieron la citada calibración. A pesar de ello, la capacidad de MACRO para ajustar la dinámica de los herbicidas en los suelos enmendados fue inferior que en el suelo sin enmendar. La calibración de  $K_d$  y  $DT_{50}$  se basó en el contenido inicial en carbono orgánico disuelto (COD) del suelo control y los suelos enmendados para tener en cuenta procesos tales como la formación de complejos móviles herbicida – COD que no son descritos por defecto en los modelos. De tal modo que la calibración asumió que el COD aportado por los residuos orgánicos disminuyó la adsorción de los herbicidas por el suelo facilitando su biodisponibilidad en solución para ser mineralizado y/o degradado por los microorganismos del suelo, y para ser transportado a lo largo del perfil de los suelos enmendados.

Este trabajo demostró que los modelos PRZM y MACRO pueden utilizarse como herramientas predictivas frente a la contaminación de aguas subterráneas por pesticidas en suelos enmendados, al menos en una escala bianual, después de calibrar los valores de  $DT_{50}$  y/o  $K_d$ . Sin embargo, para su utilización con este fin en el contexto regulatorio sería necesario agregar un módulo en los modelos que permitiese corregir los valores de  $DT_{50}$  y  $K_d$  de acuerdo con el contenido en COD de los suelos enmendados, además de probar otras combinaciones de residuos orgánicos – pesticidas – variables pedoclimáticas, y durante períodos de tiempo más prolongados. Estas serían las vías de evolución de los estudios de modelización en suelos enmendados previamente a la utilización de estos modelos para optimizar las dosis de aplicación de las enmiendas dirigidas a evitar la contaminación de las aguas subterráneas.



**CAPÍTULO 3**  
**ARTÍCULO PUBLICADO**





# Modelling herbicides mobility in amended soils: Calibration and test of PRZM and MACRO

Jesús M. Marín-Benito <sup>a,\*</sup>, Laure Mamy <sup>b</sup>, María J. Carpio <sup>a</sup>, María J. Sánchez-Martín <sup>a</sup>, M. Sonia Rodríguez-Cruz <sup>a</sup>

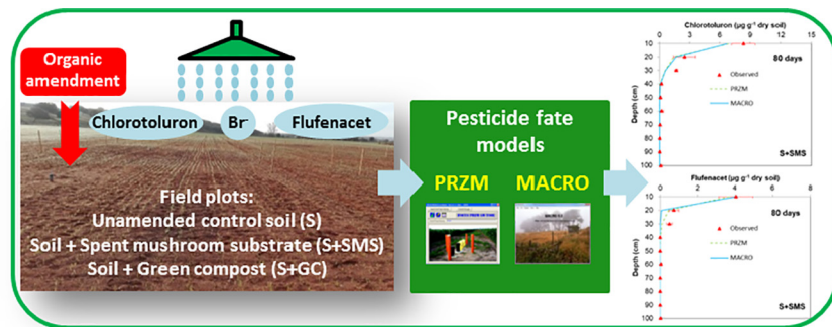
<sup>a</sup> Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain

<sup>b</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS, 78850 Thiverval-Grignon, France

## HIGHLIGHTS

- PRZM and MACRO performance to assess herbicides fate in amended soils was tested.
- MACRO simulated water contents in control and amended soils better than PRZM.
- Both models predicted well herbicide distributions in the amended soil profiles after a calibration step.
- The calibration of  $K_d$  and  $DT_{50}$  was different for each soil treatment, herbicide and model.
- The calibration of  $K_d$  and  $DT_{50}$  in the amended soils was based on their dissolved organic carbon content.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 17 December 2019

Received in revised form 28 January 2020

Accepted 29 January 2020

Available online 30 January 2020

Editor: Damia Barcelo

### Keywords:

Pesticide fate model

Mobility

Herbicide

Bromide tracer

Soil amendment

Dissolved organic carbon

## ABSTRACT

Addition of organic residues to soil is a current farming practice but it is not considered in the modelling studies for pesticide risk assessment at regulatory level despite its potential impact on the pesticide dynamics in soil. Thus, the objective of this work was to examine and to compare the ability of PRZM and MACRO pesticide fate models to simulate soil water content, and bromide ( $Br^-$ , tracer), chlorotoluron and flufenacet concentrations in the soil profiles (0–100 cm) of one agricultural soil, unamended (control soil, S), amended with spent mushroom substrate (S + SMS) or amended with green compost (S + GC). Based on a two-year field-scale dataset, the models were first calibrated against measurements of water and solutes contents in the soil profiles (first year) and then tested without any further model calibration by comparison with the field observations of the second year. In general, the performance of MACRO to simulate the whole dataset in the three soil treatments was higher than that of PRZM. MACRO simulated satisfactorily the water dynamics along the soil profiles whereas it was poorly described by the capacity model PRZM. Both models predicted very well the  $Br^-$  mobility in control and amended soils after dispersion parameters were fitted to observations. No calibration was necessary to reproduce correctly herbicides vertical distribution in the control soil profile. In the amended soils, MACRO simulations were highly correlated to the observed vertical distribution of flufenacet and chlorotoluron, but calibration of the  $K_d$  of chlorotoluron was needed. On the contrary, modelling with PRZM required calibration of  $K_d$  and  $DT_{50}$  of both herbicides to obtain an acceptable agreement between observations and predictions in the amended soils.  $K_d$  and  $DT_{50}$  calibration was based on the initial dissolved organic carbon contents (DOC) of amended soils. It allowed to take into account the processes that decrease the herbicides sorption on the soil and enhance their bioavailability, but that are not described in PRZM and MACRO (such as the formation of herbicide-DOC mobile complexes). This work showed that models such as PRZM and MACRO are able to simulate

\* Corresponding author at: Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain.  
E-mail address: [jesusm.marin@irnasa.csic.es](mailto:jesusm.marin@irnasa.csic.es) (J.M. Marín-Benito).

the fate of pesticides in amended soils. However, before using these models as predictive tools in large amended soil conditions, and especially in the regulatory context, further modelling studies should focus on other pedoclimatic-pesticides-organic residues combinations, and on longer periods.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Preserving the quality and sustainability of soils and waters represents a great challenge in the modern agriculture. This agriculture is mainly based on the use of pesticides for crop protection, and on the application of fertilizers such as organic wastes to increase soil organic matter (OM) content and fertility, and consequently crop yields (Chen et al., 2018). The dynamic of pesticides in the soil can be modified by the solid and dissolved OM of the organic wastes, leading to environmental consequences such as groundwater contamination by pesticides (Barriuso et al., 2011; Briceño et al., 2008; López-Piñeiro et al., 2013; Marín-Benito et al., 2014a; Song et al., 2008; Thevenot et al., 2009). However, studies tackling the influence of organic amendments on the fate of pesticides under real field conditions have been rarely conducted (Boesten and Van der Pas, 2000; Herrero-Hernández et al., 2011; Marín-Benito et al., 2018), and even less its modelling at this scale (Filipović et al., 2014; Ghirardello et al., 2010; Hughes et al., 2008; Jarvis et al., 2000).

Numerical models have become essential tools to study pesticide transport processes through soil profile, not only at research level but also for registration purposes. A large number of models has been developed to evaluate the fate of pesticides in the environment (Siimes and Kämäri, 2003). Among these models, four of them are recommended by the FOCUS (FORum for Co-ordination of pesticide fate models and their USE) group for risk assessment for pesticide registration at the European level (FOCUS, 2000): MACRO (Larsbo and Jarvis, 2003), PEARL (Leistra et al., 2001), PELMO (Klein, 1995) and PRZM (Carsel et al., 2005). These models take into account the main processes affecting the dynamics of pesticides in soil (sorption, degradation, leaching, volatilization, absorption by plants, erosion, and/or runoff), and numerous studies showed they provided reliable simulations of the environmental fate of these compounds (Giannouli and Antonopoulos, 2015; Gottesbüren et al., 2000; Mamy et al., 2008; Marín-Benito et al., 2015; Vanclooster and Boesten, 2000). From a regulatory point of view, 125 groundwater scenarios (based on 9 pedoclimatic scenarios with 12 to 16 crops each) have been defined to collectively represent agriculture conditions in the European Union to assess the leaching of active substances (FOCUS, 2000, 2009) but the addition of organic amendments is not considered. Despite the nine pedoclimatic scenarios comprise soils having a wide range of OM contents, from 1.3% to 7.0% (FOCUS, 2000), the behavior of pesticides in soils with endogenous OM is different from their behavior in soils with exogenous OM added through organic amendments (Houot et al., 2014). It is therefore necessary to test the ability of numerical models to simulate the fate of pesticides in amended soils. In addition, this will help to improve risk assessment in the regulatory context.

Thus, the objectives of this work were: (i) to simulate, using PRZM and MACRO, the mobility of two herbicides widely used in wheat crops and having contrasting mobility (PPDB, 2019), chlorotoluron and flufenacet, in unamended (control soil, S) and amended (with spent mushroom substrate, S + SMS, or green compost, S + GC) agricultural soils, (ii) to assess and to compare their performances to be used as predictive tool in amended soils. Modelling was based on a two-year field dataset including water, Br<sup>-</sup>, chlorotoluron and flufenacet contents in control and amended soil profiles cropped with winter wheat (Carpio et al., 2020).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Pesticide fate models

The two one-dimensional PRZM 3.21 and MACRO 5.2 models were selected because they differ in their description of water and solute transport. A detailed description of PRZM and MACRO can be found in Carsel et al. (2005) and Larsbo and Jarvis (2003), respectively, and a comparative description of how both models simulate the main processes involved in the fate of pesticides in the environment is provided in Marín-Benito et al. (2014b). Briefly, PRZM describes the water movement in the soil profile with a capacity-based approach. Solute transport is described by convection, and numerical dispersion. MACRO considers non-steady state flows of water and solute for a variably-saturated layered soil profile. It is a dual-permeability model which divides the total soil porosity into two separate flow regions (micropores and macropores), each characterized by their own flow rates and solute concentrations. A soil water pressure head close to saturation and its associated water content and hydraulic conductivity define the boundary between the two regions. Soil water flow is described by the Richards equation in the micropores, and it is gravity driven in the macropore region. For the solute transport simulation, MACRO implements the convection-dispersion equation in the micropores, while it is assumed to be solely convective in the macropores. Exchange between the two domains is calculated according to physically based expressions using an effective aggregate half-width.

### 2.2. Experimental site, soil treatments and measurements

Simulations were based on a two-year (2016–2018) field experiment set up at the Muñovela experimental farm belonging to the Spanish Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (40°54'15"N latitude and 5°46'26"W longitude). A detailed description of the Muñovela dataset is given by Carpio et al. (2020), therefore, only a short overview of the experimental site, soil treatments, and measurements is given here. Nine plots of 81 m<sup>2</sup> were treated as follows (three replicate plots per treatment): unamended control soil (S), soil amended with 140 t ha<sup>-1</sup> (dry weight basis) of spent mushroom substrate (S + SMS), and soil amended with 85 t ha<sup>-1</sup> (dry weight basis) of green compost (S + GC). The soil is an Eutric-Chromic Cambisol (IUSS Working Group WRB, 2015) with a predominant sandy-loam texture down to 1 m depth (Table 1). Organic amendments were incorporated into the top 20 cm using a rototiller in November 2016. Then each plot was equipped with one PVC pipe (120 cm length × 5.2 cm Ø) to monitor soil water content every 20 cm down to 1 m depth using a portable dielectric probe. From 29 November 2016 to 30 November 2018, 38 soil water content measurements at 20, 40, 60, 80 and 100 cm depth were recorded per plot. Winter wheat was annually sown in November in all plots (Table 2). After harvest, a bare soil was maintained during the fallow period.

The 9 plots were sprayed once a year with chlorotoluron and flufenacet herbicides at 15 and 5 kg a.i. ha<sup>-1</sup> as Erturon® (Cheminova Agro S.A.) and Herold® (Bayer Crop Science S.L.) formulation, respectively, and with Br<sup>-</sup> tracer at 53 kg a.i. ha<sup>-1</sup>. The three compounds were jointly applied in pre-emergence on 1 December 2016, and on 13 November 2017 (346 days after the first application). Soil samples were taken on 17 sampling dates over the whole experiment (at 1, 17, 33, 60, 80, 151, 229 and 339 days after the first application, and at 1,



**Table 1**

Main physicochemical and hydraulic characteristics of unamended control (S), SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soil profiles.

Treatment	S					S + SMS		S + GC	
	0–10	11–30	31–55	56–90	91–160	0–10	11–30	0–10	11–30
Sand (%)	80.4	79.7	77.4	72.9	68.3	76.7	78.8	78.7	79.2
Silt (%)	4.7	4.9	6.0	7.4	9.7	5.8	5.0	4.7	4.7
Clay (%)	14.9	15.4	16.6	19.7	22.0	16.5	16.2	16.6	16.1
pH	6.34	6.62	7.13	7.36	7.74	7.11	7.15	6.99	6.70
Bulk density (g cm <sup>-3</sup> )	1.48	1.45	1.54	1.61	1.60	1.23	1.45	1.34	1.45
OC (%)	0.77	0.91	0.51	0.27	0.29	2.64	0.95	1.69	0.94
DOC (mg g <sup>-1</sup> )	0.12	0.13	0.09	0.04	0.03	0.50	0.39	0.38	0.27
$\theta_{\text{initial}}$ (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> ) <sup>a,b</sup>	0.183	0.199	0.147	0.141	0.192	0.279	0.238	0.244	0.239
$\theta_{\text{FC}}$ (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> ) <sup>c</sup>	0.225	0.235	0.239	0.259	0.275	0.290	0.244	0.264	0.242
$\theta_{\text{WP}}$ (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> ) <sup>c</sup>	0.072	0.075	0.076	0.094	0.108	0.090	0.077	0.081	0.077
$\theta_r$ (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> ) <sup>d</sup>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
$\theta_s$ (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> ) <sup>d</sup>	0.383	0.393	0.341	0.327	0.336	0.472	0.394	0.428	0.393
$\alpha$ (cm <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	0.087	0.085	0.096	0.094	0.088	0.068	0.086	0.078	0.087
$n$ (–) <sup>d</sup>	1.339	1.326	1.271	1.223	1.192	1.240	1.314	1.290	1.319
$K_{\text{sat}}$ (mm h <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	76.41	76.32	48.79	24.52	6.41	75.79	76.20	76.08	76.25
CTEN (cm) <sup>e</sup>	10	10	10	10	10	10	10	10	10
$\theta_b$ (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> ) <sup>f</sup>	0.332	0.343	0.325	0.319	0.332	0.422	0.344	0.378	0.343
$K_b$ (mm h <sup>-1</sup> ) <sup>f</sup>	1.413	1.316	0.793	0.516	0.409	0.789	1.202	1.083	1.246
ASCALE (mm) <sup>f</sup>	15	15	150	150	15	15	15	15	15
ZN (–) <sup>f</sup>	4	4	2	2	4	4	4	4	4

Note: The parameters without exponent correspond to measured parameters taken from Carpio et al. (2020).

<sup>a</sup> Data for 0–20, 20–40, 40–60, 60–80 and 80–100 cm soil layers, respectively. The data measured for the 80–100 cm layer were used to parameterize the 100–160 cm layer.<sup>b</sup>  $\theta_{\text{initial}}$  at 40–60, 60–80 and 80–160 cm depth were 0.166, 0.177 and 0.193 m<sup>3</sup> m<sup>-3</sup> for S + SMS and 0.171, 0.144 and 0.166 m<sup>3</sup> m<sup>-3</sup> for S + GC, respectively.<sup>c</sup> Estimated by Rosetta's pedotransfer functions (Šimůnek et al., 2008).<sup>d</sup> Estimated by HYPRES pedotransfer functions (Wösten et al., 1999).<sup>e</sup> Default value (Larsbo and Jarvis, 2003).<sup>f</sup> Estimated using the pedotransfer functions included in MACRO 5.2.

29, 64, 127, 142, 181, and 225 days after the second application), every 10 cm from 0 to 100 cm. Then they were analysed by ion chromatography and HPLC-DAD-MS for Br<sup>-</sup> and herbicide concentrations, respectively. The analytical methods are described in detail in (Marín-Benito et al., 2019).

### 2.3. Modelling strategy

Simulations were run from 29 November 2016 to 30 November 2018 according to field dataset. One period out of the two experimental periods was used for models calibration (between 29 November 2016 and 12 November 2017), and another one to test the performance of the models (from 13 November 2017 to 30 November 2018). Therefore, the strategy of simulation was first to calibrate the models against the field measurements of water, Br<sup>-</sup>, chlorotoluron and flufenacet contents in the control and amended soil profiles over the calibration period. Then soil water contents and chemicals transport were simulated without any further models calibration, and the results were compared to soil moisture, Br<sup>-</sup>, chlorotoluron and flufenacet concentrations measured in the soils over the test period.

### 2.4. Models parameterization

The control, SMS- and GC-amended soil profiles of 1.6 m were split into five horizons of various thicknesses (Table 1). The soil physicochemical characteristics were measured at the experimental site (Carpio et al., 2020). For each soil layer, water contents at field capacity ( $\theta_{\text{FC}}$ , pF = 2.5) and at wilting point ( $\theta_{\text{WP}}$ , pF = 4.2), as needed in PRZM, were estimated using Rosetta pedotransfer functions (Šimůnek et al., 2008). For MACRO parameterization, the pedotransfer functions of HYPRES (Wösten et al., 1999) were used to calculate the van Genuchten soil-water retention parameters ( $\theta_r$ ,  $\theta_s$ ,  $\alpha$  and  $n$ ) and the saturated hydraulic conductivities ( $K_{\text{sat}}$ ) (Table 1). The soil characteristics of the macropore region, such as the water content corresponding to the boundary soil water pressure head between micropores and macropores ( $\theta_b$ ), the boundary hydraulic conductivity ( $K_b$ ), the parameter controlling the exchange of both water and solute between the micropore and macropore flows (ASCALE), and the pore size distribution index in the macropores (ZN), were estimated using the pedotransfer functions included in MACRO 5.2 (Moeys et al., 2012). The boundary soil water pressure head between micropores and macropores was set to MACRO default value (CTEN = 10 cm) (Table 1).

**Table 2**

Crop input parameters for winter wheat in unamended control (S)/SMS-amended (S + SMS)/GC-amended (S + GC) soils. COVMAX: Maximum areal coverage of the canopy (for PRZM model), LAI: Leaf area index.

Date	Crop development	COVMAX (%) <sup>a</sup>	LAI (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> ) <sup>b</sup>	Root depth (m) <sup>a</sup>	Root distribution <sup>a,c</sup>	Crop height (m) <sup>a</sup>
14 November 2016	Sowing					
3 December 2016	Emergence		0.00	0.01/0.01/0.01		0.01/0.01/0.01
5 May 2017	Flowering	10/75/20	0.30/2.25/0.60	0.21/0.21/0.21	0.90/0.90/0.90	0.55/0.65/0.65
3 July 2017	Harvest		0.30/2.25/0.60	0.21/0.21/0.21		0.55/0.65/0.65
2 November 2017	Sowing					
23 November 2017	Emergence		0.00	0.00/0.01/0.01		0.00/0.01/0.01
30 April 2018	Flowering	0/75/50	0.00/2.25/1.50	0.00/0.21/0.21	0.00/0.90/0.90	0.00/0.67/0.67
24 July 2018	Harvest		0.00/2.25/1.50	0.00/0.21/0.21		0.00/0.67/0.67

<sup>a</sup> Determined from field measurements or observations.<sup>b</sup> Data estimated from COVMAX (–) = LAI / 3 for MACRO (Kroes et al., 2008).<sup>c</sup> Fraction of root density in the uppermost 25% of the root depth for MACRO.

Crop parameters including emergence, flowering and harvest dates, maximum height and rooting depth of the wheat plants, root distribution and the maximum soil cover fraction (COVMAX in PRZM) corresponded to field site observations and relied on expert judgement (Table 2). The wheat maximum leaf area index (LAI) was estimated from the observed maximum soil cover fraction according to  $COVMAX = LAI / 3$  (Kroes et al., 2008).

Sorption coefficients ( $K_d$ ) of chlorotoluron and flufenacet in the control and amended soil profiles, their topsoil half-lives ( $DT_{50}$ ) and the effect of temperature on herbicides degradation rate ( $Q_{10}$  in PRZM and TRESP in MACRO) were obtained from laboratory experiments on soil samples taken *in situ* at the beginning of the field experiment (Table 3) (Marín-Benito et al., 2019). However, in some cases a calibration step was done for  $DT_{50}$  and/or  $K_d$  to improve the goodness-of-fit statistics of the models (see Section 3.1). The variation of  $DT_{50}$  with depth was calculated according to the recommendations of FOCUS (2000). The dispersivity (DV for MACRO) and the hydrodynamic dispersion (DISP for PRZM) coefficients for each soil treatment were fitted manually from the observed  $Br^-$  concentrations in the corresponding soil profiles over the calibration period (29 November 2016–12

November 2017) (Table 3) (see Section 3.1). The crop uptake factor was set to zero for both herbicides, and to 0.5 for the non-sorbed  $Br^-$  tracer (FOCUS, 2000).

Topsoil temperature and soil moisture monitored at the beginning of the experiment along the soil profiles were used as initial conditions for the simulations. Soil temperature in deep soil layers was assumed to be 1 °C below those observed on the topsoil (Marín-Benito et al., 2014b). For MACRO, a constant hydraulic gradient equal to 1 was assumed as bottom boundary condition.

Climatic data (rainfall, maximum, minimum and average air temperature) were daily monitored using a meteorological station located at the field site. Measured daily and cumulative rainfall over the calibration and test periods are shown in Fig. S1 (Supplementary Material). Solar radiation, evapotranspiration and wind speed data were obtained from the station of Matabacan airport (23 km away from Muñovela farm). Both meteorological stations are operated by the AEMET (Spanish Agency of Meteorology).

### 2.5. Evaluation of models performance

The performance of the models was evaluated by calculating four statistical indices: the efficiency ( $EF$ ), the coefficient of residual mass ( $CRM$ ), the Pearson correlation coefficient ( $r$ ), and the root mean square error ( $RMSE$ ) (Smith et al., 1996).

$$EF = 1 - \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (S_i - O_i)^2}{\sum_{i=1}^n (O_i - O_m)^2} \right] \quad (1)$$

$$CRM = \left( \frac{\sum_{i=1}^n O_i - \sum_{i=1}^n S_i}{\sum_{i=1}^n O_i} \right) \quad (2)$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (O_i - O_m) \times (S_i - S_m)}{\left[ \sum_{i=1}^n (O_i - O_m)^2 \right]^{1/2} \times \left[ \sum_{i=1}^n (S_i - S_m)^2 \right]^{1/2}} \quad (3)$$

$$RMSE = (100/O_m) \left[ \sum_{i=1}^n (S_i - O_i)^2 / n \right]^{1/2} \quad (4)$$

where  $O_i$  and  $S_i$  are the observed and simulated values, respectively,  $O_m$  and  $S_m$  are the mean observed and simulated values, respectively, and  $n$  is the number of data. The optimum value of  $EF$  and  $r$  is +1, and that of  $RMSE$  and  $CRM$  is zero. If  $CRM > 0$  ( $< 0$ ), then there is an under(over)estimation of observed values.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Models calibration

The models calibration was done in two steps. First, the coefficients describing the dispersive characteristics (DV and DISP) of the soils were manually fitted from the observed  $Br^-$  concentrations over the calibration period (Table 3). Previous studies have shown the key role of the dispersion coefficients on the simulation of pesticides leaching (Boesten, 2004; Marín-Benito et al., 2015). Second, once the dispersion coefficients were optimized for each soil treatment, the  $K_d$  and  $DT_{50}$  of chlorotoluron and flufenacet were calibrated to minimize the marked overestimation of their retention in the 0–10 cm soil layer as simulated by PRZM and MACRO (results not shown). This essential calibration step is consistent with the findings of Dubus et al. (2003) who showed that  $K_d$  and  $DT_{50}$  were two of the most influential parameters in predicting pesticide losses with these models. The calibration of  $K_d$  and  $DT_{50}$  was different for each soil treatment, herbicide and model. While experimental  $K_d$  and  $DT_{50}$  values of both herbicides were directly used to simulate their mobility in unamended control soil with PRZM and MACRO, both coefficients had to be calibrated in SMS- and GC-amended soils for

**Table 3**

Main herbicide input parameters used in the simulations.  $K_d$ : Sorption coefficient, nf: Freundlich exponent,  $DT_{50}$ : Degradation half-life,  $Q_{10}$ :  $Q_{10}$  factor, TRESP: Exponent in the temperature response function, DISP: Pesticide hydrodynamic solute dispersion coefficient, DV: Dispersivity, S: unamended control soil, S + SMS: Soil amended with spent mushroom substrate, S + GC: soil amended with green compost.

Parameter	Soil layer (cm)	Chlorotoluron			Flufenacet		
		S	S + SMS	S + GC	S	S + SMS	S + GC
<b>Sorption</b>							
$K_d$ (mL g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	0–10	0.773	4.773	2.563	1.038	6.340	2.909
			(1.114)	(0.783)		(1.479)	(0.889)
	11–30	0.873	0.747	1.655	1.118	1.092	1.180
			(0.336)	(0.855)		(0.492)	(0.610)
	31–55	0.419	0.419	0.419	0.316	0.316	0.316
	56–90	0.155	0.155	0.155	0.077	0.077	0.077
	91–160	0.105	0.105	0.105	0.073	0.073	0.073
$n_f$ <sup>b</sup>	0–10	0.83	0.92	0.92	0.85	0.99	0.80
	11–30	0.83	0.92	0.92	0.85	0.99	0.80
<b>Degradation</b>							
$DT_{50}$ (days)	0–10 <sup>c</sup>	38.6	51.3	67.6	49.3	93.9	91.7
			(10.3)	(16.9)		(18.8)	(22.9)
	11–30	38.6	51.3	67.6	49.3	93.9	91.7
			(10.3)	(16.9)		(18.8)	(22.9)
	31–55	77.2	102.6	135.2	98.6	187.8	183.4
		(20.5)	(33.8)		(37.6)	(45.9)	
	56–100	128.7	171.0	225.3	164.3	313.0	305.7
			(34.2)	(56.3)		(62.6)	(76.4)
	101–160 <sup>d</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$Q_{10}$ <sup>e</sup>		2.3	1.9	2.8	2.3	2.3	2.5
TRESP		0.083	0.064	0.103	0.083	0.083	0.092
(K <sup>-1</sup> ) <sup>f</sup>							
<b>Other characteristics</b>							
DISP (cm <sup>2</sup> day <sup>-1</sup> ) <sup>g</sup>		2.5	2	2.5	2.5	2	2.5
DV (cm) <sup>g</sup>		10	12	10	10	12	10

<sup>a</sup> From laboratory experiments with control and amended soil samples taken *in situ* (Carpio et al., 2020). Values in brackets correspond to calibrated values for PRZM and/or MACRO models (see Section 3.1).

<sup>b</sup> Freundlich exponents from laboratory experiments with the unamended control S, and amended with SMS- and GC soils at laboratory scale (García-Delgado et al., 2020). The  $n_f$  values as determined in the top 30 cm of S were used for S, S + SMS and S + GC in 31–160 cm depth.

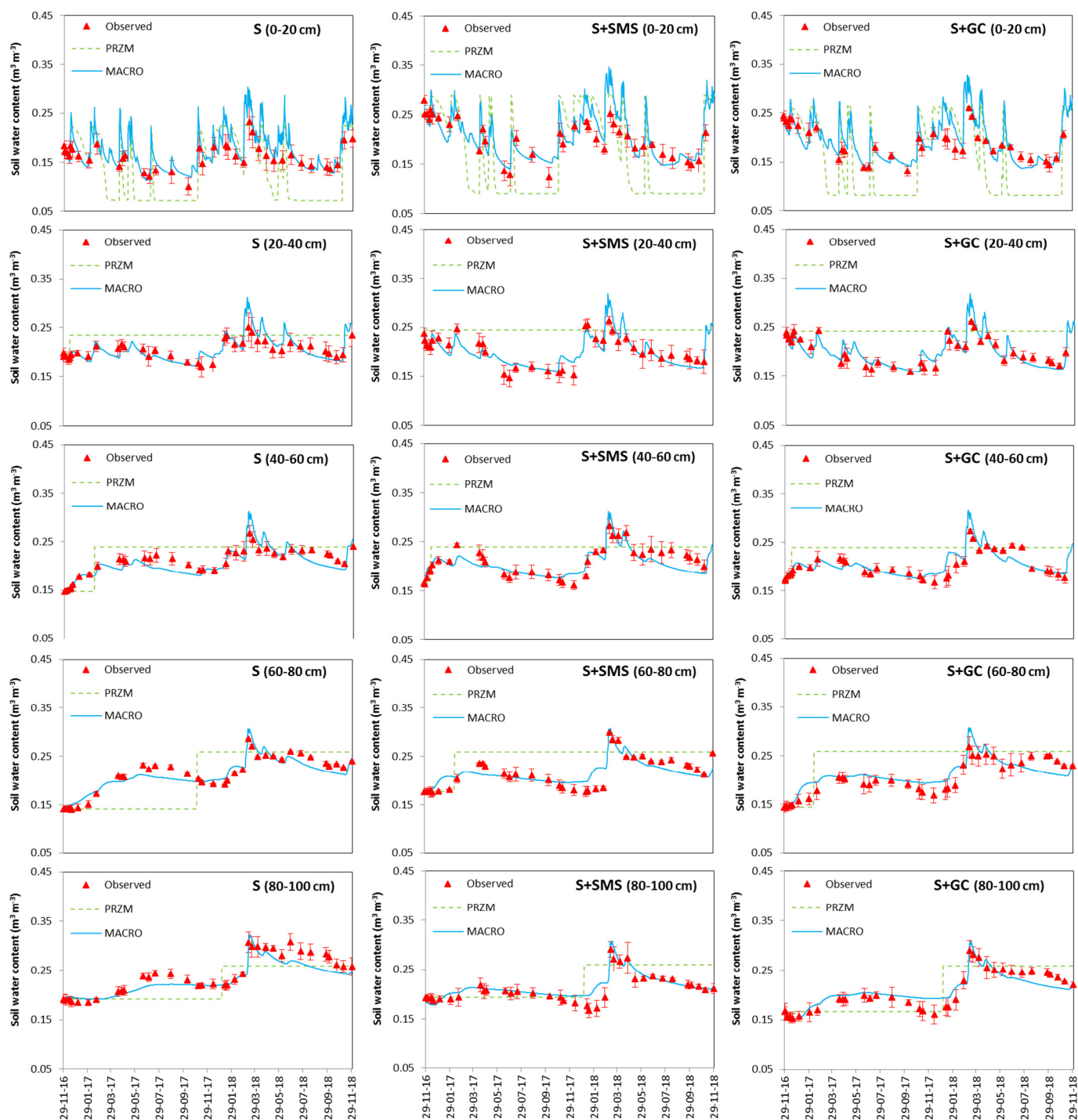
<sup>c</sup> From laboratory experiments with unamended control and amended soil samples taken *in situ* at 6 °C and 40% of the maximum soil water holding capacity (Marín-Benito et al., 2019). Variation of the degradation rate  $k$  ( $k$  (d<sup>-1</sup>) =  $\ln(2) / DT_{50}$ ) with depth:  $k$  for 0–30 cm,  $k \times 0.5$  for 30–60 cm,  $k \times 0.3$  for 60–100 cm,  $k = 0$  for >100 cm (FOCUS, 2000). Values in brackets correspond to calibrated values for PRZM model.

<sup>d</sup> n.d. = no degradation.

<sup>e</sup> From Marín-Benito et al. (2019).

<sup>f</sup> Estimated from TRESP =  $(\ln Q_{10}) / 10$ .

<sup>g</sup> Fitted manually from the observed  $Br^-$  concentrations.



**Fig. 1.** Observed and simulated soil water contents in 0–20, 20–40, 40–60, 60–80 and 80–100 cm soil layers of the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils over the whole experimental period (29 November 2016 to 30 November 2018). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n = 3$ ).

PRZM modelling. For MACRO simulations, only the experimental  $K_d$  values of chlorotoluron, as determined on the amended soils, were calibrated.

The calibration of  $K_d$  and  $DT_{50}$  was carried out considering that the dissolved organic carbon (DOC) of the SMS and GC amendments decreased the effective sorption of the herbicides on the soil, enhancing their bioavailability for degradation and their transport along the amended soil profiles (Barriso et al., 2011; Briceño et al., 2008; Carpio et al., 2020; Marín-Benito et al., 2014a). Quantitatively, the calibration was done from the “DOC of SMS- or GC-amended soil/DOC of unamended soil” ratio at the first application date of the herbicides

(Table 3). This calibration assumes that the role of the soil endogenous OC in chlorotoluron and flufenacet sorption was small compared to that of the DOC (Carpio et al., 2020). However, it should be noted that this assumption is right for soils with low endogenous OC contents like ours (Table 1) while it should be tested for soils with higher native OC contents. Jarvis et al. (2000) also severely underpredicted the field dissipation of bentazone herbicide in a soil amended with pig slurry and green manure from yellow mustard, using parameterization based on laboratory measurements of degradation. This discrepancy can be explained by (i) different microbial activity in the laboratory degradation experiments compared to that of the undisturbed population activity in the

**Table 4**

Goodness-of-fit statistics for PRZM and MACRO modelling of the soil water content ( $\theta$ ), and vertical distribution of Br<sup>-</sup>, chlorotoluron and flufenacet in unamended control (S), SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soil profiles for the whole simulated period (29 November 2016 to 30 November 2018). EF: Efficiency, CRM: Coefficient of residual mass, r: Pearson correlation coefficient, RMSE: Root mean square error.

	PRZM				MACRO			
	EF (-)	CRM (-)	r (-)	RMSE (%)	EF (-)	CRM (-)	r (-)	RMSE (%)
S								
$\theta$	0.18	0.00	0.74	17.9	0.84	0.00	0.92	8.04
Br <sup>-</sup>	0.92	0.03	0.96	55.1	0.90	0.26	0.96	61.5
Chlorotoluron	0.78	-0.38	0.91	126	0.91	0.19	0.96	80.4
Flufenacet	0.82	-0.27	0.93	108	0.85	0.28	0.93	99.4
S + SMS								
$\theta$	-0.93	-0.09	0.54	22.0	0.67	-0.02	0.85	9.07
Br <sup>-</sup>	0.94	0.00	0.97	54.6	0.91	-0.07	0.96	66.0
Chlorotoluron	0.85	-0.07	0.93	127	0.86	-0.05	0.93	126
Flufenacet	0.88	0.06	0.94	95.2	0.94	0.07	0.97	69.4
S + GC								
$\theta$	-0.74	-0.08	0.62	22.3	0.71	-0.02	0.87	9.14
Br <sup>-</sup>	0.92	-0.05	0.96	60.7	0.91	-0.25	0.97	64.9
Chlorotoluron	0.85	-0.20	0.92	129	0.88	-0.05	0.94	116
Flufenacet	0.83	0.03	0.91	114	0.96	0.08	0.98	58.6

field, (ii) significant herbicide dissipation pathways in the field that are not observed under laboratory conditions and are not included in the model code. But it has to be underlined that they did not calibrate the DT<sub>50</sub> from DOC. On the other hand, Vereecken et al. (2011) concluded that K<sub>d</sub> values from laboratory batch experiments are not representative of the field conditions. These results corroborate the need to calibrate K<sub>d</sub> and DT<sub>50</sub>, when they are measured in laboratory, to model field conditions.

### 3.2. Modelling of soil water content in soil profiles

Over the whole experiment, the addition of organic residues was found to increase the soil water holding capacity in the 0–20 cm soil layer, following the order S < S + GC < S + SMS (Table 1; Fig. 1). The higher soil moisture together with the higher OC content of amended soils led to higher soil fertility and, consequently, to higher crop-growing performance (Table 2). As a result, water and solute dynamics in the amended soil profiles below 20 cm depth were modified compared to those observed in the unamended control plots (Carpio et al., 2020) (Fig. 1). The increased fertility and capacity of amended soils to retain water has been often cited as some of the great benefits of this agricultural practice (García Izquierdo and Lobo Bedmar, 2008).

In any case, *i.e.* amended and unamended soils, MACRO successfully simulated the observed soil water contents at the five different soil depths for the whole simulated period (29 November 2016–30 November 2018), as shown by the high values of r (0.85 to 0.92) and EF (0.67 to 0.84), and the low values of RMSE (<9.14) and CRM (-0.02 to 0.00) (Table 4). According to Ritter and Muñoz-Carpena (2013), the performance of a model is unsatisfactory if EF < 0.65, acceptable if 0.65 < EF < 0.80, good if 0.80 < EF < 0.90, or very good if EF ≥ 0.90. Therefore, the performance of MACRO to simulate the soil water content can be denoted as acceptable for S + SMS and S + GC, and good for unamended soil S. On the contrary, PRZM did not predict satisfactorily the water dynamics along the soil profiles. The best simulation results were obtained in the wheat root influence zone (0–20 cm) for the three soil treatments (Fig. 1). At this depth, the observed fluctuations of soil moisture linked to precipitation events were well described by the model. However, in the absence of rainfall, PRZM overestimated the evapotranspiration, and the simulated soil water content corresponded to the wilting point (Fig. 1; Fig. S1). Below 20 cm depth, PRZM predicted that the water contents of control and amended soils were most of the time at field capacity. Indeed, there is no sink for water under the maximum

root depth (21 cm), and consequently PRZM simulated soil moistures at field capacity once it was reached. Nevertheless, the values of some statistical indexes were acceptable (Table 4), probably because of compensation between PRZM underestimation and overestimation of the observations as a function of the depth and/or of the period. The inability of capacity models such as PRZM to represent the soil moisture with an acceptable goodness-of-fit has often been observed (Gottesbüren et al., 2000; Marín-Benito et al., 2014b; Vancloster and Boesten, 2000). Due to these differences between soil water content observations and simulations, and to the influence of soil moisture content on the herbicide degradation rate, PRZM might not be able to simulate herbicide leaching.

### 3.3. Modelling of bromide distribution in control and amended soil profiles

Following dispersion coefficients fitting, the ability of the models to simulate the Br<sup>-</sup> behavior (peak concentrations and maximum depths reached by the tracer) was very good (Ritter and Muñoz-Carpena, 2013), and similar for the three soils treatments as showed by the narrow ranges of variation of each statistical index (0.96 < r < 0.97, 0.90 < EF < 0.94, 54.6 < RMSE < 66.0) (Figs. 2 and 3; Figs. S2 and S3; Table 4). The main difference between the simulation results of the different treatments is that PRZM and MACRO underestimated (CRM > 0) the observed Br<sup>-</sup> concentrations in the unamended soil profile while these concentrations were, in general, overestimated (CRM ≤ 0) in S + SMS and S + GC profiles. For the three treatments, the leached amounts of Br<sup>-</sup> followed the rainfall regimes (Figs. 2 and 3; Figs. S1 to S3): low Br<sup>-</sup> amounts (<1.0 to 2.6% of the amount applied) leached down to 100 cm depth over the first period (273.2 mm of cumulated precipitation) while high amounts (from 16 to 20%) of Br<sup>-</sup> did so over the second period (525.4 mm, 2.5 times that of the first period) (Carpio et al., 2020) (Figs. S1 to S3).

The fitted dispersivity (DV for MACRO) and hydrodynamic dispersion (DISP for PRZM) values were similar for unamended soil and S + GC treatments, but different than those obtained for S + SMS (Table 3). This can be due to different soil saturation degrees as simulated by PRZM and MACRO in S + SMS compared to unamended and S + GC soils. The DV value fitted for unamended soil is in agreement with the dispersivity values reviewed for coarse-textured soils under field conditions by Vanderborght and Vereecken (2007). Regarding amended soil, Chalhoub et al. (2013) estimated larger dispersivity values for a control bare soil than for a soil amended with urban wastes composts of different nature under field conditions. However, in undisturbed silt loam soil columns, Pot et al. (2011) found no statistically significant effect of compost application on solute hydrodynamic dispersion, which agrees with our results despite they were obtained in field conditions. Finally, though Vanderborght and Vereecken (2007) observed that dispersion coefficients strongly depend on soil saturation conditions (there are larger dispersivities for saturated than for unsaturated flow conditions), the resulting DV and DISP calibrated values can be considered optimum for simulations under both wet and dry climatic conditions as those recorded in our field experiment.

### 3.4. Modelling of herbicides distribution in control and amended soil profiles

By increasing the soil OC content, the addition of SMS and GC amendments enhanced the herbicides sorption in the top 20 cm and decreased their downward mobility, which was also favoured by the increase in the soil water retention (see Section 3.2) (Figs. 4 to 7; Figs. S4 to S7). This effect was mainly observed for flufenacet, the most hydrophobic herbicide, whose mobility was slower than that of chlorotoluron. A high mobility of chlorotoluron through the three soil profiles was observed after the first application: the herbicide was detected in the whole control, SMS- and GC-amended soil profiles 33 days after its application because of the rainfall events occurring shortly after the application (Carpio

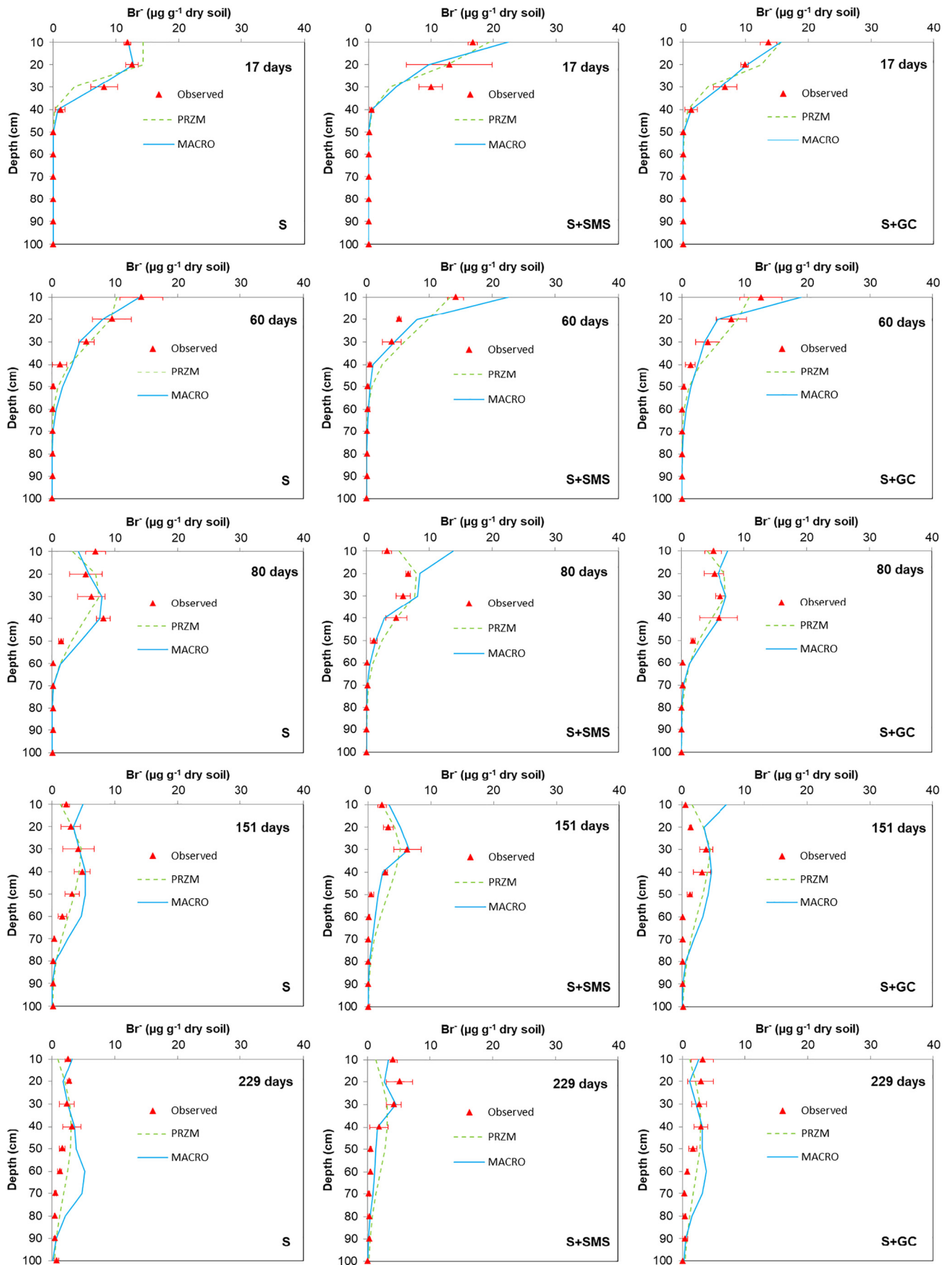


Fig. 2. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils profiles of bromide ( $\text{Br}^-$ ) at selected sampling times after the first bromide application (calibration period: 29 November 2016 to 12 November 2017). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n = 3$ ).

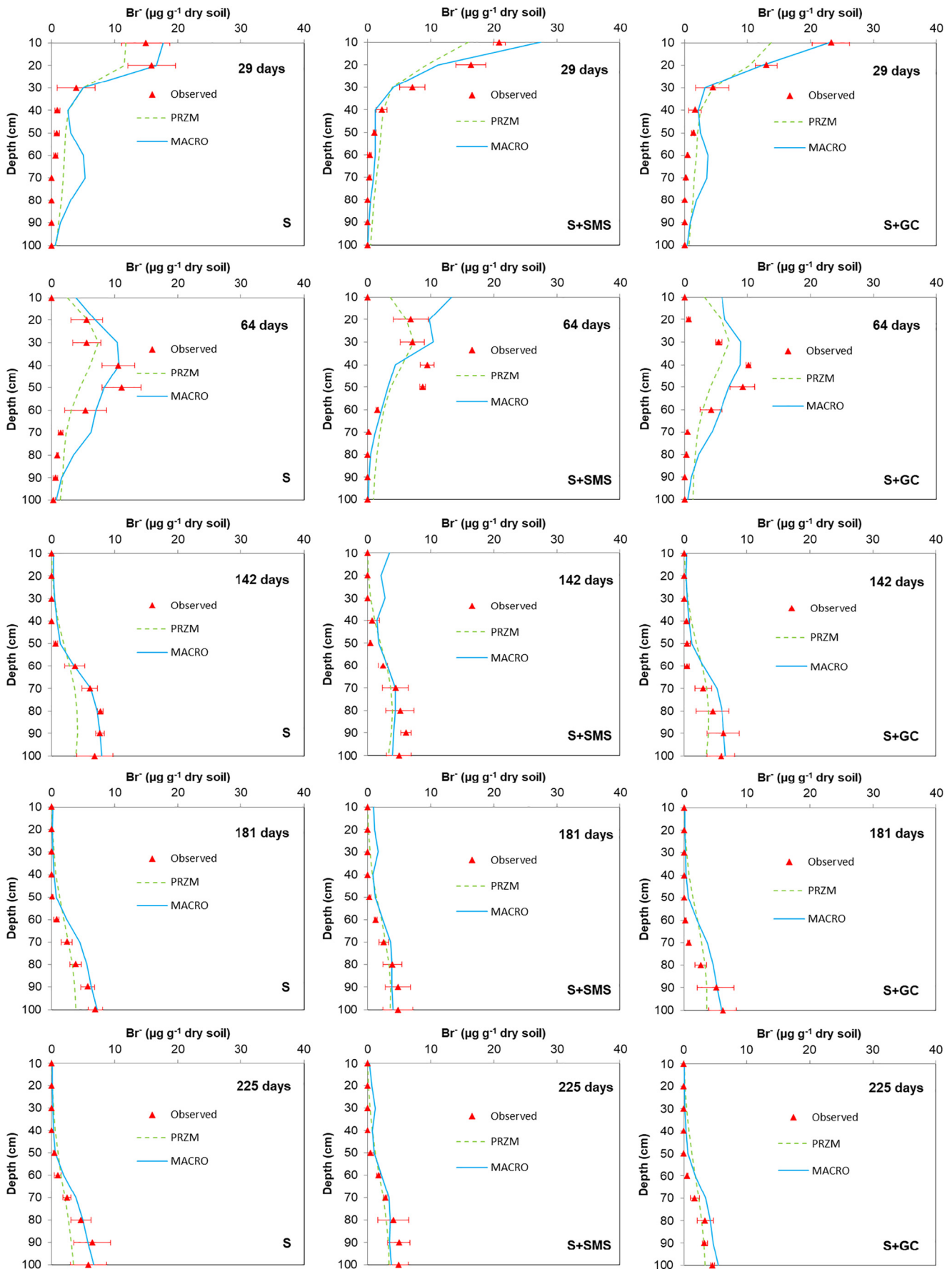


Fig. 3. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils profiles of bromide ( $\text{Br}^-$ ) at selected sampling times after the second bromide application (test period: 13 November 2017 to 30 November 2018). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n = 3$ ).

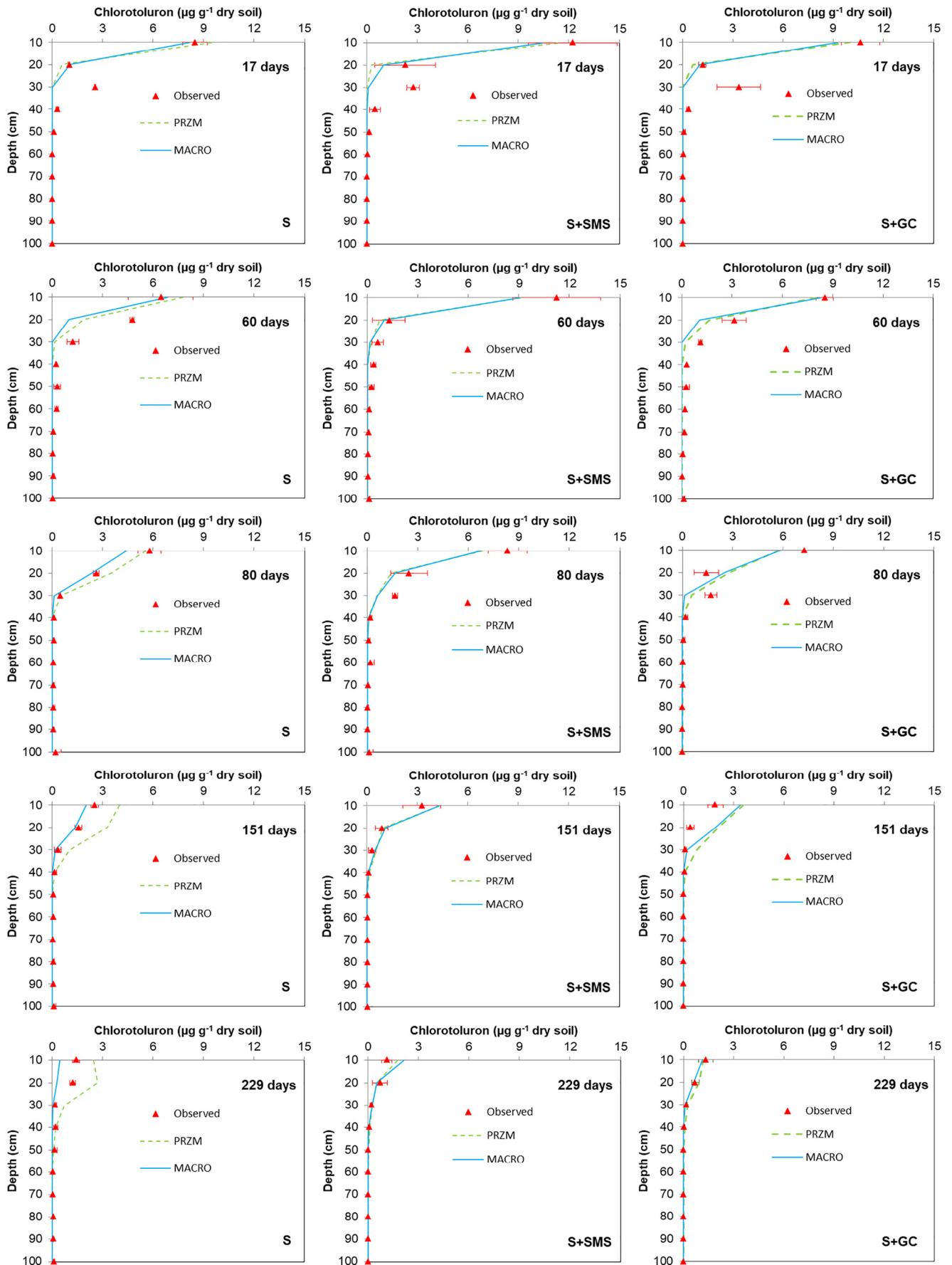


Fig. 4. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils profiles of chlorotoluron at selected sampling times after the first herbicide application (calibration period: 29 November 2016 to 12 November 2017). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n = 3$ ).

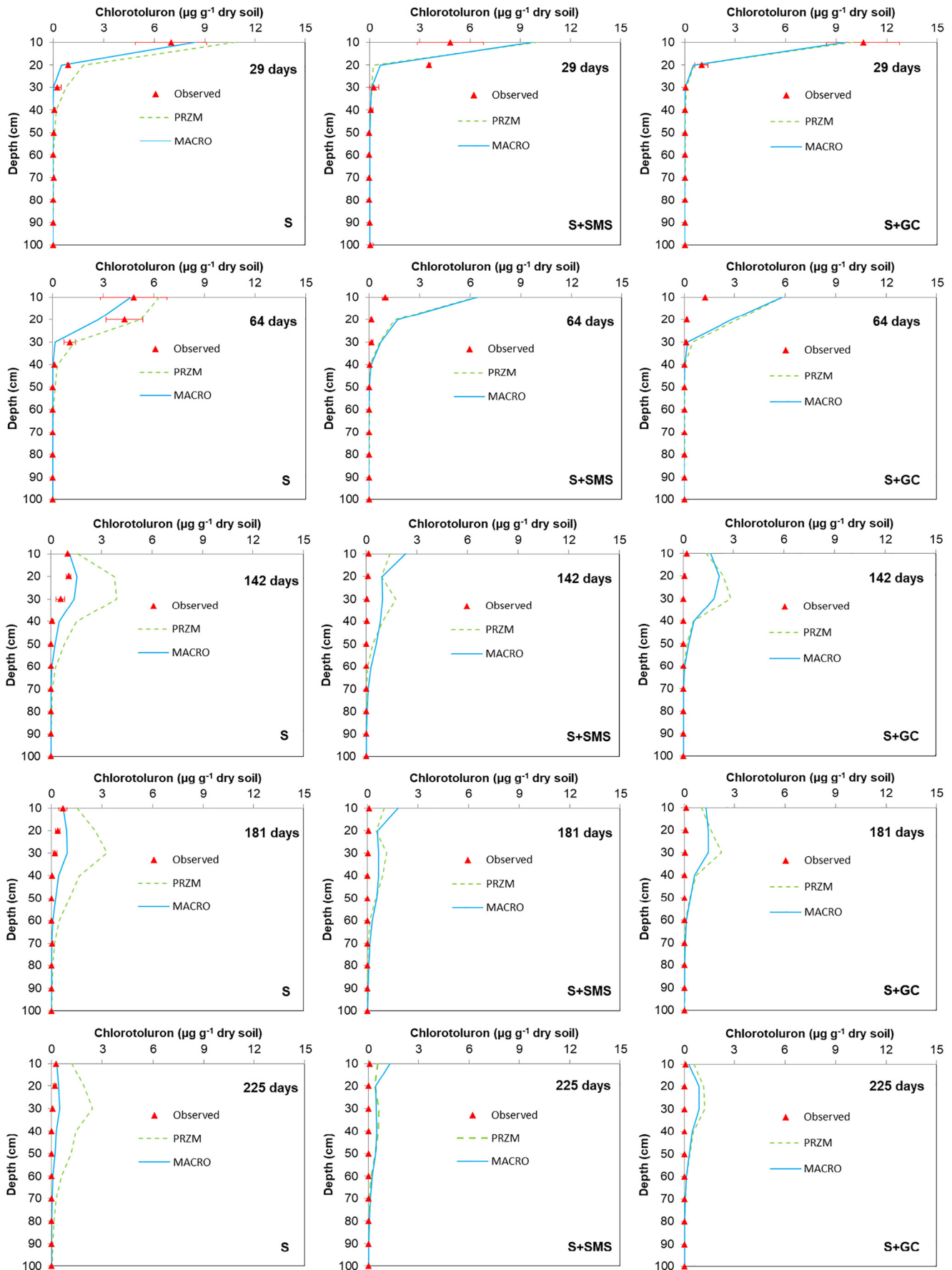
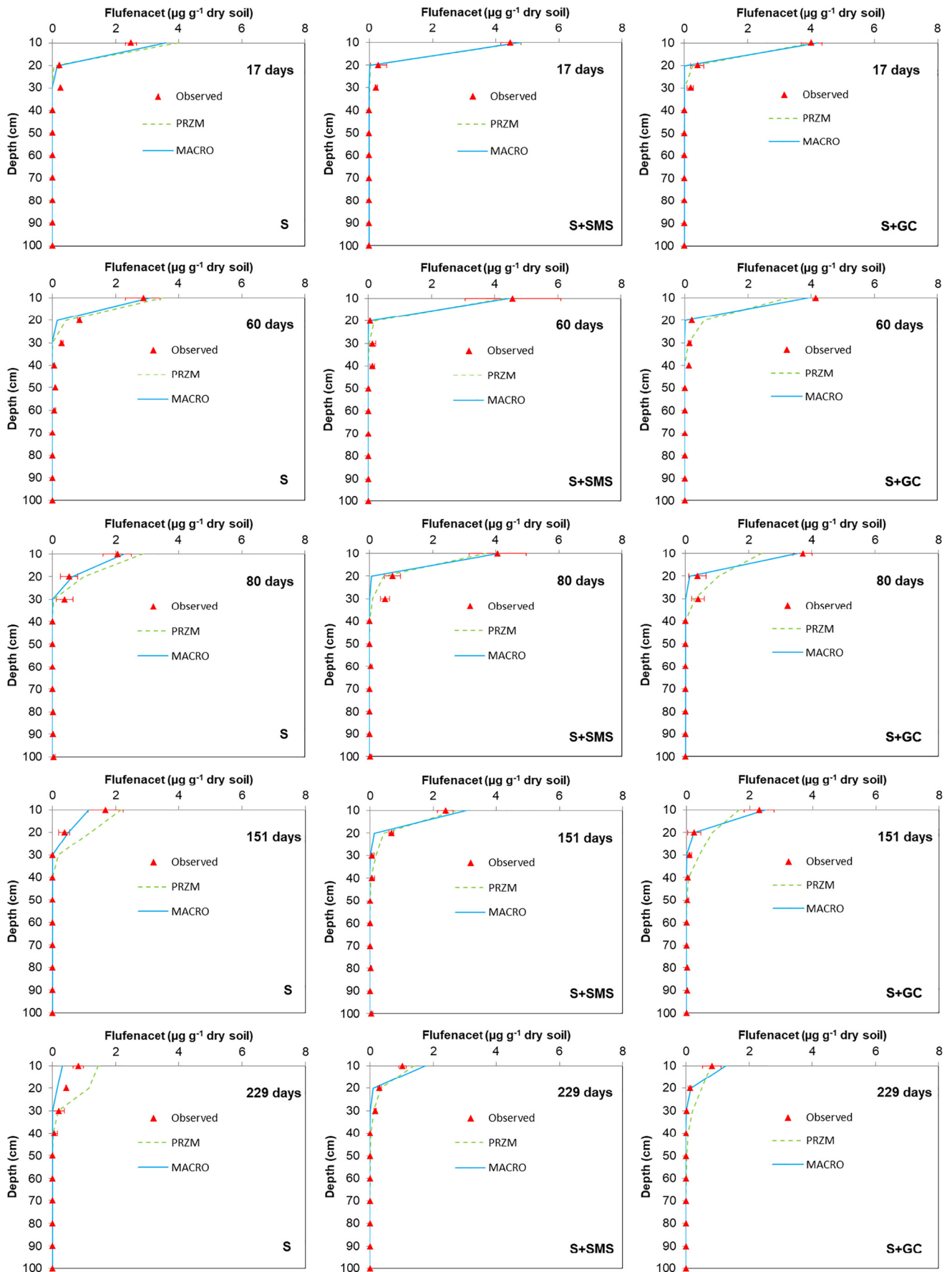


Fig. 5. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils profiles of chlorotoluron at selected sampling times after the second herbicide application (test period: 13 November 2017 to 30 November 2018). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n = 3$ ).





**Fig. 6.** Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils profiles of flufenacet at selected sampling times after the first herbicide application (calibration period: 29 November 2016 to 12 November 2017). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated (n = 3).

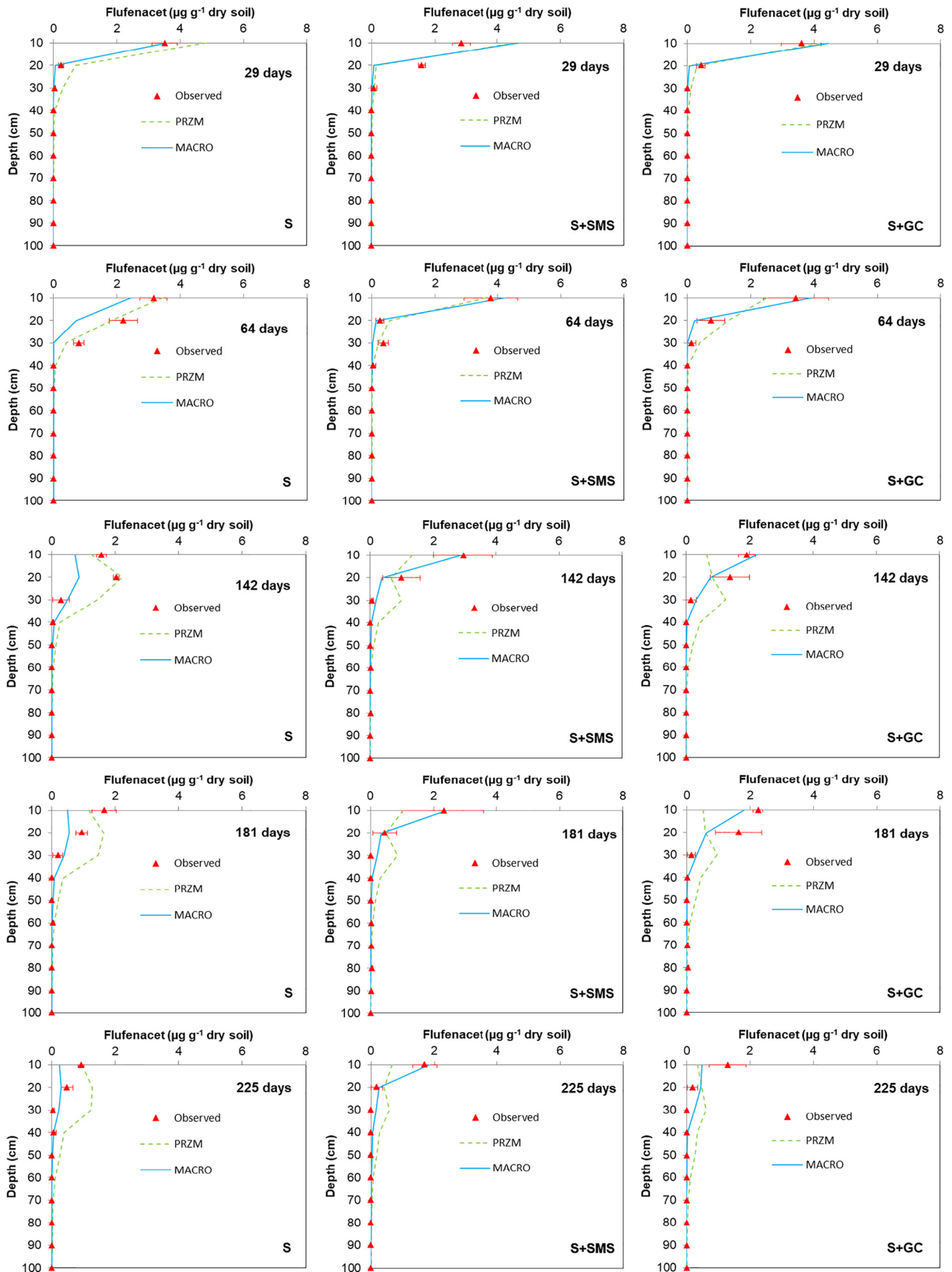


Fig. 7. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils profiles of flufenacet at selected sampling times after the second herbicide application (test period: 13 November 2017 to 30 November 2018). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated (n = 3).

et al., 2020) (Fig. S1a and S4). On the contrary, flufenacet needed 33, 80 and 151 days to reach the 90–100 cm soil layer in S + SMS, control and S + GC soils, respectively. The amounts of chlorotoluron ( $\approx 1.0$  to 2.0%) and flufenacet ( $< 1.0$  to 1.3%) that leached down to a depth of 90–100 cm in the three treatments over the first experimental period were higher than those observed in the second period. In this second period, only residual amounts of both herbicides ( $< 1.0\%$ ) reached 100 cm depth in the treatment with the highest DOC content, S + SMS, that would have enhanced the transport of chlorotoluron and flufenacet to this depth 29 and 127 days after the second application, respectively (Carpio et al., 2020). In control soil and S + GC, chlorotoluron reached maximum depths of 70 cm and 30 cm, respectively, and no flufenacet was detected below 60 cm and 80 cm, respectively. This behavior might be unexpected as higher rainfall was recorded during the second period of experimentation than in the first one (Fig. S1). However, it indicates that the rainfall events which occurred shortly after the first herbicide applications played a more important role in their high mobility than the high total amounts of rainfall recorded over the second period of experimentation (Willkommen et al., 2019).

Once the degradation and/or sorption coefficients were calibrated, the two models reproduced satisfactorily the observed mobility of both herbicides through the three soil profiles over the whole simulation period (Table 4, Figs. 4–7 and S4–S7). As indicated above, this shows that DOC drives the movement of pesticides (Barriuso et al., 2011; Briceño et al., 2008; Carpio et al., 2020; Marín-Benito et al., 2014a). Nevertheless, MACRO simulated the vertical distribution of chlorotoluron and flufenacet better than PRZM (Table 4). The correspondence between observations and PRZM simulations was acceptable for both herbicides ( $0.78 < EF_{\text{Chlorotoluron}} < 0.85$ ,  $0.82 < EF_{\text{Flufenacet}} < 0.88$ ) while it was good and very good for MACRO ( $0.86 < EF_{\text{Chlorotoluron}} < 0.91$ ,  $0.85 < EF_{\text{Flufenacet}} < 0.96$ ) (Ritter and Muñoz-Carpena, 2013). The lowest performance of PRZM to reproduce the herbicides mobility agrees with its poor simulations of the water dynamics, especially in the amended soil profiles (Table 4, Fig. 1). It is important to highlight that the experimental  $DT_{50}$  values of the herbicides in the amended soils, which depends on the soil moisture, had to be calibrated only for PRZM (Table 3). Marín-Benito et al. (2014b) also obtained a better fit of the dynamics of other herbicides with models based on the Richards equation (MACRO and PEARL) than with the PRZM capacity model.

The results also showed that the EF of both models for herbicides concentrations decreased over the test period compared to the calibration one. This decrease in EF was higher for PRZM than for MACRO: from 0.90–0.98 to 0.51–0.88, and from 0.90–0.99 to 0.54–0.93, respectively (data not shown). It was more outstanding for chlorotoluron than for flufenacet, and especially in the S + SMS treatment. This is in agreement with the highest DOC content in S + SMS (Table 1), and with the high influence of this parameter on the mobility of the less hydrophobic herbicide chlorotoluron (Carpio et al., 2020) that could not have been perfectly taken into account through the calibration step. In a previous modelling study with PRZM, including two SMS with different DOC contents and two fungicides with very different hydrophobicities, Marín-Benito et al. (2015) also determined the lowest EF values for the less hydrophobic fungicide in the soil which was the richest one in DOC. The decrease in EF could result from the variation of pesticide sorption in amended soils with the natural decay of soil OM load by mineralization (Marín-Benito et al., 2012). However, in our study, the variation of OC contents in the amended topsoils over time was negligible (Carpio et al., 2020), and consequently it was not taken into account in models parameterization.

According to the CRM values (Table 4), MACRO underestimated (CRM > 0) the observed concentrations of the two herbicides in the unamended soil profile while PRZM overestimated them (CRM < 0). In the amended soils, both models overestimated chlorotoluron concentrations whereas those of flufenacet were underestimated. The overestimation of the vertical distribution of chlorotoluron in the S + SMS and S + GC profiles as simulated by both models was mainly marked in the test period when the highest DOC contents in the amended soil

profiles were observed (Fig. 5 and S5) (Carpio et al., 2020). Processes linked to the higher DOC content of amended soils and not described in PRZM and MACRO could have facilitated the bioavailability of chlorotoluron in solution to be mineralized (EC, 2005) and/or degraded by soil microorganisms. Among these processes, the formation of herbicide-DOC mobile complexes has been observed for chlorotoluron and other phenylurea herbicides in presence of high DOC amounts (Song et al., 2008; Thevenot et al., 2009). The limits underlined here are some of the well-known limits affecting pesticide leaching models, as shown at field and laboratory scales (Mamy et al., 2008; Marín-Benito et al., 2015; Thevenot and Dousset, 2015).

#### 4. Conclusions

The ability of PRZM and MACRO models to simulate the fate of chlorotoluron and flufenacet herbicides under amended soils was assessed and compared. The models were calibrated and tested based on a two-year field-scale leaching study carried out in experimental plots without amendment, and with spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC) amendments. Both models successfully predicted the vertical distribution of  $Br^-$ , chlorotoluron and flufenacet along the three soil profiles. In general, MACRO showed a higher performance than PRZM, which did not simulate satisfactorily the water dynamics. The needed calibration of  $K_d$  and  $DT_{50}$  parameters was based on the initial DOC contents of control and amended soils, because DOC is known to drive some processes that modify the behavior of pesticides (e.g. formation of herbicide-DOC mobile complexes), however they are not considered in the models.

PRZM and MACRO could be successfully used as predictive tools against groundwater contamination by herbicides in amended soils, at least at a bi-annual scale, after calibrating  $DT_{50}$  and/or  $K_d$ . The results also emphasize the need of modelling the pesticide fate in amended soil scenarios in the regulatory context. However, as the calibration of pesticide parameters is not possible when these models are used for risk assessment for European pesticides registration, a module allowing to correct the  $DT_{50}$  and  $K_d$  values according to the DOC of the amended soils should be added. Finally, due to the decrease in models efficiency with simulation time (mainly for PRZM) to predict the herbicides mobility in the amended soils, they should be tested for longer periods.

This work showed that models such as PRZM and MACRO are able to simulate the fate of pesticides in amended soils, and it serves as a first step in identifying where future modelling efforts might most profitably be directed. In this sense, further modelling studies should focus on other pedoclimatic and pesticide-organic residues combinations, and for longer time periods. Then, the models will help to optimize the application rates of organic wastes to avoid water pollution.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by MINECO/FEDER UE (Project AGL2015-69485-R) and MCIU/AEI/FEDER, UE (Project RTI2018-101587-J-I00). M. J. Carpio thanks for her predoctoral contract co-funded by European Social Fund (ESF) and the Consejería de Educación (Junta de Castilla y León Government). J.M. Marín-Benito thanks MINECO for his Juan de la Cierva-Incorporación (IJCI-2014-19538) contract.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137019>.

## References

- 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.
- Boesten, J.J.T.I., 2004. Influence of dispersion length on leaching calculated with PEARL, PELMO and PRZM for FOCUS groundwater scenarios. *Pest Manag. Sci.* 60, 971–980.
- Boesten, J.J.T.I., 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. *Agric. Water Manag.* 44, 21–42.
- Briceño, G., Demanet, R., Mora, M.D., Palma, G., 2008. Effect of liquid cow manure on andisol properties and atrazine adsorption. *J. Environ. Qual.* 37, 1519–1526.
- Carpio, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., García-Delgado, C., Sánchez-Martín, M.J., Marín-Benito, J.M., 2020. Mobility monitoring of two herbicides in amended soils: a field study for modeling applications. *J. Environ. Manag.* 260, 110161. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110161> (In Press).
- Carsel, R., Imhoff, J., Hummel, P., Cheplick, J., Donigan, A., Suarez, L., 2005. PRZM-3, a Model for Predicting Pesticide and Nitrogen Fate in the Crop Root and Unsaturated Soil Zones: User's Manual for Release 3.12.2. US Environ. Prot. Agency (EPA) (420 pp).
- Chalhou, M., Coquet, Y., Vachier, P., 2013. Water and bromide dynamics in a soil amended with different urban composts. *Vadose Zone J.* 12.
- Chen, Y., Camps-Arbestain, M., Shen, Q., Singh, B., Cayuela, M.L., 2018. The long-term role of organic amendments in building soil nutrient fertility: a meta-analysis and review. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 111, 103–125.
- Dubus, I.G., Brown, C.D., Beulke, S., 2003. Sensitivity analyses for four pesticide leaching models. *Pest Manag. Sci.* 59, 962–982.
- EC (European Commission. Directorate-General Health & Consumer Protection), 2005. Review Report for the Active Substance Chlorotoluron (54 pp.).
- Filipović, V., Coquet, Y., Pot, V., Houot, S., Benoit, P., 2014. Modeling the effect of soil structure on water flow and isoproturon dynamics in an agricultural field receiving repeated urban waste compost application. *Sci. Total Environ.* 499, 546–559.
- FOCUS (FOrum for Co-ordination of pesticide fate models and their Use), 2000. FOCUS Groundwater Scenarios in the EU Review of Active Substances. Report of the FOCUS Groundwater Scenarios Workgroup EC Document Reference Sanco/321/ 2000 Rev.2 (202 pp.).
- FOCUS (FOrum for Co-ordination of pesticide fate models and their Use), 2009. Assessing Potential for Movement of Active Substances and Their Metabolites to Ground Water in the EU. Report of the FOCUS Groundwater Workgroup EC Document Reference Sanco/13144/2010 Version 1 (604 pp.).
- García Izquierdo, C., Lobo Bedmar, M.C., 2008. Rehabilitación de suelos degradados y contaminados mediante la aplicación de compost. In: Moreno Casco, J., Moral Herrero, R. (Eds.), *Compostaje*. Mundi Prensa, Madrid, pp. 425–448.
- García-Delgado, C., Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2020. Organic carbon nature determines the capacity of organic amendments to adsorb pesticides in soil. *J. Hazard. Mater.*, 122162 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122162> (In press).
- Ghirardello, D., Morselli, M., Semplici, M., Di Guardo, A., 2010. A dynamic model of the fate of organic chemicals in a multilayered air/soil system: development and illustrative application. *Environ Sci Technol* 44, 9010–9017.
- Giannouli, D.D., Antonopoulos, V.Z., 2015. Evaluation of two pesticide leaching models in an irrigated field cropped with corn. *J. Environ. Manag.* 150, 508–515.
- Gottesbüren, B., Aden, K., Bärlund, I., Brown, C., Dust, M., Görlitz, G., Jarvis, N., Rekolainen, S., Schäfer, H., 2000. Comparison of pesticide leaching models: results using the Weiherbach data set. *Agric. Water Manag.* 44, 153–181.
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2011. Field-scale dissipation of tebuconazole in a vineyard soil amended with spent mushroom substrate and its potential environmental impact. *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 1480–1488.
- Houot, S., Pons, M.N., Pradel, M., Tibi, A. (coord.), Aubry, C., Augusto, L., Barbier, R., Benoit, P., Brugère, H., Caillaud, M.A., Casellas, M., Chatelet, A., Dabert, P., De Mareschal, S., Doussan, I., Etrillard, C., Fuchs, J., Génemont, S., Giamberini, L., Hélias, A., Jardé, E., Le Perchec, S., Lupton, S., Marron, N., Ménasseri, S., Mollier, A., Morel, C., Mougin, C., Nguyen, C., Parnaudeau, V., Patureau, D., Pourcher, A.M., Rychen, G., Savini, I., Smolders, E., Topp, E., Vieublé, L., Viguié, C., 2014. Valorisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire sur les sols à usage agricole ou forestier, impacts agronomiques, environnementaux, socio-économiques. Expertise scientifique collective, rapport, INRA-CNRS-Irstea (France). [<http://institut.inra.fr/Missions/Eclairer-les-decisions/Expertises/Toutes-les-actualites/Expertise-Mafor-effluents-boues-et-dechets-organiques>]. (930 pp.).
- Hughes, L., Webster, E., Mackay, D., 2008. An evaluative screening level model of the fate of organic chemicals in sludge-amended soils including organic matter degradation. *Soil Sediment Contam.* 17, 564–585.
- IUSS Working Group WRB, 2015. World Reference Base for Soil Resources 2014: International Soil Classification Systems for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps. World Soil Resources Reports No. 106. ISSN 0532-0488. FAO, Rome (181 pp.).
- Jarvis, N.J., Brown, C.D., Granitz, E., 2000. Sources of error in model predictions of pesticide leaching: a case study using the MACRO model. *Agric. Water Manag.* 44, 247–262.
- Klein, M., 1995. PELMO: Pesticide Leaching Model, User Manual V 2.01. Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, p. D57392.
- Kroes, J.G., Van Dam, J.C., Groenendijk, P., Hendriks, R.F.A., Jacobs, C.M.J., 2008. SWAP Version 3.2. Theory Description and User Manual. Alterra Report 1649, Swap32 Theory Description and User Manual (Wageningen, The Netherlands (262 pp.)).
- Larsbo, M., Jarvis, N., 2003. MACRO 5.0. A Model of Water Flow and Solute Transport in Macroporous Soil. Technical Description. Rep Emergo, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden (49 pp.).
- Leistra, M., van der Linden, A.M.A., Boesten, J.J.T.I., Tiktak, A., van den Berg, F., 2001. PEARL Model for Pesticide Behaviour and Emissions in Soil-Plant Systems: Description of the Processes. Alterra Rep 13. Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands (115 pp).
- López-Piñero, A., Peña, D., Albarrán, A., Becerra, D., Sánchez-Llerena, J., 2013. Sorption, leaching and persistence of metribuzin in Mediterranean soils amended with olive mill waste of different degrees of organic matter maturity. *J. Environ. Manag.* 122, 76–84.
- 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 Manag. Sci.* 64, 262–275.
- 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. *J. Soils Sediments* 12, 1111–1123.
- Marín-Benito, J.M., Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2014a. Effect of different organic amendments on the dissipation of linuron, diazinon and myclobutanil in an agricultural soil incubated for different time periods. *Sci. Total Environ.* 476–477, 611–621.
- Marín-Benito, J.M., Pot, V., Alletto, L., Mamy, L., Bedos, C., Barriuso, E., Benoit, P., 2014b. Comparison of three pesticide fate models with respect to the leaching of two herbicides under field conditions in an irrigated maize cropping system. *Sci. Total Environ.* 499, 533–545.
- Marín-Benito, J.M., Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Mamy, L., 2015. Modeling fungicides mobility in undisturbed vineyard soil cores unamended and amended with spent mushroom substrates. *Chemosphere* 134, 408–416.
- Marín-Benito, J.M., Barba, V., Ordax, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2018. Recycling organic residues in soils as amendments: effect on the mobility of two herbicides under different management practices. *J. Environ. Manag.* 224, 172–181.
- Marín-Benito, J.M., Carpio, M.J., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2019. Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: effect of the temperature and the organic amendments. *Sci. Total Environ.* 653, 1301–1310.
- Moeys, J., Larsbo, M., Bergström, L., Brown, C.D., Coquet, Y., Jarvis, N.J., 2012. Functional test of pedotransfer functions to predict water flow and solute transport with the dual-permeability model MACRO. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 16, 2069–2083.
- Pot, V., Benoit, P., Etievant, V., Bernet, N., Labat, C., Coquet, Y., Houot, S., 2011. Effects of tillage practice and repeated urban compost application on bromide and isoproturon transport in a loamy Albeluvisol. *Eur. J. Soil Sci.* 62, 797–810.
- PPDB, 2019. Pesticide properties data base. University of Hertfordshire, UK <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>.
- Ritter, A., Muñoz-Carpena, R., 2013. Performance evaluation of hydrological models: statistical significance for reducing subjectivity in goodness-of-fit assessments. *J. Hydrol.* 480, 33–45.
- Siimes, K., Kämäri, J., 2003. A review of available pesticide leaching models: selection of models for simulation of herbicide fate in Finnish sugar beet cultivation. *Boreal Environ. Res.* 8, 31–51.
- Šimůnek, J., Van Genuchten, M.T., Šejna, M., 2008. Development and applications of the HYDRUS and STANMOD software packages and related codes. *Vadose Zone J.* 7, 587–600.
- Smith, J., Smith, P., Addiscott, T., 1996. Quantitative methods to evaluate and compare soil organic matter (SOM) models. *NATO ASI Series* 38, 181–199.
- Song, N.H., Chen, L., Yang, H., 2008. Effect of dissolved organic matter on mobility and activation of chlorotoluron in soil and wheat. *Geoderma* 146, 344–352.
- Thevenot, M., Dousset, S., 2015. Compost effect on diuron retention and transport in structured vineyard soils. *Pedosphere* 25, 25–36.
- Thevenot, M., Dousset, S., Hertkorn, N., Schmitt-Kopplin, P., Andreux, F., 2009. Interactions of diuron with dissolved organic matter from organic amendments. *Sci. Total Environ.* 407, 4297–4302.
- Vanclouster, M., Boesten, J.J.T.I., 2000. Application of pesticide simulation models to the Vredepeel dataset. I. Water, solute and heat transport. *Agric. Water Manag.* 44, 105–117.
- Vanderborght, J., Vereecken, H., 2007. Review of dispersivities for transport modeling in soils. *Vadose Zone J.* 6, 29–52.
- Vereecken, H., Vanderborght, J., Kasteel, R., Spiteller, M., Schäfer, A., Close, M., 2011. Do lab-derived distribution coefficient values of pesticides match distribution coefficient values determined from column and field-scale experiments? A critical analysis of relevant literature. *J. Environ. Qual.* 40, 879–898.
- Willkommen, S., Pfannerstill, M., Ulrich, U., Guse, B., Fohrer, N., 2019. How weather conditions and physico-chemical properties control the leaching of flufenacet, diflufenican, and pendimethalin in a tile-drained landscape. *Agric. Ecosyst. Environ.* 278, 107–116.
- Wösten, J.H.M., Lilly, A., Nemes, A., Le Bas, C., 1999. Development and use of a database of hydraulic properties of European soils. *Geoderma* 90, 169–185.

**CAPÍTULO 3**  
**MATERIAL SUPLEMENTARIO**



## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### **Modelling herbicides mobility in amended soils: Calibration and test of PRZM and MACRO**

Jesús M. Marín-Benito <sup>a,\*</sup>, Laure Mamy <sup>b</sup>, María J. Carpio <sup>a</sup>, María J. Sánchez-Martín <sup>a</sup>,  
M. Sonia Rodríguez-Cruz <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain*

<sup>b</sup> *Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS 78850 Thiverval-Grignon, France*

\*Corresponding author at: Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain

*E-mail address:* [jesusm.marin@irnasa.csic.es](mailto:jesusm.marin@irnasa.csic.es) (Jesús M. Marín-Benito)

Number of Pages: 14

Number of Figures: 7

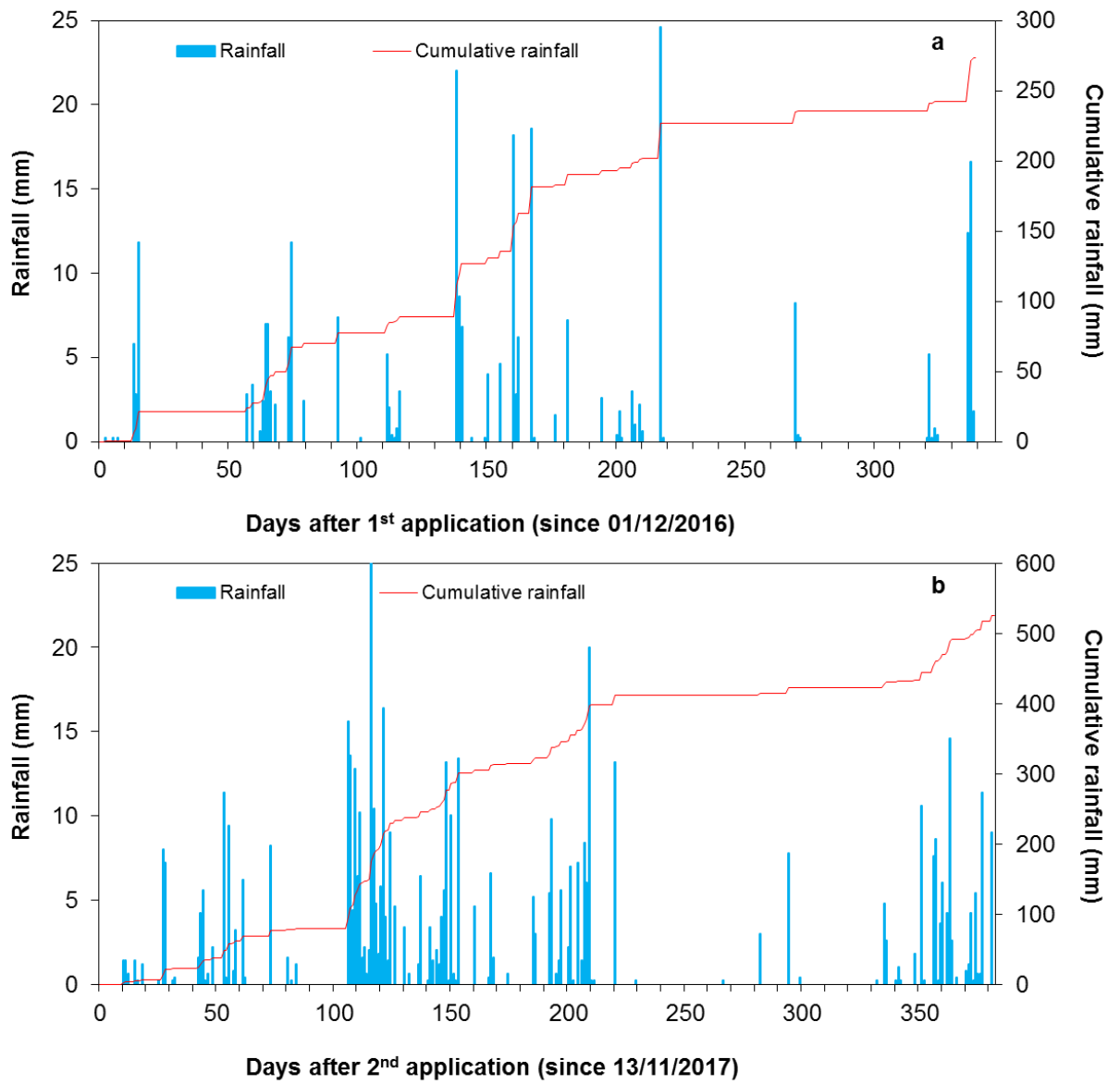


Fig. S1. Daily and cumulative rainfall measured in experimental site over (a) calibration and (b) test period.



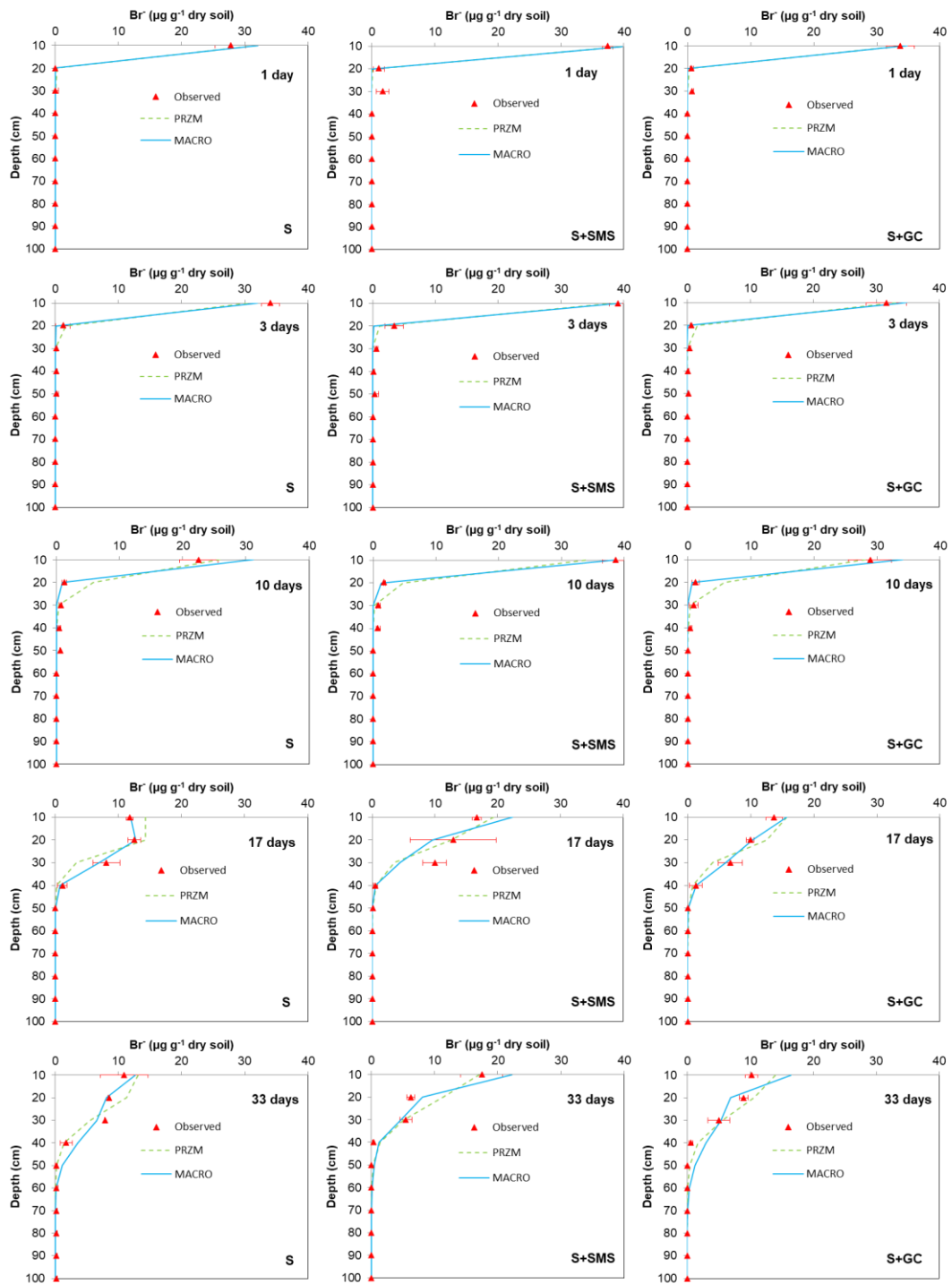


Fig. S2. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of bromide at all sampling times after the first bromide application (calibration period: 29 November 2016 to 12 November 2017). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n=3$ ).

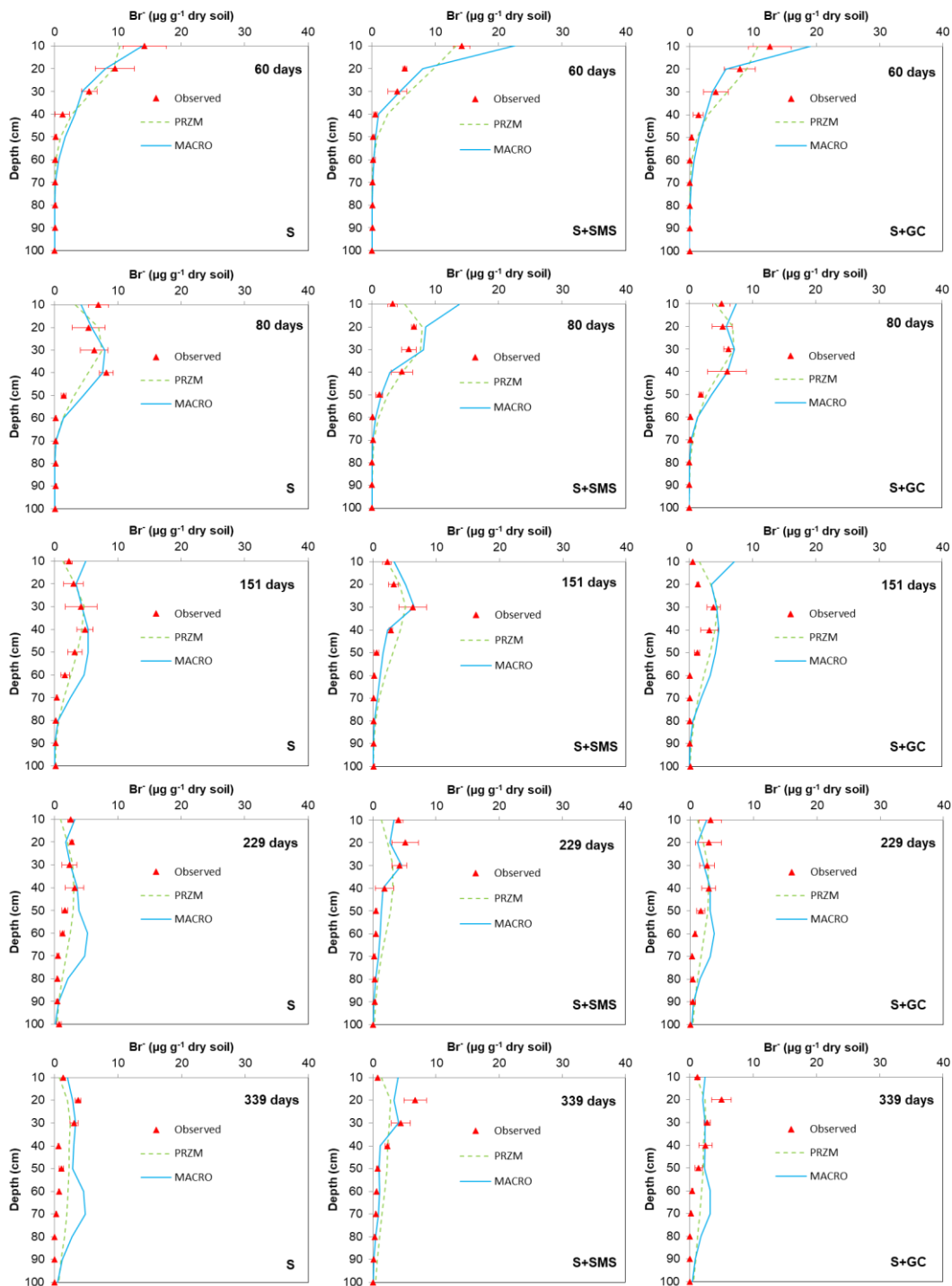


Fig. S2 (Cont.). Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of bromide at all sampling times after the first bromide application (calibration period: 29 November 2016 to 12 November 2017). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n=3$ ).

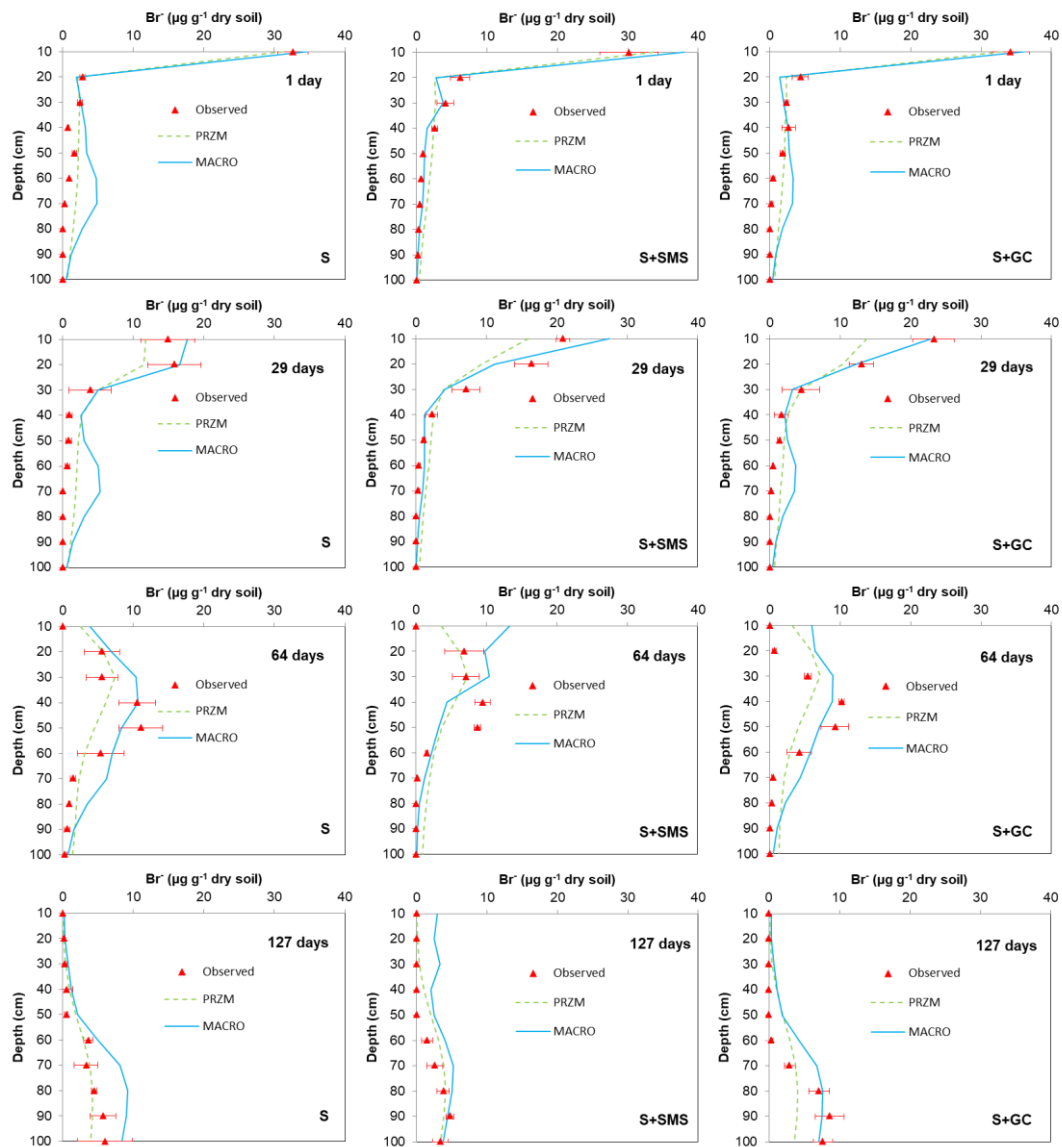


Fig. S3. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of bromide at all sampling times after the second bromide application (test period: 13 November 2017 to 30 November 2018). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated (n=3).

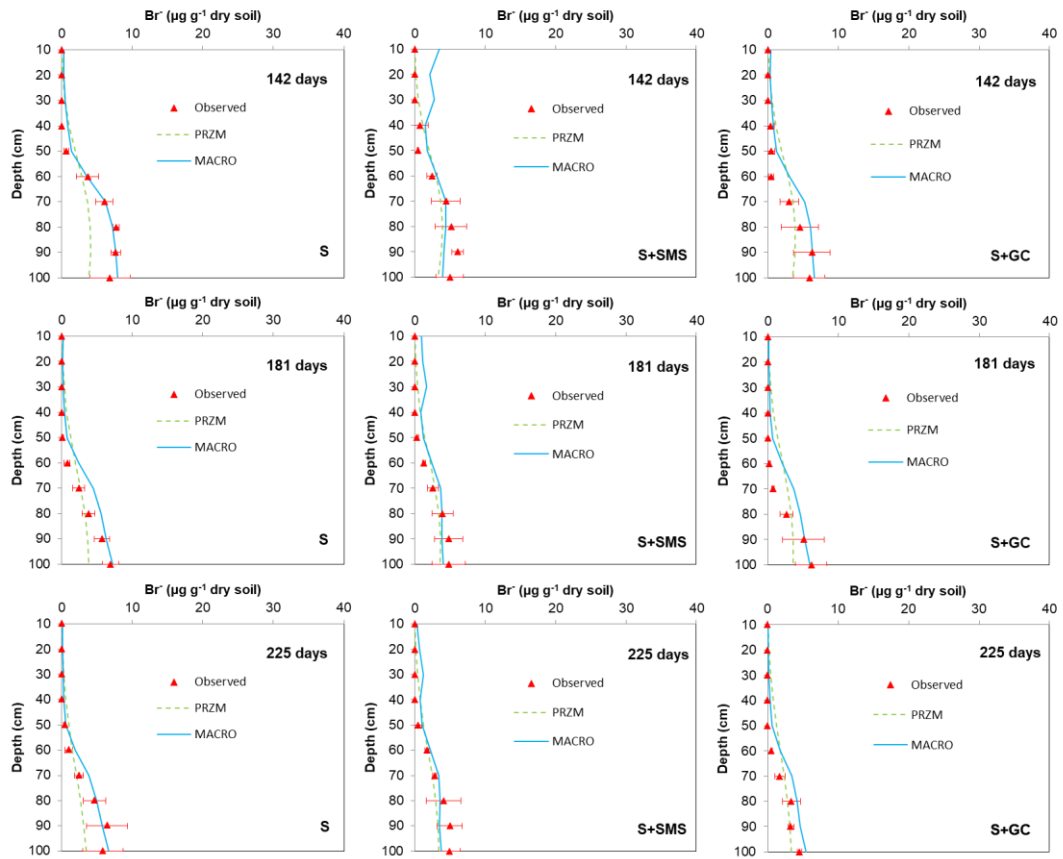


Fig. S3 (Cont.). Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of bromide at all sampling times after the second bromide application (test period: 13 November 2017 to 30 November 2018). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n=3$ ).

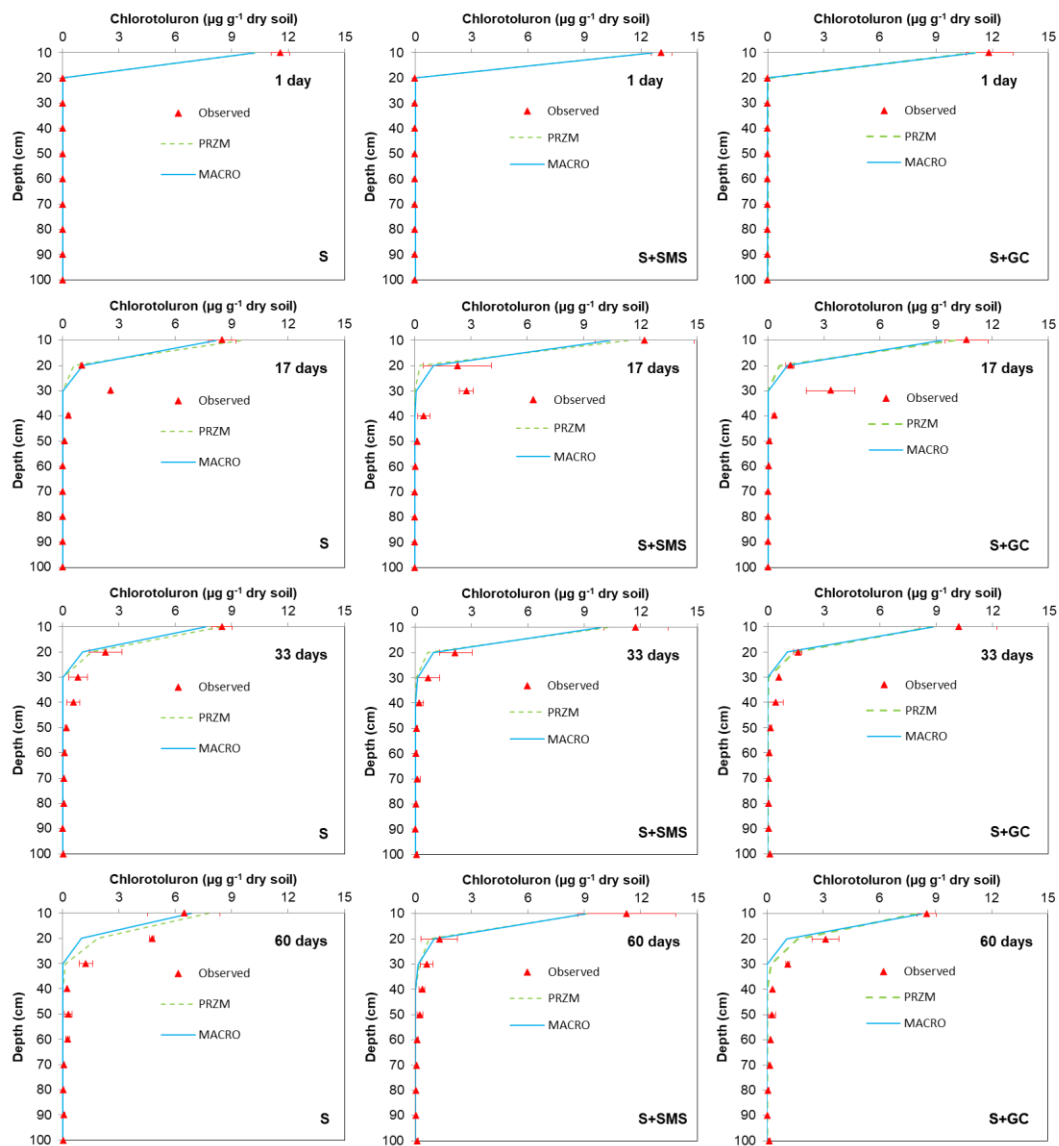


Fig. S4. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of chlorotoluron at all sampling times after the first herbicide application (calibration period: 29 November 2016 to 12 November 2017). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n=3$ ).

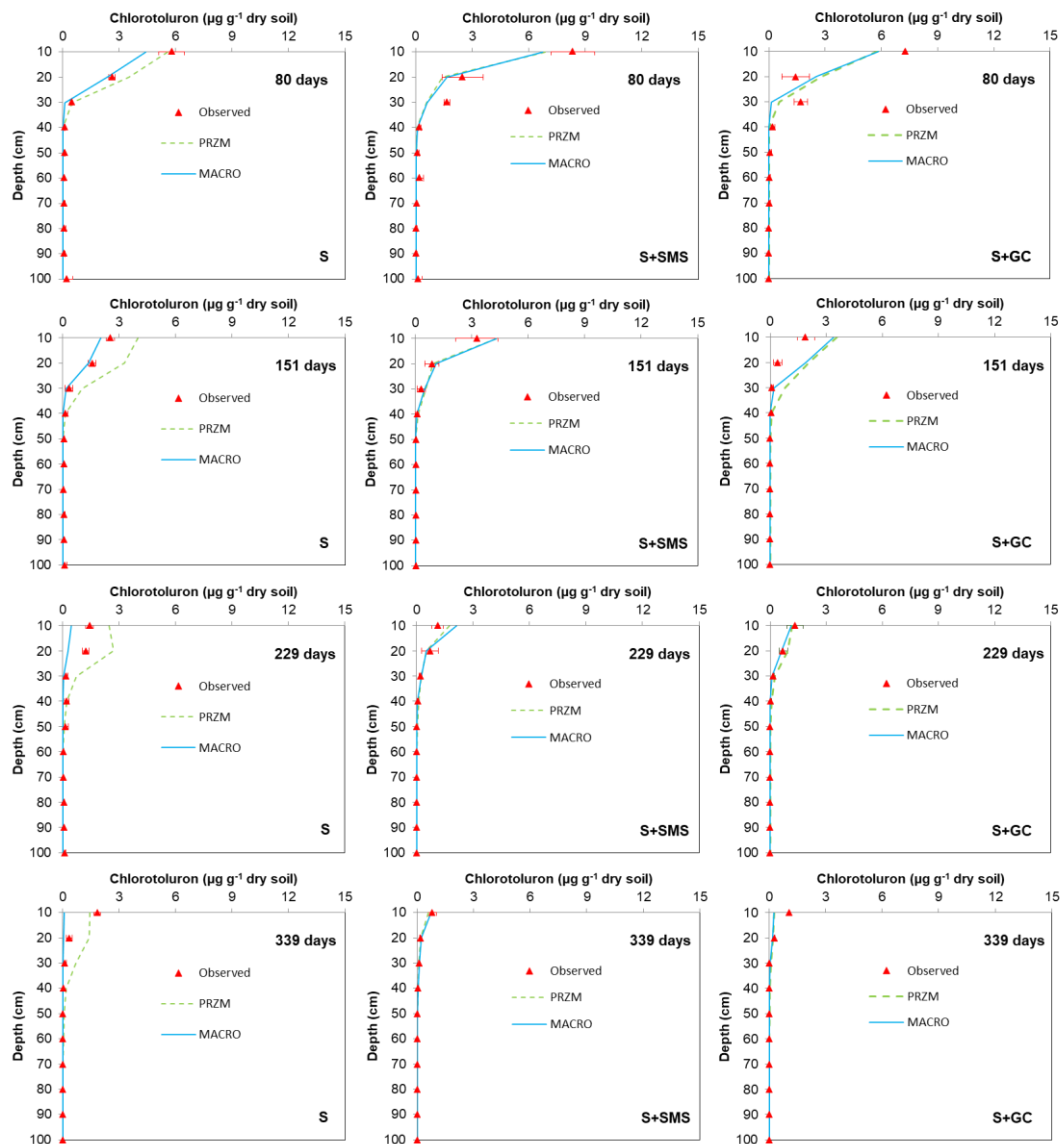


Fig. S4 (Cont.). Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of chlorotoluron at all sampling times after the first herbicide application (calibration period: 29 November 2016 to 12 November 2017). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated (n=3).

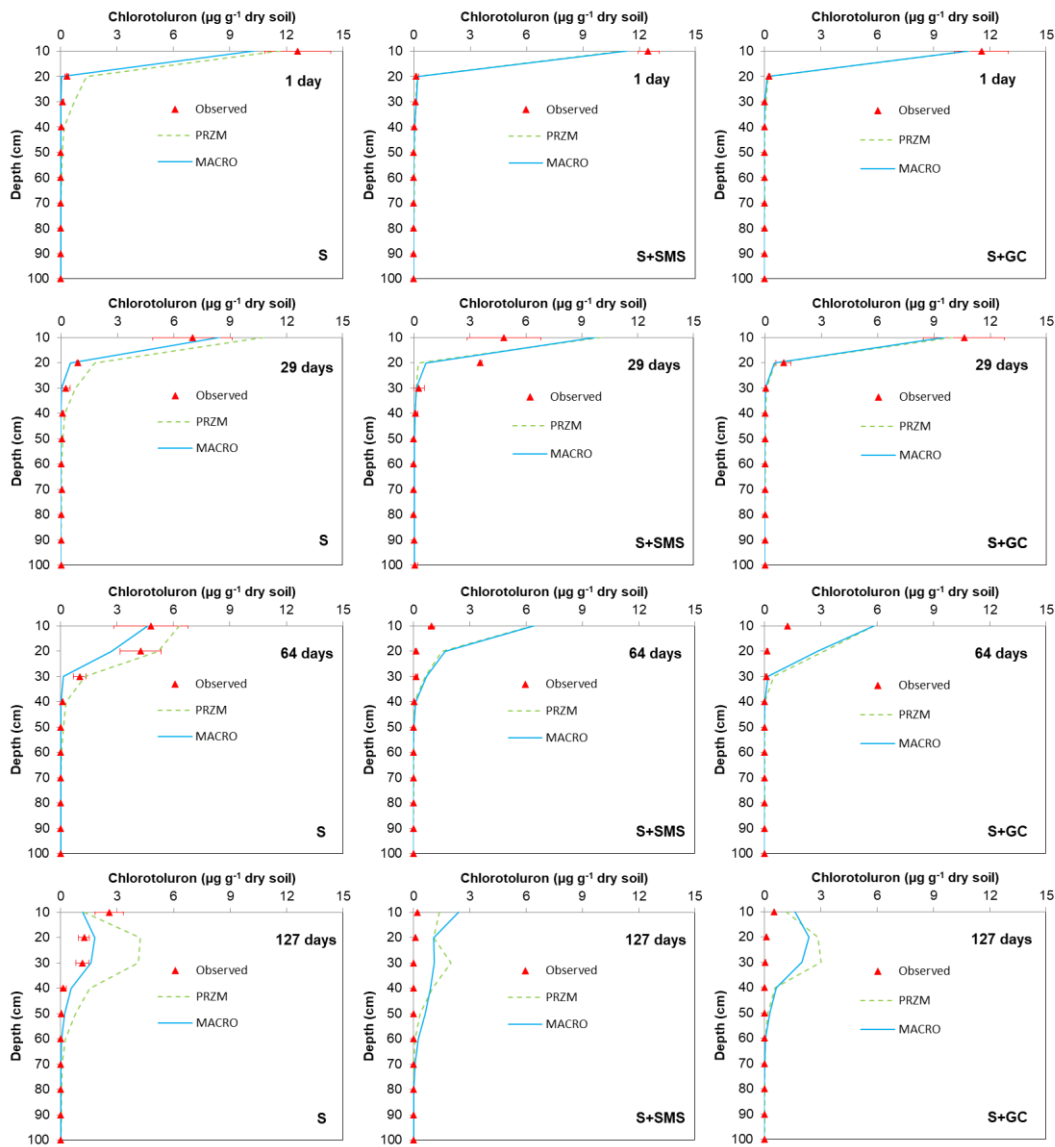


Fig. S5. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of chlorotoluron at all sampling times after the second herbicide application (test period: 13 November 2017 to 30 November 2018). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated (n=3).

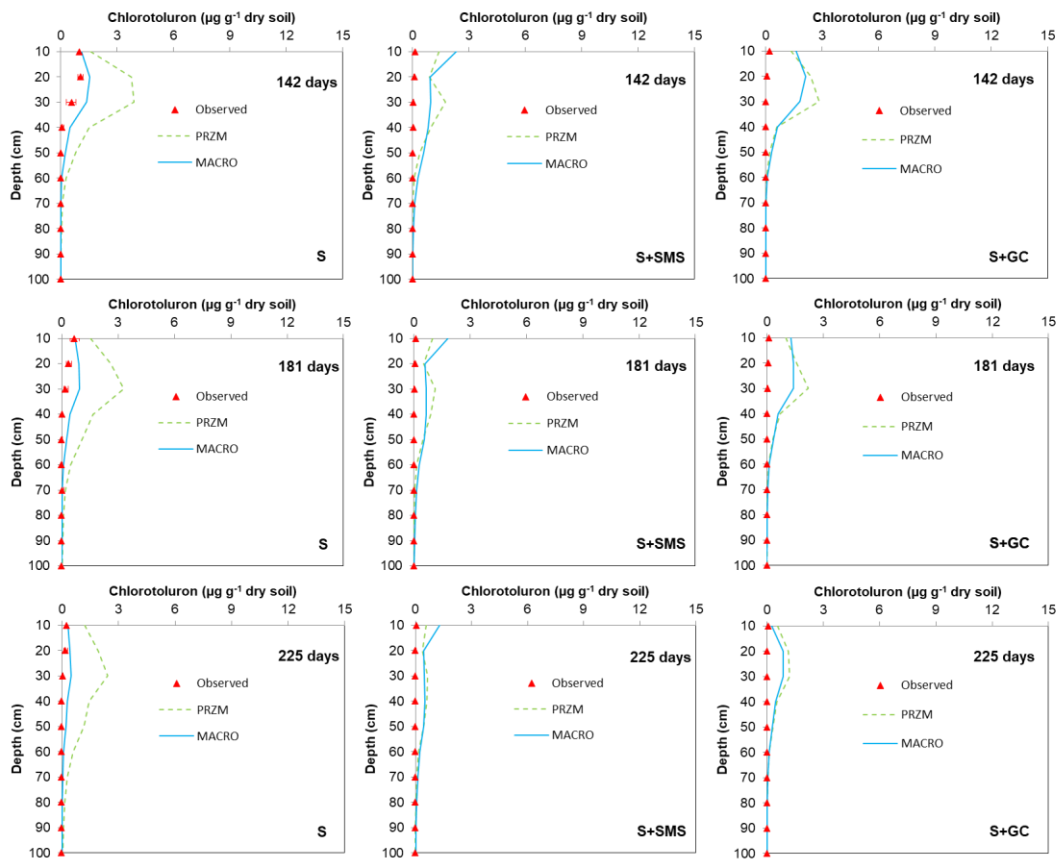


Fig. S5 (Cont.). Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of chlorotoluron at all sampling times after the second herbicide application (test period: 13 November 2017 to 30 November 2018). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n=3$ ).



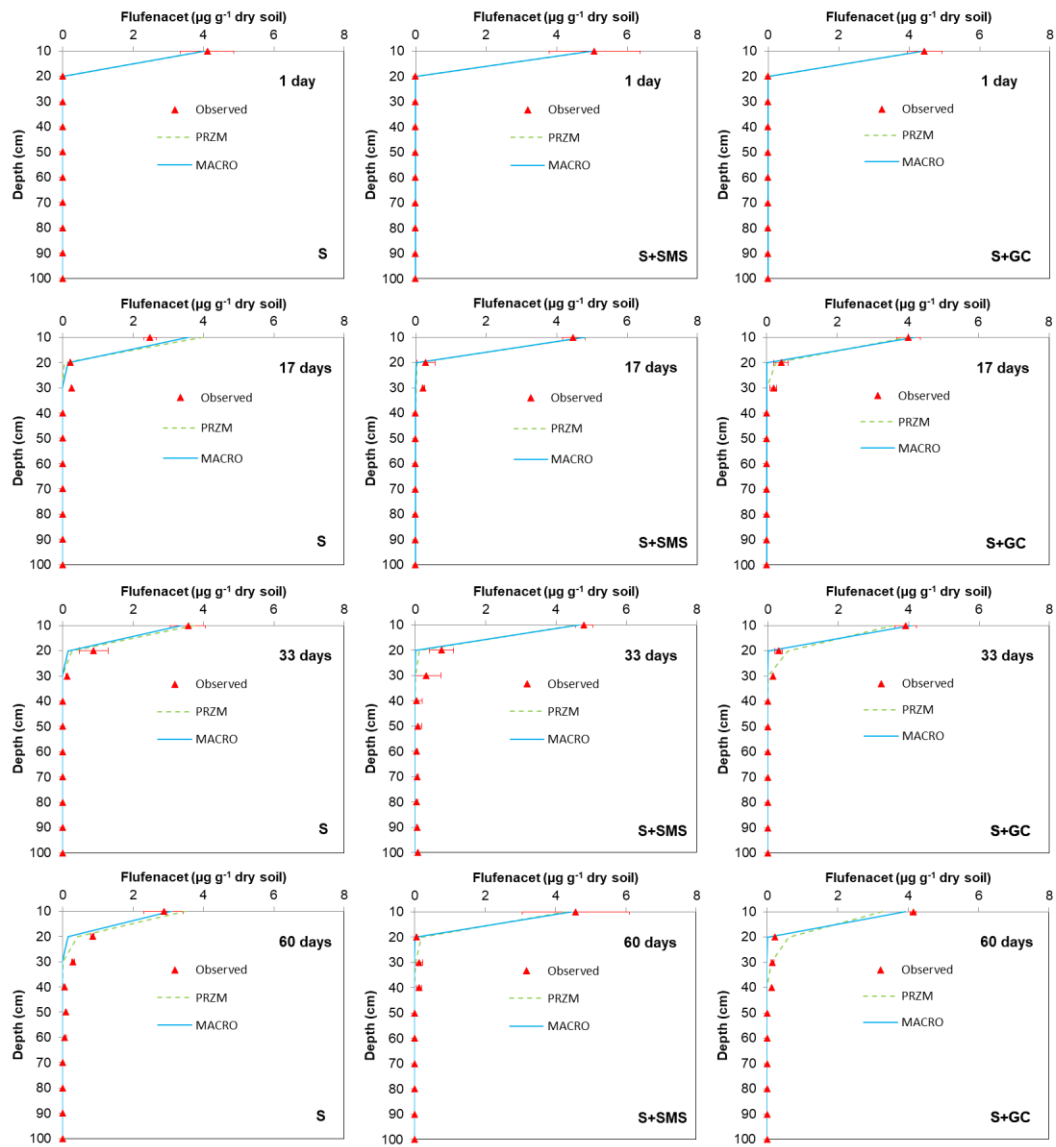


Fig. S6. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of flufenacet at all sampling times after the first herbicide application (calibration period: 29 November 2016 to 12 November 2017). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n=3$ ).

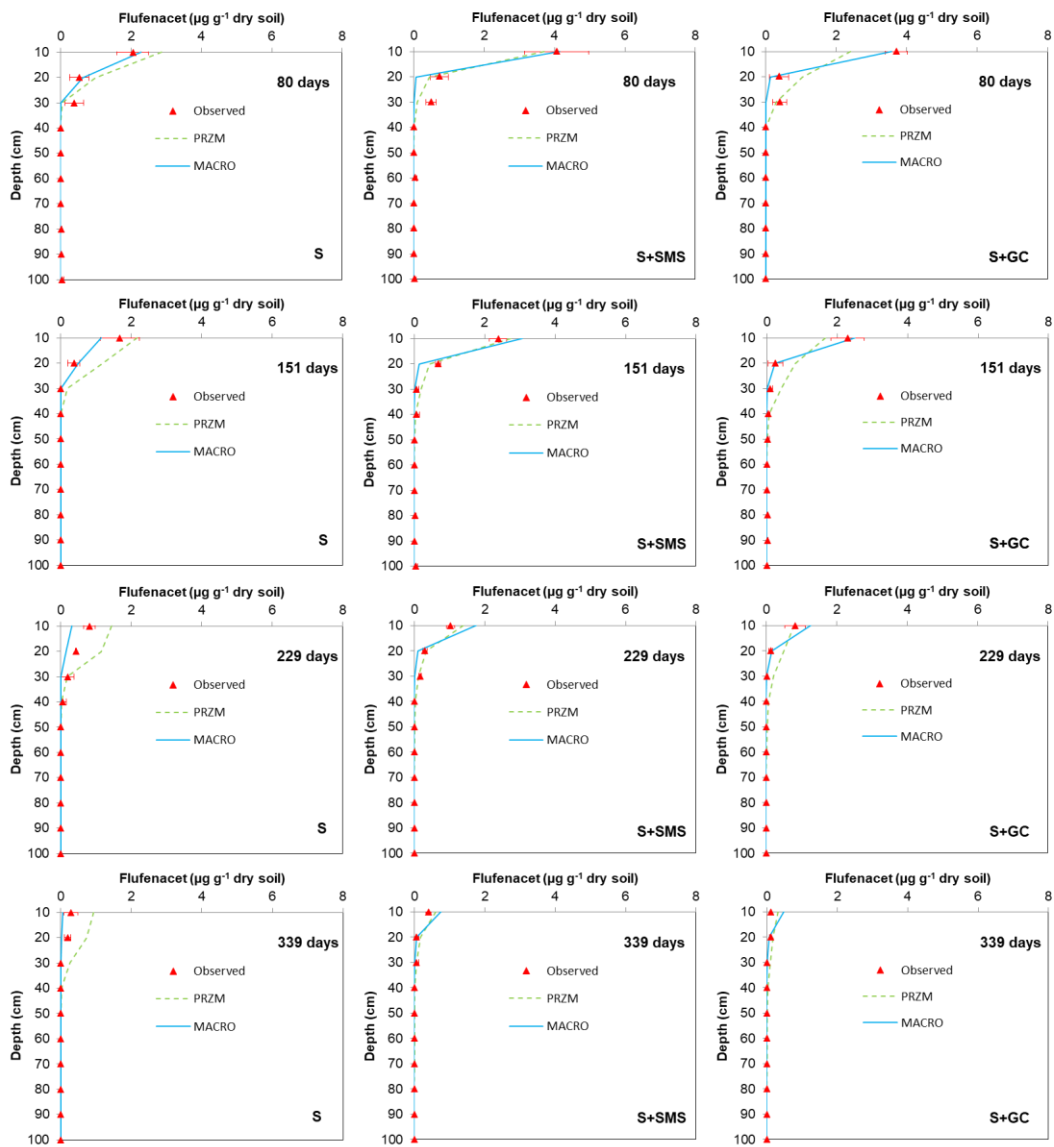


Fig. S6 (Cont.). Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of flufenacet at all sampling times after the first herbicide application (calibration period: 29 November 2016 to 12 November 2017). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n=3$ ).

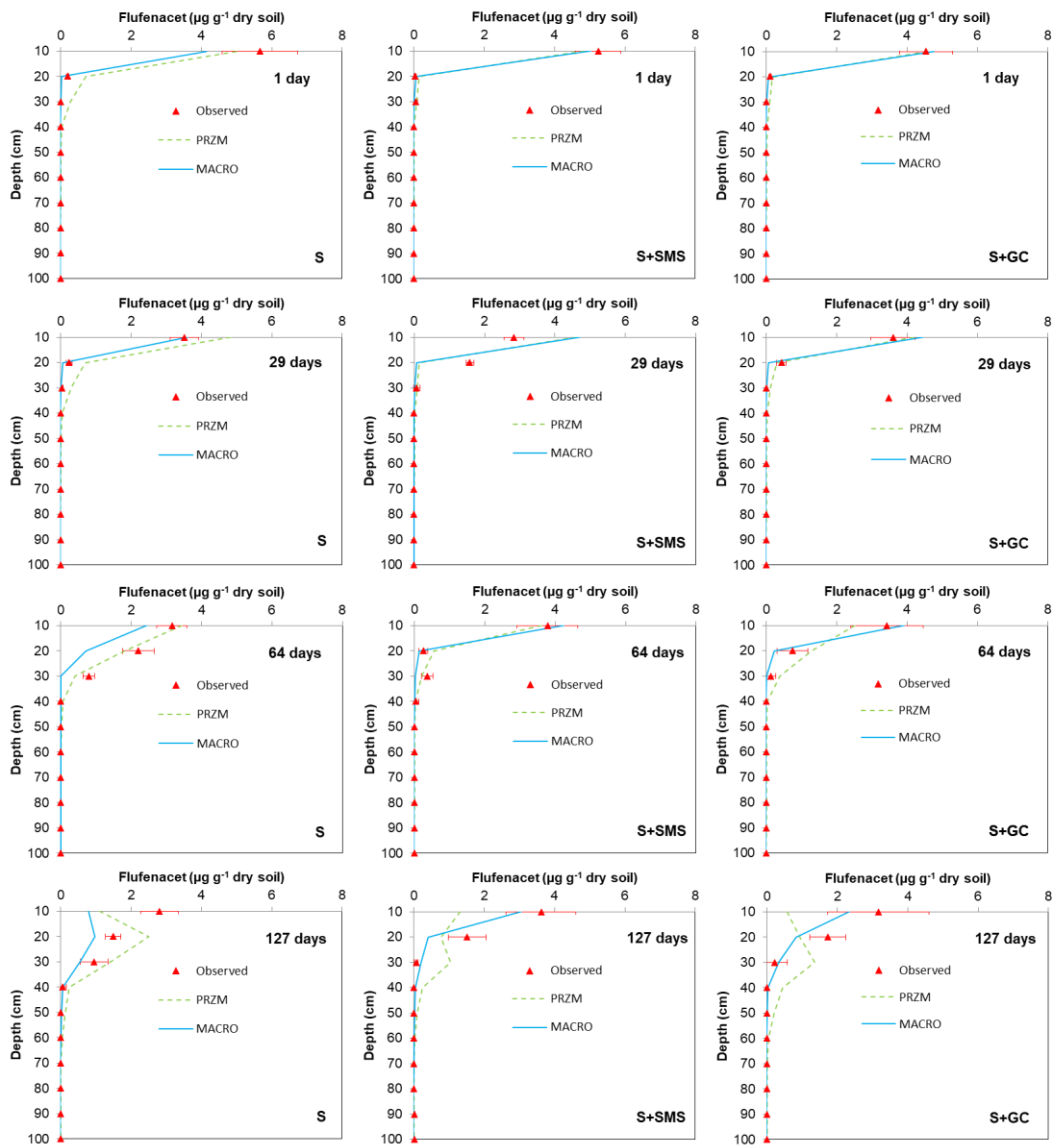


Fig. S7. Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of flufenacet at selected sampling times after the second herbicide application (test period: 13 November 2017 to 30 November 2018). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated (n=3).

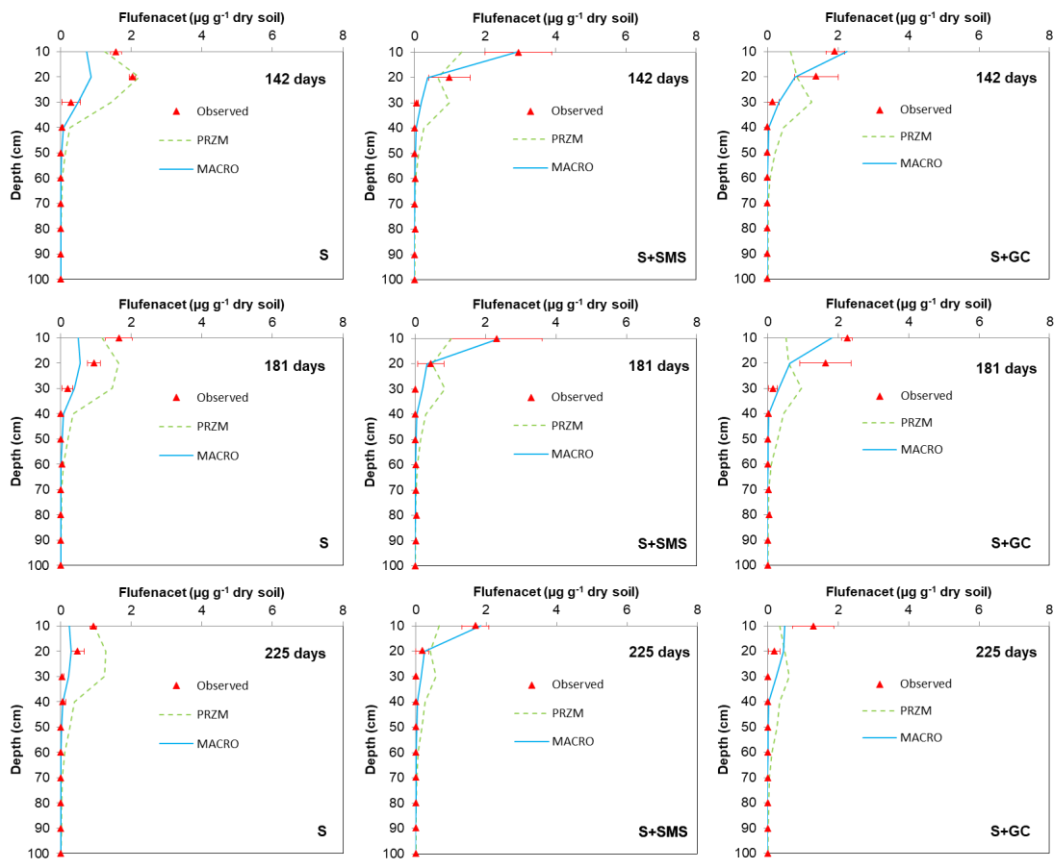


Fig. S7 (Cont.). Observed and simulated distribution in the unamended control (S), SMS- and GC-amended (S+SMS and S+GC) soils profiles of flufenacet at selected sampling times after the second herbicide application (test period: 13 November 2017 to 30 November 2018). Error bars represent the standard deviation of mean observed values of plots treated ( $n=3$ ).

# CAPÍTULO 4

## RESUMEN



## **CAPÍTULO 4: Field measurement and modelling of chlorotoluron and flufenacet persistence in unamended and amended soils.**

### **RESUMEN**

El cultivo del trigo de invierno está ampliamente extendido y tiene gran relevancia económica en España y es uno de los más importantes a nivel mundial. Los herbicidas clortoluron (CTL) y flufenacet (FNC), pertenecientes a distintos grupos químicos y con diferentes características fisicoquímicas, se recomiendan para el control de malas hierbas en pre- y post-emergencia en éste y otros cereales y cultivos, permitiendo mantener su productividad en los sistemas agrícolas. Sin embargo, la aplicación combinada de herbicidas con residuos orgánicos compostados utilizados como enmiendas para mejorar la fertilidad de los suelos puede modificar el comportamiento de estos compuestos químicos en el suelo. Entre los procesos que controlan el comportamiento de los herbicidas, su disipación en la capa superior del suelo es la más importante. A pesar de ello, muy pocos estudios han evaluado la degradación y persistencia de los herbicidas en suelos enmendados a escala de campo, y menos aún su modelización con modelos matemáticos que predicen el destino de pesticidas en el medio ambiente y las cantidades residuales de estos compuestos que podrían a su vez afectar a los cultivos posteriores.

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: i) estudiar la cinética de disipación de los herbicidas CTL y FNC en condiciones de campo y la formación de metabolitos, en un suelo agrícola cultivado con trigo sin enmendar (S) y enmendado con sustrato postcultivo de hongos (S + SMS) o compost verde (S + GC), ii) ajustar la disipación de ambos herbicidas al modelo cinético más simple y aceptable mediante el uso de índices estadísticos, y iii) evaluar la capacidad del modelo de destino de pesticidas MACRO para simular la persistencia de estos herbicidas.

El experimento de campo se estableció en un suelo de textura franco – arenosa en la finca experimental Muñovela del IRNASA, CSIC. Se diseñaron nueve parcelas experimentales de 81 m<sup>2</sup> cada una y distribuidas al azar (tres réplicas por tratamiento). Las dosis de SMS y GC aplicadas al suelo fueron 140 y 85 t ha<sup>-1</sup> en peso seco, respectivamente. El CTL (Erturon<sup>®</sup>) y FNC (Herold<sup>®</sup>) fueron aplicados en pre-emergencia a 15 y 5 kg i.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente, después de la siembra de trigo de invierno en diciembre de 2016. Para los estudios de modelización, los datos climáticos se registraron diariamente con una estación meteorológica ubicada *in situ*. Se tomaron

muestras de suelo superficial (0 – 10 cm) a distintos tiempos después de la aplicación de los herbicidas durante 339 días con el fin de establecer las curvas de disipación de los herbicidas en los suelos y las curvas de formación de sus metabolitos. Los herbicidas y los metabolitos se extrajeron del suelo con acetonitrilo (relación 1:2), se concentraron y se cuantificaron por HPLC – DAD – MS.

Los datos experimentales de ambos herbicidas se ajustaron bien a los modelos cinéticos de primer orden (SFO) en los suelos sin enmendar y enmendados, excepto el CTL que se ajustó mejor al modelo de primer orden multicompartimental (FOMC) en el suelo sin enmendar. Estos análisis permitieron el cálculo de los parámetros de disipación de los herbicidas,  $DT_{50}$  y  $DT_{90}$  (tiempo en días para la disipación del 50% y 90% de la cantidad de herbicida inicialmente aplicada, respectivamente).

La aplicación de las enmiendas orgánicas al suelo incrementó las vidas medias de ambos herbicidas en comparación con los suelos sin enmendar, como se había observado previamente en condiciones controladas de laboratorio (CAPITULO 1) debido a la mayor adsorción de los compuestos y su menor biodisponibilidad para ser degradados en los suelos enmendados. Para el CTL los valores de  $DT_{50}$  aumentaron en el orden  $S < S + GC < S + SMS$ , y para el FNC siguieron el orden  $S < S + SMS < S + GC$ . Estos valores de  $DT_{50}$  fueron mayores para el FNC (117 – 145 días,  $\log K_{ow} = 3.2$ ; más hidrofóbico y menos soluble en agua) que para el CTL (66.2 – 88.0 días,  $\log K_{ow} = 2.5$ ) en todos los suelos estudiados. Sin embargo, los valores de  $DT_{50}$  de ambos herbicidas en condiciones de campo fueron más altos que los obtenidos en condiciones controladas de laboratorio, destacando la importancia de la variación de las condiciones ambientales en el proceso de disipación. Estos cambios también afectaron a la formación de sus principales metabolitos a escala de campo en comparación con la observada a escala de laboratorio. La detección del metabolito desmetilclortoluron fue consistente con la disipación del CTL, mientras que el metabolito FNC–ESA no se detectó, y el metabolito FNC–OA sólo se detectó a concentraciones por debajo del límite de cuantificación.

Posteriormente, se simuló la cinética de disipación en campo de los dos herbicidas con el modelo de destino de pesticidas MACRO parametrizado con datos de laboratorio. Los resultados de simulación mostraron un muy buen ajuste con los niveles residuales de CTL medidos en el suelo sin enmendar y enmendado, mientras que la simulación de la disipación de FNC fue buena en el suelo sin enmendar y muy buena en los suelos



enmendados. En general, para ambos herbicidas en los tres tratamientos ensayados, los resultados simulados estuvieron dentro de la desviación estándar de los porcentajes de concentración medios remanentes observados. MACRO predijo mejor los valores de  $DT_{50}$  y  $DT_{90}$  para CTL que para FNC en la mayoría de los tratamientos. Procesos tales como la formación de residuos enlazados no extraíbles, que no son simulados por MACRO, podrían explicar esta mayor capacidad del modelo para estimar los valores de  $DT_{50}$  y  $DT_{90}$  de CTL que de FNC con mayor capacidad de adsorción. El modelo además simuló mejor los valores de  $DT_{50}$  que de  $DT_{90}$  (persistencia) de los dos herbicidas, especialmente en el suelo sin enmendar, indicando la pérdida de eficiencia del modelo para reproducir la disipación de los herbicidas en el suelo natural con el tiempo de simulación. Sin embargo, el uso de  $DT_{50}$  obtenido de experimentos de laboratorio como parámetro de entrada en el modelo MACRO permitió una simulación satisfactoria de la disipación de ambos herbicidas en los suelos enmendados bajo condiciones de campo, y especialmente para el CTL que tiene una menor persistencia.

Los resultados de este estudio son necesarios para conocer la persistencia de los herbicidas en suelos enmendados con residuos orgánicos en condiciones de campo y su posible impacto medioambiental. En base a los resultados de modelización, se puede concluir que MACRO podría usarse como herramienta eficiente para estimar las cantidades remanentes de herbicidas en suelos enmendados a partir de datos de adsorción y degradación ( $K_d$  y  $DT_{50}$ ) obtenidos previamente en experimentos de laboratorio. En consecuencia, este modelo podría evaluar si un herbicida puede aplicarse en suelos enmendados sin causar daños en el cultivo posterior y/o optimizar las dosis de herbicidas en diferentes condiciones ambientales para preservar la sostenibilidad de los sistemas agrícolas.



**CAPÍTULO 4**  
**ARTÍCULO PUBLICADO**





## Field measurement and modelling of chlorotoluron and flufenacet persistence in unamended and amended soils

Jesús M. Marín-Benito<sup>a</sup>, M. José Carpio<sup>a</sup>, Laure Mamy<sup>b</sup>, M. Soledad Andrades<sup>c</sup>,  
María J. Sánchez-Martín<sup>a</sup>, M. Sonia Rodríguez-Cruz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Natural Resources and Agrobiological of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain

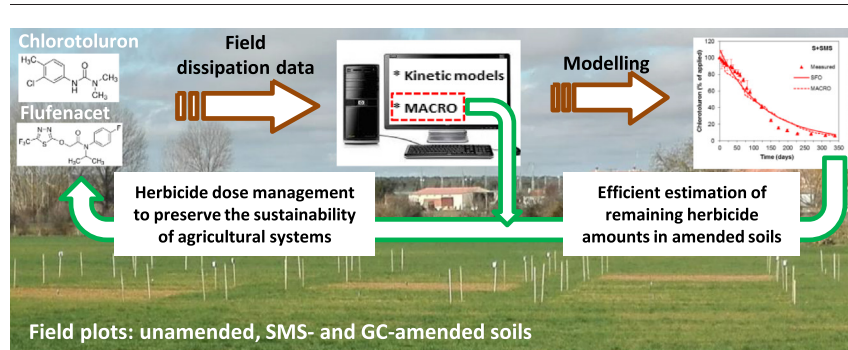
<sup>b</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS, 78850 Thiverval-Grignon, France

<sup>c</sup> Department of Agriculture and Food, University of La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain

### HIGHLIGHTS

- Field dissipation of chlorotoluron and flufenacet was studied in amended soils.
- Measured field dissipation of herbicides was simulated with the MACRO model.
- Field herbicide dissipation and metabolite formation were different from laboratory ones.
- Herbicides' persistence increased due to the changing field environmental conditions.
- MACRO is an efficient tool to estimate remaining herbicide amounts in amended soils.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 February 2020

Received in revised form 30 March 2020

Accepted 30 March 2020

Available online 1 April 2020

Editor: Damia Barcelo

#### Keywords:

Field dissipation

Herbicides

Soil

Spent mushroom substrate

Green compost

MACRO model

### ABSTRACT

The dissipation and persistence of two cereals herbicides, chlorotoluron and flufenacet, were studied in a field experiment including three replicated plots of unamended soil (S), soil amended with spent mushroom substrate (S + SMS), and soil amended with green compost (S + GC), during the winter wheat cultivation campaign. The SMS and GC organic residues were applied to the soil at rates of 140 or 85 t residue ha<sup>-1</sup>, and herbicides were sprayed as Erturon® and Herold® formulations for chlorotoluron and flufenacet, respectively. Concentrations of both herbicides and of their metabolites were regularly measured in the three soil treatments (0–10 cm) from 0 to 339 days. The dissipation kinetics fitted well the single first order (SFO) model, except that of chlorotoluron that fitted the first order multi-compartment (FOMC) model better in the unamended soil. The dissipation rates of herbicides were lower in amended than in unamended soils. The results also showed that the DT<sub>50</sub> of chlorotoluron (66.2–88.0 days) and flufenacet (117–145 days) under field conditions were higher than those previously obtained at laboratory scale highlighting the importance of the changing environmental conditions on the dissipation process. Similarly, the formation of chlorotoluron and flufenacet metabolites under field conditions was different from that previously observed in the laboratory. The performance of the MACRO pesticide fate model, parameterized with laboratory data, was then tested against field data. There was a very good agreement between measured and simulated chlorotoluron residue levels in the three soil treatments, while the ability of the model to reproduce the dissipation of flufenacet was good in the unamended soil and very

\* Corresponding author.

E-mail address: [msonia.rodriguez@irnasacsic.es](mailto:msonia.rodriguez@irnasacsic.es) (M.S. Rodríguez-Cruz).

good in S + SMS and S + GC soils. MACRO might be used to estimate the remaining amounts of herbicides in amended soils from degradation data previously obtained at laboratory scale. This would help to manage herbicide doses in different environmental conditions to preserve the sustainability of agricultural systems.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Winter wheat is an extensively grown crop with great economic relevance in dry farmland areas of Spain ([www.mapa.gob.es](http://www.mapa.gob.es)), and one of the most important one worldwide. It is cultivated on >200 Mha, contributing approximately to 30% (~800 Mt) of the total world cereal production (OECD-FAO, 2019). Climatic conditions (temperature and rainfall) are known to have a great impact on crop yields under the current Mediterranean scenario, but the influence of other common agricultural practices such as the application of herbicides and organic residues remains to be evaluated. Herbicides are needed to control weeds, and many active ingredients are available on the market, especially for certain crops such as cereals (Bai et al., 2018; Thiour-Mauprivez et al., 2019). The application of organic residues guarantees soil fertility and maintains correct organic matter (OM) content and nutrients to obtain crops of good quality and quantity, and at the same time to avoid soil degradation (Palansooriya et al., 2019).

The application of both herbicides and organic residues on soil became a frequent agricultural practice, which could affect the fate of these compounds in the environment (Marín-Benito et al., 2018; Vieublé Gonod et al., 2016). For example, composted spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC) have been efficiently tested for preventing and/or controlling soil and water contamination by pesticides (Kodesová et al., 2012; Marín-Benito et al., 2018). Among the processes that control the behavior of herbicides under field conditions, their dissipation in the topsoil is the most important one. It is due to abiotic and biotic degradation, loss by volatilization, plant uptake, runoff and/or leaching. Herbicides dissipation in amended soils has been widely studied under laboratory conditions (Barba et al., 2019; Cassigneul et al., 2018; Marín-Benito et al., 2019; Su et al., 2019). On the contrary, herbicides persistence and dissipation in amended soils have been scarcely studied under field conditions (Cañero et al., 2012; García-Delgado et al., 2019).

Chlorotoluron and flufenacet herbicides are recommended for pre- and post-emergence weed control in cereals and various other crops. Chlorotoluron is a urea herbicide with moderate solubility in water and low hydrophobicity, it is moderately persistent and mobile in the soil profile (EC, 2005; PPDB, 2019). Chlorotoluron dissipation/persistence in soils has been rarely studied at field scale (EC, 2005). A few results showed that the dissipation rate increased when the herbicide was repeatedly applied for 12 years (Rouchaud et al., 2000), and that its persistence depends on irrigation and fertilization (Rodríguez-Liébana et al., 2014). Flufenacet is an oxyacetamide herbicide moderately soluble in water and with a high hydrophobic character. It has a low persistence and a medium mobility in soil (EC, 2003; PPDB, 2019). Very few studies report the flufenacet dissipation in field unamended soils (Bloomberg et al., 2002; Rouchaud et al., 1999, 2001). The dissipation rate of the herbicide depends on the season of the year when flufenacet was applied since temperature influences the microbial activity and consequently the biodegradation of this herbicide (Milan et al., 2013; Rouchaud et al., 1999, 2001). The field dissipation of flufenacet is also influenced by soil texture and herbicide characteristics (Rouchaud et al., 2001), but not by the dose (Rouchaud et al., 1999).

Working at field scale has some important drawbacks: it is time consuming and cost prohibitive, and it should be carried out over long time periods to understand the effect of the variable climatic conditions on the fate of pesticide (Boesten and van der Pas, 2000; Holvoet et al., 2007; Willkommen et al., 2019). These disadvantages are often responsible for the shortage of this type of studies. Therefore, the combination

of laboratory and modelling studies can represent an interesting alternative to field studies, provided that models efficiency had been previously tested by comparison with field data. Numerous pesticide fate models, which were parameterized with sensitive data from laboratory studies such as pesticide adsorption and degradation coefficients (Dubus et al., 2003), and tested against field data, have been successfully used to assess the mobility and/or persistence of herbicides in soils (Garratt et al., 2002; Martínez et al., 1994). However, these numerical models were rarely tested to simulate the fate of herbicides in amended soils (Marín-Benito et al., 2020). Finally, the use of model able to simulate the persistence of herbicides in amended soils would be of great interest to assess soil residual amounts of pesticides which may affect subsequent crops. Indeed, some studies have shown that high herbicide residue levels in non-amended soils, due to the long persistence of these compounds in certain conditions, may result in damage to successive crops (James et al., 1999; Palhano et al., 2018; Scursioni et al., 2017).

Therefore, the objectives of this work were: (i) to study the field dissipation kinetics of the chlorotoluron and flufenacet herbicides, and the formation of their metabolites, in an agricultural soil without amendment (S) and amended with spent mushroom substrate (S + SMS) or with green compost (S + GC), (ii) to fit their dissipation to the most simple and acceptable kinetic model by using statistical indexes, and (iii) to assess the ability of the MACRO pesticide fate model to simulate the persistence of these herbicides.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental site, soil sampling and processing

The field experiment was set up at the Muñovela experimental farm belonging to the Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca, Spain (40°54'15"N latitude and 5°46'26"W longitude), during the 2016–2017 winter wheat cultivation campaign. The experiment involved randomized complete blocks with nine plots of 9 m × 9 m corresponding to the following three treatments, each in three replicates: unamended soil (S), soil amended with spent mushroom substrate (S + SMS), and soil amended with green compost (S + GC) (Carpio et al., 2020). The soil was an Eutric-Chromic Cambisol (IUSS Working Group WRB, 2015) with sandy-loam texture (80.4% sand, 4.7% silt, and 14.9% clay). The soil physicochemical characteristics were determined by standard analytical methods (Carpio et al., 2020; Sparks, 1996) (Table S1 in Supplementary material). The SMS and GC organic residues were applied at rates of 140 and 85 t ha<sup>-1</sup> (dry weight basis), respectively, and incorporated into the top 20 cm at the beginning of the experiment. The SMS is originated from *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* (2:1) cultivation, and the GC from the pruning of plants and trees in parks and gardens. They were composted following an aerobic process, and were supplied by Sustratos de la Rioja S.L. (Pradejon, Spain) and Viveros El Arca S.L. (Salamanca, Spain), respectively. The main characteristics of both organic residues were determined in air-dried and sieved (<2 mm) samples (Table S2 in Supplementary material) using the methods reported by Carpio et al. (2020). Winter wheat was sown on 14 November 2016 and harvested on 3 July 2017. After harvest, a bare soil was maintained during the fallow period. The field experiment ended on 5 November 2017 (339 days after the herbicide application).

Chlorotoluron and flufenacet (Table S3 in Supplementary material) were sprayed at 15 and 5 kg a.i. ha<sup>-1</sup>, respectively, as Erturon® (chlorotoluron 50% w/v, Cheminova Agro S.A., Madrid, Spain) and

Herold® (flufenacet 40% w/v, Bayer Crop Science S.L., Valencia, Spain) commercial formulations. The chemicals were jointly applied in pre-emergence using a sprayer attached to a tractor on 1 December 2016. According to the experimental farm's records, none of the chemicals had ever been applied to the experimental field, as an initial onsite background analysis did not detect any residues.

The herbicides dissipation was studied in unamended, SMS- and GC-amended soils from 0 to 339 days after their application. At each sampling time (1, 5, 10, 13, 17, 21, 33, 38, 45, 53, 60, 70, 80, 89, 104, 124, 145, 151, 173, 199, 229, 269, 311 and 339 days), five 10-cm soil subsamples were randomly sampled in each plot, and representative average soil samples of each plot were obtained by mixing the five subsamples. The composite samples were then put into plastic bags and transported in portable refrigerators to the laboratory, where they were homogenised and sieved (<2 mm), and stored at 4 °C until their analysis.

For modelling studies, climatic data (rainfall, maximum, minimum and average air temperature) were daily monitored using a meteorological station located at the field site. Additional evapotranspiration data were obtained from the station of Matabacan airport (23 km away from Muñovela farm).

## 2.2. Herbicides extraction and analysis

The analytical standards of chlorotoluron and flufenacet (>99.5% purity) and of their major metabolites, desmethyl chlorotoluron, flufenacet ESA sodium salt, and flufenacet OA (>99.3% purity), were supplied by Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain) (Table S3). The extraction and analysis of both herbicides and of their major metabolites were done according to Marín-Benito et al. (2019). Briefly, triplicate subsamples of moist soil (6 g) from each composite sample of unamended or amended soils, taken at each sampling time, were extracted with acetonitrile (12 mL). Then, they underwent an ultrasonic bath (1 h, 20 °C), and they were shook (24 h, 20 °C), centrifuged (5045g, 15 min), and filtrated (<0.45 µm). Extracts (8 mL) were evaporated until dryness at 25 °C under a nitrogen stream using an EVA-EC2-L evaporator (VLM GmbH, Bielefeld, Germany). The residue was dissolved in 0.75 mL of acetonitrile and transferred to a glass vial for analysis. The herbicides and their metabolites were determined by HPLC-DAD-MS using a Waters chromatograph (Waters Assoc., Milford, USA).

## 2.3. Modelling of herbicides dissipation

To model the dissipation of herbicides in the field, the MACRO model (version 5.2) was selected because it is used at the European level for pesticide registration (FOCUS, 2000) and because it is one of the most efficient to simulate the fate of pesticides in the environment, and especially in amended soils (Marín-Benito et al., 2020).

MACRO is a process-based, one-dimensional, dual-permeability model able to simulate preferential flow processes. The model is presented in detail in Larsbo and Jarvis (2003). In few words, the soil pore system is partitioned into micropore and macropore domains with separate flow rate and solute concentration for each domain. The boundary between the two domains is defined by a given soil water pressure head, and by the corresponding water content and hydraulic conductivity. In the micropores, water flow and solute transport are described by the Richards' equation and the convection–dispersion equation, respectively. Water flow in the macropores is treated as a gravity driven process, and solute transport is assumed to be solely convective. The adsorption of pesticide is assumed to be linear, instantaneous, and reversible, and its degradation follows first-order kinetic. The model implements physically based expressions using an effective aggregate half-width to calculate the water and solute exchange between the micropore and macropore domains.

The model was mainly parameterized with site-specific data (soil, crop, climate, herbicides), and the parameterization was completed

using data from the literature, pedotransfer functions and default values for parameters that cannot be measured such as some hydraulic ones. Detailed description of the parameterization and calibration of the model for the 1.6-m unamended, SMS- and GC-amended soil profiles can be found in Marín-Benito et al. (2020) together with the parameter values. Table S1 summarizes the main physicochemical and hydraulic input parameters for the top 10 cm of S, S + SMS and S + GC soils, and the main crop and herbicide input parameters are shown in Tables S4 and S5 (in Supplementary material), respectively. It has to be highlighted that the DT<sub>50</sub> (time to 50% degradation, days) values used to parameterize the model were taken from laboratory experiments with unamended control and amended soil samples taken *in situ*, at 6 °C and 40% of the maximum soil water holding capacity (Marín-Benito et al., 2019).

## 2.4. Data analysis

FOCUS work group guidelines were followed to select the best kinetic model for each herbicide and soil treatment (FOCUS, 2006). According to these guidelines, herbicide dissipation kinetics were initially fitted to single first-order (SFO) and first order multi-compartment (FOMC) kinetic models. The coefficient of determination and the chi-square test were calculated as indicators of the goodness of fit. Based on the acceptability criterion of these guidelines included in Supplementary material, no more models reported in FOCUS (2006) and also in the literature (Sarmah and Close, 2009; Srinivasan et al., 2014) were tested. The herbicide concentrations, which were measured one day after the application in the three soil treatments, were considered as 100% of the amounts applied. The DT<sub>50</sub> values were used to characterize the decay curves and to compare the variations in dissipation rates. The kinetic model parameters were estimated using the Excel Solver add-in Package (FOCUS, 2006). An additional description of the dissipation kinetic models is included in Supplementary material.

The performance of MACRO was assessed using three statistical indices, the efficiency (EF), the coefficient of residual mass (CRM), and the root mean square error (RMSE), which were additionally estimated for the kinetic models (Smith et al., 1996):

$$EF = 1 - \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (S_i - O_i)^2 / \sum_{i=1}^n (O_i - O_m)^2}{\sum_{i=1}^n (S_i - O_i)^2 / \sum_{i=1}^n (O_i - O_m)^2} \right] \quad (1)$$

$$CRM = \left( \frac{\sum_{i=1}^n O_i - \sum_{i=1}^n S_i}{\sum_{i=1}^n O_i} \right) \quad (2)$$

$$RMSE = (100/O_m) \left[ \sum_{i=1}^n (S_i - O_i)^2 / n \right]^{1/2} \quad (3)$$

where  $S_i$  and  $O_i$  are the simulated and observed (measured) values, respectively,  $O_m$  is the mean observed value, and  $n$  is the number of data. The optimum value of EF is +1 and that of CRM and RMSE is zero. If CRM > 0 (<), then there is an under (over) estimation of observed values.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Dissipation kinetics of chlorotoluron in field unamended and amended soils

The dissipation kinetics of chlorotoluron fitted best the FOMC model in the unamended soil S, and the SFO one in S + SMS and S + GC soils (Fig. 1, Table 1). This differs from the results of previous works showing that the dissipation kinetic of chlorotoluron in unamended soil followed SFO, while it fitted bi-phasic double first-order in parallel model (DFOP) in organic-amended soil (Rodríguez-Liébana et al., 2014; Rouchaud et al., 2000). At the end of the experiment (339 days), higher

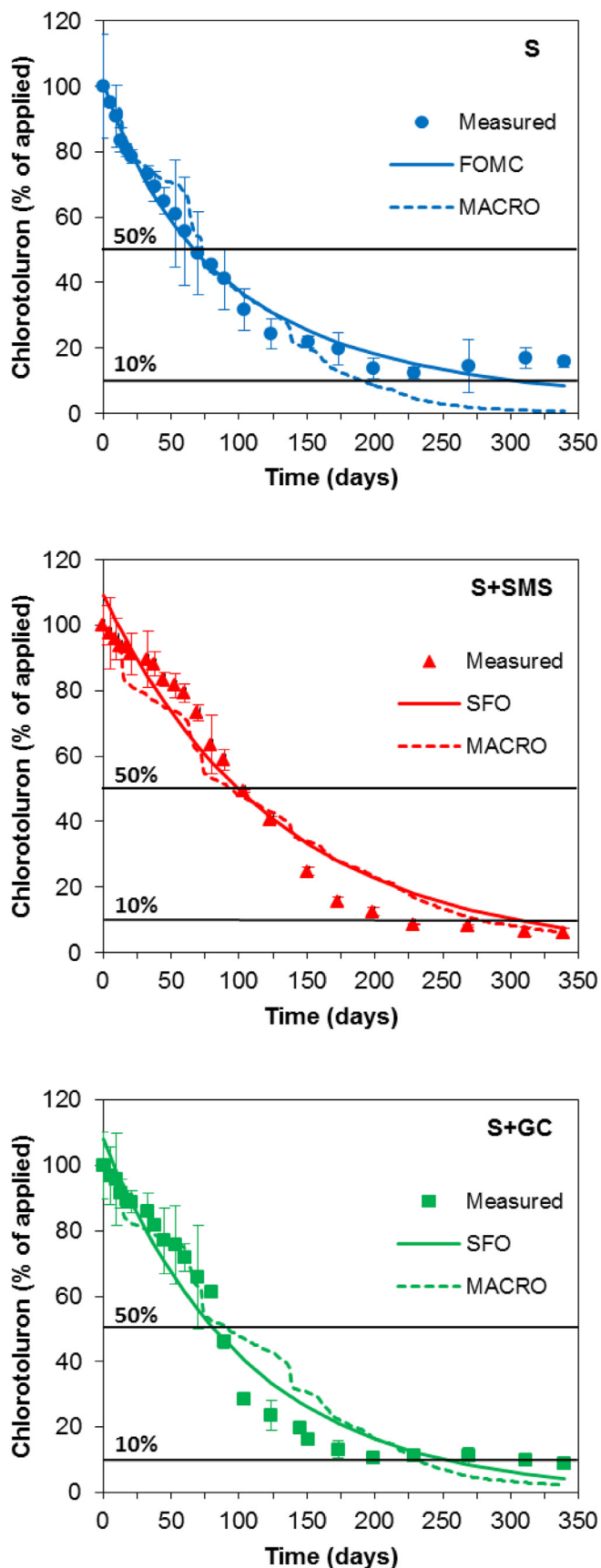


Fig. 1. Measured, fitted (SFO and FOMC) and simulated (MACRO) dissipation kinetics of chlorotoluron in unamended (S), spent mushroom substrate (S + SMS)- and green compost (S + GC)-amended soils. Bars indicate the standard deviation of the mean value ( $n = 9$ ). SFO: Single first-order model, FOMC: First order multi-compartment model.

Table 1

Dissipation rate parameters ( $k$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) and dissipation half-lives ( $DT_{50}$ ) of chlorotoluron in unamended (S), spent mushroom substrate- and green compost-amended soils (S + SMS and S + GC) according to the single first-order (SFO) and first order multi-compartment model (FOMC) models, and goodness of fit statistics.

Sample/SFO	$k$ (days <sup>-1</sup> )	$DT_{50}$ (days) <sup>a</sup>	$\chi^2$	$R^2$	EF (-) <sup>c</sup>	CRM (-) <sup>d</sup>	RMSE (%) <sup>e</sup>	
S	0.009	73.7	7.2	0.991	0.98	0.02	8.53	
S + SMS	0.008	88.0	10.1	0.961	0.96	-0.01	12.0	
S + GC	0.009	73.6	11.3	0.957	0.96	-0.01	13.4	
Sample/FOMC	$\alpha$	$\beta$	$DT_{50}$ (days) <sup>b</sup>	$\chi^2$	$R^2$	EF (-) <sup>c</sup>	CRM (-) <sup>d</sup>	RMSE (%) <sup>e</sup>
S	2.80	236	66.2	6.0	0.985	0.99	0.00	7.02
S + SMS	$5.10 \times 10^4$	$6.47 \times 10^6$	88.0	10.3	0.961	0.96	-0.01	12.0
S + GC	$6.09 \times 10^4$	$6.47 \times 10^6$	73.6	11.5	0.957	0.96	-0.01	13.4

<sup>a</sup>  $DT_{50} = \ln 2/k$ .

<sup>b</sup>  $DT_{50} = \beta \times [2^{(1/\alpha)} - 1]$ .

<sup>c</sup> Efficiency.

<sup>d</sup> Coefficient of residual mass.

<sup>e</sup> Root mean square error.

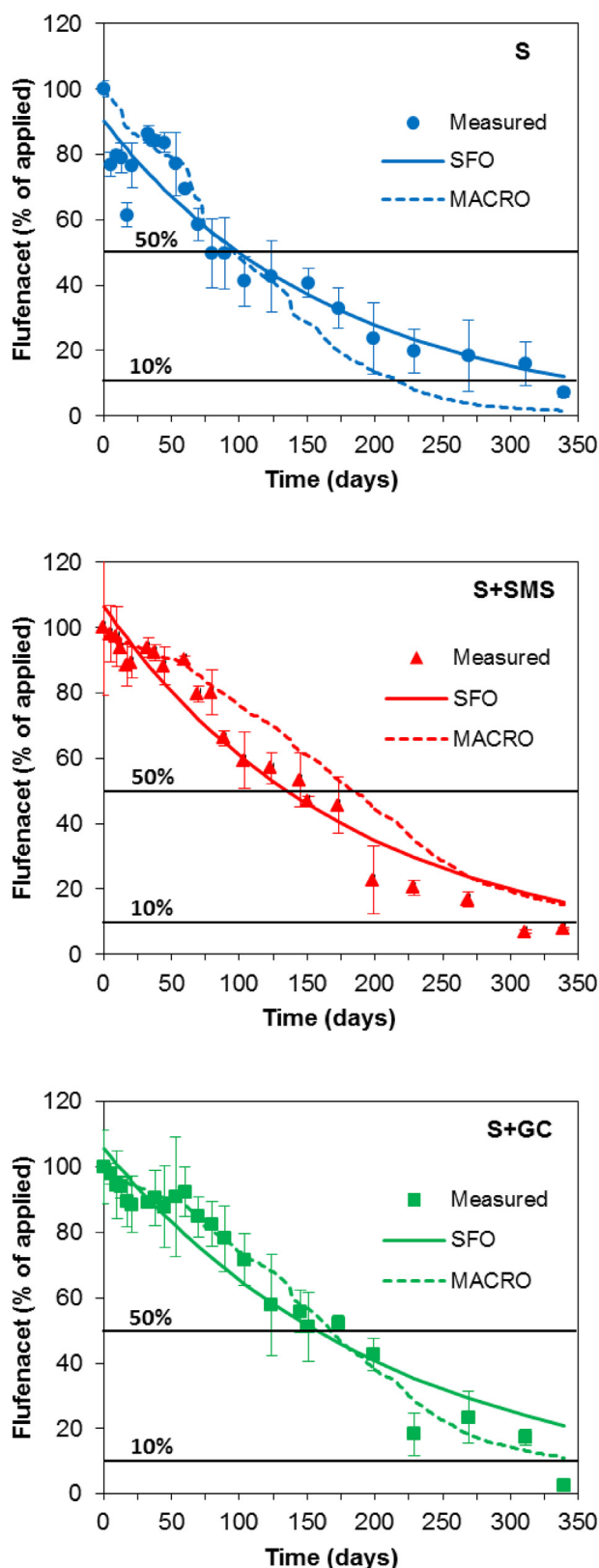
concentrations of chlorotoluron were detected in unamended soil S (15.7%) than in S + SMS (5.97%) or S + GC (8.77%) soils (Fig. 1). In the unamended soil, the  $DT_{50}$  of chlorotoluron was found to be 66.2 days (Table 1), which is consistent with published values ranging from 26 to 64 days (PPDB, 2019; Rouchaud et al., 2000). For all soils (unamended and amended), the field  $DT_{50}$  were higher than those obtained in laboratory conditions (Marín-Benito et al., 2019) highlighting the importance of the variable environmental conditions on the dissipation process.

In the unamended soil S, >26% of chlorotoluron were dissipated 33 days after its application. This high dissipation rate of the herbicide could be explained by its high mobility to deeper soil layers (Carpio et al., 2020; PPDB, 2019). The dissipation rate of chlorotoluron in S + SMS soils was lower than in the unamended soil S, but the dissipation rates were almost similar in S and S + GC (Table 1). The lower dissipation rate of chlorotoluron in S + SMS soil can be explained by the decrease in its leaching through the soil profile because of higher adsorption:  $K_d$  values as determined by Carpio et al. (2020) were 0.773 L kg<sup>-1</sup> in S soil and 4.773 L kg<sup>-1</sup> in S + SMS (Table S5). High adsorption of chlorotoluron by amended soils leads to a decrease in the bioavailability of the herbicide to be degraded, as reported previously for this herbicide (Kodesová et al., 2012; Marín-Benito et al., 2019) and for other compounds (Barba et al., 2019; Su et al., 2019). On the contrary, Rodríguez-Liéñana et al. (2014) found a rapid dissipation of chlorotoluron ( $DT_{50} = 2.4$  days) in a field amended soil. They related this result to the low water solubility and high hydrophobicity of chlorotoluron, but also indicated a possible increase of aged residues of herbicide over time.

The dissipation of chlorotoluron was consistent with the detection of its desmethyl chlorotoluron metabolite in the soils over the entire experimental period (Table S3). The N-dealkylation, giving desmethyl chlorotoluron, has indeed been reported as the main degradation pathway of chlorotoluron in soils EC, 2005; (Gross et al., 1979; PPDB, 2019). This metabolite was also observed in laboratory degradation experiments at 6 °C and 16 °C in similar soils (Marín-Benito et al., 2019). In the unamended soil S, the concentration of desmethyl chlorotoluron increased from the first day of experiment up to 80 days, and then it remained constant up to 339 days. However, its formation was delayed in the S + SMS and S + GC soils as it was only detected after 33 and 13 days, respectively. Then, the concentrations of desmethyl chlorotoluron increased up to 80 days in S + SMS and S + GC, and decreased up to 173 days, when the metabolite was not detected (Fig. 2). The amounts of metabolite that were formed in the soils followed the order: S > S + GC > S + SMS. This is consistent with the increase in



the adsorption coefficients of chlorotoluron in these soils, so with a concomitant decrease in herbicide bioavailability. Peaks of metabolites were detected at 89 and 151 days in unamended soil S, and at 80 days



**Fig. 2.** Measured, fitted (SFO) and simulated (MACRO) dissipation kinetics of flufenacet in unamended (S), spent mushroom substrate (S + SMS)- and green compost (S + GC)-amended soils. Bars indicate the standard deviation of the mean value ( $n = 9$ ). SFO: Single first-order model.

in S + SMS and S + GC soils (Fig. 2). The corresponding concentrations were 0.184 and 0.177  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry soil in unamended soil S, 0.053 and 0.194  $\mu\text{g g}^{-1}$  in S + SMS and S + GC, respectively, and the total cumulative amount accounted for 23.5%, 2.83% and 10.6% of the applied herbicide.

These results were similar to those found for the degradation of chlorotoluron under laboratory conditions, where the cumulative amount of desmethyl chlorotoluron was lower in S + SMS than in S and S + GC soils (Marín-Benito et al., 2019), indicating that the herbicide degradation mechanisms were different in S + SMS than in S and S + GC treatments. The high adsorption of chlorotoluron by S + SMS could explain a low bioavailability of the herbicide to be degraded and consequently the low amount of metabolite produced in this soil. However, it should be noted that the dissipation and/or mobility of chlorotoluron could be affected by the dissolved organic carbon (DOC), especially in S + SMS which had the highest DOC content (Carpio et al., 2020). Chlorotoluron could remain adsorbed by the soil OC but also adsorbed by DOC in solution, what enhances its mobility and/or its degradation by microorganisms (Marín-Benito et al., 2012). A high retention of the metabolite by S + SMS or the formation of non-extractable residues could also have occurred. The formation of bound residues for desmethyl chlorotoluron has not been reported previously in the literature, although it would be possible according to its higher  $K_{oc}$  (248  $\text{L kg}^{-1}$ ), compared to the parent compound (196  $\text{L kg}^{-1}$ ) (Table S3) (PPDB, 2019). The greater ability metabolites have to form bound residues than their parent compounds has been reported in the literature for other pesticides (Marín-Benito et al., 2012; Papadopoulou et al., 2016).

Finally, mineralization and/or the formation of bound residues of chlorotoluron could also have happened (EC, 2005). Both additional dissipation pathways may have been facilitated in the S + SMS and S + GC soils because of a higher content of both DOC (more herbicide in solution) and OC (higher adsorption of herbicide), respectively, compared to unamended soil S, as observed for other pesticides (Marín-Benito et al., 2012).

### 3.2. Dissipation kinetics of flufenacet in field unamended and amended soils

The dissipation of flufenacet was initially slower in amended soils than in the unamended soil, but the dissipation rates were faster after the  $DT_{50}$  were reached. The dissipation kinetics of flufenacet fitted well the SFO model for the three soil treatments (Table 2, Fig. 3). This is consistent with the results of Bloomberg et al. (2002) and Rouchaud

**Table 2**

Dissipation rate parameters ( $k$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) and dissipation half-lives ( $DT_{50}$ ) of flufenacet in unamended (S), spent mushroom substrate- and green compost-amended (S + SMS and S + GC) soils according to the single first-order (SFO) and first order multi-compartment model (FOMC) models, and goodness of fit statistics.

Sample/SFO	$k$ ( $\text{days}^{-1}$ )	$DT_{50}$ (days) <sup>a</sup>	$\chi^2$	$R^2$	EF (-) <sup>c</sup>	CRM (-) <sup>d</sup>	RMSE (%) <sup>e</sup>	
S	0.006	117	12.3	0.905	0.90	0.00	14.7	
S + SMS	0.006	123	9.7	0.945	0.94	-0.01	11.5	
S + GC	0.005	145	9.9	0.924	0.92	-0.01	11.8	
Sample/FOMC	$\alpha$	$\beta$	$DT_{50}$ (days) <sup>b</sup>	$\chi^2$	$R^2$	EF (-) <sup>c</sup>	CRM (-) <sup>d</sup>	RMSE (%) <sup>e</sup>
S	$3.83 \times 10^4$	$6.47 \times 10^6$	117	12.6	0.905	0.90	0.00	14.7
S + SMS	$3.62 \times 10^4$	$6.47 \times 10^6$	123	9.8	0.945	0.94	-0.01	11.5
S + GC	$3.11 \times 10^4$	$6.51 \times 10^6$	145	10.1	0.924	0.92	-0.01	11.8

<sup>a</sup>  $DT_{50} = \ln 2/k$ .

<sup>b</sup>  $DT_{50} = \beta \times [2^{(1/\alpha)} - 1]$ .

<sup>c</sup> Efficiency.

<sup>d</sup> Coefficient of residual mass.

<sup>e</sup> Root mean square error.

et al. (1999, 2001), who showed that the flufenacet dissipation kinetics followed the SFO model in unamended soil under field conditions. At the end of the experiment (339 days), the residues of flufenacet were 7.02% in S, 7.89% in S + SMS and 2.67% in S + GC (% of initial amounts), showing that flufenacet dissipation increased for all soil treatments at the end of the experimental period. The degradation rates of flufenacet were lower than those of chlorotoluron in the three soils (Tables 1 and 2), although the residual amounts of flufenacet after 339 days were lower than those of chlorotoluron in S and S + GC soils. This is in agreement with what is frequently observed as flufenacet is less water soluble and more hydrophobic than chlorotoluron (PPDB, 2019). The  $DT_{50}$  of flufenacet were higher in amended soils than in unamended soil following the order:  $S < S + SMS < S + GC$  (Table 2). Sixty days after treatment, the residual amounts of flufenacet in S + SMS (90% of initial applied) and S + GC (92%) soils were strongly higher than in the unamended soil S (69%) (Fig. 3). The rapid dissipation of flufenacet in S soil compared to that in S + SMS and S + GC is related to its adsorption as  $K_d$  values increase as follows:  $S (1.038 \text{ L kg}^{-1}) < S + GC (2.909 \text{ L kg}^{-1}) < S + SMS (6.340 \text{ L kg}^{-1})$  (Carpio et al., 2020) (Table S5). This is in agreement with the findings of Gajbhiye and Gupta (2001), who observed an increase in the persistence of flufenacet in soils with higher adsorption capacity.

The  $DT_{50}$  of flufenacet in the unamended soil S (117 days) was found to be higher than those reported for unamended agricultural soils under field conditions (from 14.2 to 68.1 days) (PPDB, 2019). This result can be explained by the different seasons of the year during which the dissipation studies were carried out. Indeed, the dissipation of flufenacet under field conditions was shown to be accelerated during spring and summer when temperatures were higher than in winter because of the associated increased microbial activities in soil (Rouchaud et al., 1999, 2001). In our study, the herbicides were applied at the end of autumn (1 December 2016) with minimum temperatures ranging from  $-11.6$  to  $8.8$  °C up to the  $DT_{50}$  of flufenacet was reached in all treatments (145 days after the application, Table 2). These low temperatures could have contributed to a decrease in the soil microbial activity, knowing that microbial degradation drives flufenacet dissipation (Milan et al., 2013). It has to be noted that the dissipation pattern of flufenacet in the field was different from that observed in laboratory, as shown for chlorotoluron, since flufenacet was more persistent in the field than in the laboratory (Marín-Benito et al., 2019). These results also corroborate the  $DT_{50}$  reported by the Pesticide Properties DataBase (PPDB, 2019).

In any case over the experimental period, the flufenacet ESA metabolite was not detected, and the flufenacet OA metabolite was only detected at concentrations below the LOQ, although the formation of flufenacet metabolites in unamended soil under field conditions has been reported (Bloomberg et al., 2002; Lam et al., 2002), as well as their formation under laboratory conditions (Marín-Benito et al., 2019). However, in our field experiment, the high DOC content of S + SMS and S + GC soil may have enhanced the degradation and/or the downward mobility of the herbicide over time (Marín-Benito et al., 2020). In addition, other processes contributing to flufenacet dissipation, such as mineralization and/or the formation of bound residues, could have occurred (EC, 2003).

### 3.3. Modelling herbicide persistence

The performance of MACRO to simulate the dissipation of chlorotoluron in the top 10 cm of the three soil treatments was very good, as shown by the high  $EF$  values (Ritter and Muñoz-Carpena, 2013), the  $CRM$  values close to zero and the low  $RMSE$  values (Table 3, Fig. 1). The measured concentrations of chlorotoluron in S and S + SMS soils were weakly underestimated by MACRO while they were weakly overestimated in the S + GC treatment (Table 3). For flufenacet, the simulated concentrations values agreed closely with the observed data (Fig. 3), and the ability of MACRO to reproduce the dissipation of

**Table 3**

Goodness-of-fit statistics for MACRO modelling of the dissipation of chlorotoluron and flufenacet in the top 10 cm of the unamended (S), spent mushroom substrate- and green compost-amended (S + SMS and S + GC) soils.

	$EF (-)^a$	$CRM (-)^b$	$RMSE (\%)^c$
S			
Chlorotoluron	0.94	0.01	14.5
Flufenacet	0.82	-0.02	20.3
S + SMS			
Chlorotoluron	0.95	0.04	13.1
Flufenacet	0.91	-0.10	14.2
S + GC			
Chlorotoluron	0.94	-0.03	15.1
Flufenacet	0.97	-0.02	6.8

<sup>a</sup> Efficiency.

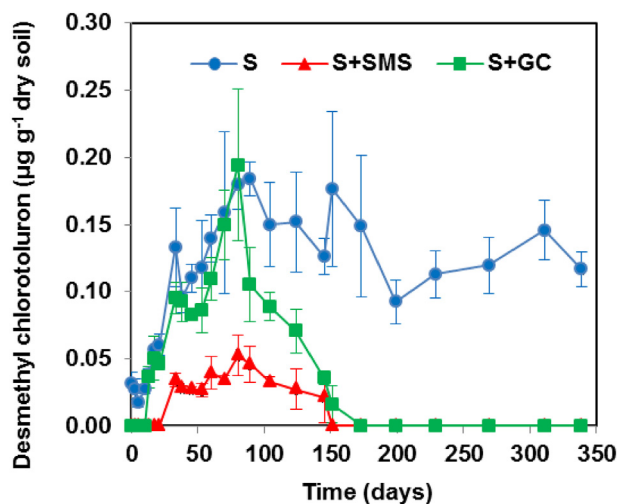
<sup>b</sup> Coefficient of residual mass.

<sup>c</sup> Root mean square error.

this herbicide can be denoted as good for the unamended soil S and very good for S + SMS and S + GC soils (Ritter and Muñoz-Carpena, 2013) (Table 3). MACRO slightly overestimated the dissipation of flufenacet in the three soil treatments ( $CRM < 0$ , Table 3). In general, for both herbicides in the three soils, the MACRO simulation results were within the standard deviation of the mean remaining percentages observed (Figs. 1 and 3).

The comparison of fitted and simulated  $DT_{50}$  and  $DT_{90}$  (time to 90% dissipation, days) values showed that they closely agreed for chlorotoluron in the three soils (Table 4, Figs. 1 and 3). The coefficients of variation (CV) of the  $DT_{50}$  and  $DT_{90}$  in the unamended and amended soils ranged from 4% to 16% and from 4% to 32%, respectively (Table 4). For flufenacet, MACRO predictions were worse than for chlorotoluron in most of the soil treatments, with CV of the  $DT_{50}$  ranging from 10% to 28%, and those of  $DT_{90}$  ranging from 7% to 39% (Table 4, Fig. 3). As indicated above, processes such as the formation of non-extractable residues, which are not simulated by MACRO, could explain the higher ability of the model to estimate the fitted  $DT_{50}$  and  $DT_{90}$  of chlorotoluron than of flufenacet with higher adsorption capacity (Table S5).

For both herbicides, the simulated  $DT_{90}$  (persistence) were generally lower than the fitted ones in all soil treatments (Table 4). The high CV of  $DT_{90}$  compared to those of  $DT_{50}$  in the unamended soils (Table 4) indicate that the model efficiency to reproduce the dissipation of the herbicides in natural soils decreases with simulation time. The model showed a tendency to underestimate the remaining amounts of both herbicides in the unamended soils one year after the application. This tendency



**Fig. 3.** Formation of desmethyl chlorotoluron, in unamended (S), spent mushroom substrate (S + SMS)- and green compost (S + GC)-amended soils over time. Bars indicate the standard deviation of the mean ( $n = 9$ ).

**Table 4**

Fitted (SFO or FOMC) and simulated (MACRO) DT<sub>50</sub> and DT<sub>90</sub> (days) of chlorotoluron and flufenacet in the top 10 cm of the unamended (S), spent mushroom substrate- and green compost-amended (S + SMS and S + GC) soils, and coefficients of variation (CV, %).

Parameter	Chlorotoluron			Flufenacet		
	S	S + SMS	S + GC	S	S + SMS	S + GC
DT <sub>50</sub> fitted	66.2	88.0	73.6	117	123	145
DT <sub>50</sub> MACRO	72.5	93.0	92.0	96.0	184	167
CV DT <sub>50</sub>	6	4	16	14	28	10
DT <sub>90</sub> fitted	301	292	245	389	411	482
DT <sub>90</sub> MACRO	191	277	230	220	452	375
CV DT <sub>90</sub>	32	4	4	39	7	18

Note: DT<sub>50</sub> and DT<sub>90</sub>, dissipation time values observed in Figs. 1 and 3 when dissipation of 50% or 90% of the herbicide was reached taking into account fitted (SFO or FOMC) and simulated (MACRO) kinetic curves.

could reduce the use of the pesticide fate model as predictive tool in unamended soils. This is consistent with the results of Garratt et al. (2002) and Martínez et al. (1994). Nevertheless, the use of DT<sub>50</sub> obtained from laboratory experiments as input in the MACRO model allows satisfactory simulation of the dissipation of chlorotoluron and flufenacet under amended field conditions, and especially that of chlorotoluron which has the lowest persistence.

#### 4. Conclusions

The field dissipation kinetics of two cereals herbicides, chlorotoluron and flufenacet, fitted well the SFO model in unamended and amended soils, except that of chlorotoluron that fitted the FOMC model better in the unamended soil. The application of the SMS and GC organic amendments to soil slowed down the dissipation rates of chlorotoluron and flufenacet compared to unamended soils as previously observed under controlled laboratory conditions. However, the DT<sub>50</sub> of chlorotoluron and flufenacet under field conditions were higher than those obtained in laboratory highlighting the importance of changing environmental conditions on the dissipation process. These changes also affected the formation rates of their metabolites at field scale compared with those at laboratory.

The field dissipation kinetics of both herbicides were then simulated with the MACRO pesticide fate model parameterized with laboratory data. The results showed that MACRO might be reasonably used as a tool to estimate the remaining amounts of herbicides in the root zone of amended soils knowing their DT<sub>50</sub> and K<sub>d</sub> previously obtained from laboratory experiments. Therefore, MACRO can help to assess if an herbicide can be applied in amended soils without causing damage on succeeding crop. This would help to manage herbicide doses in different environmental conditions to preserve the sustainability of agricultural systems.

#### CRedit authorship contribution statement

**Jesús M. Marín-Benito:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing - review & editing. **M. José Carpio:** Investigation, Visualization, Writing - review & editing. **Laure Mamy:** Writing - original draft, Writing - review & editing. **M. Soledad Andrades:** Conceptualization. **María J. Sánchez-Martín:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing - review & editing. **M. Sonia Rodríguez-Cruz:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

This work has been funded by MINECO/FEDER UE (Project AGL2015-69485-R) and MCIU/AEI/FEDER, UE (Project RTI2018-101587-J-I00). J.M. Marín-Benito thanks MINECO for his Juan de la Cierva-Incorporación (IJCI-2014-19538) contract. M.J. Carpio thanks for her predoctoral contract co-funded by European Social Fund (ESF) and the Consejería de Educación (Junta de Castilla y León Government). The authors thank J.M. Ordax for his technical assistance.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138374>.

#### References

- Bai, Z., Caspari, T., Gonzalez, M.R., Batjes, N.H., Mäder, P., Bünenmann, E.K., de Goede, R., Brussaard, L., Xu, M., Ferreira, C.S.S., Reintam, E., Fan, H., Mihelič, R., Glavan, M., Tóth, Z., 2018. Effects of agricultural management practices on soil quality: a review of long-term experiments for Europe and China. *Agric. Ecosyst. Environ.* 265, 1–7.
- Barba, V., Marín-Benito, J.M., García-Delgado, C., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2019. Assessment of <sup>14</sup>C-prosulcarb dissipation mechanism in soil after amendment and its impact on the microbial community. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 182, 109395.
- Bloomberg, A.M., Shadrack, B.A., Arthur, E.L., Clay, V.E., 2002. Outdoor soil metabolism of [phenyl-<sup>14</sup>C] flufenacet on California soils. *Pestic. Environ. Fate* 813, 167–182. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bk-2002-0813.ch012>.
- Boesten, J.J.T.I., 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. *Agric. Water Manag.* 44, 21–42.
- Cañero, A.I., Becerra, D., Cornejo, J., Hermosín, M.C., Albarrán, Á., López-Piñero, A., Cox, L., 2012. Transformation of organic wastes in soil: effect on bentazone behaviour. *Sci. Total Environ.* 433, 198–205.
- Carpio, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., García-Delgado, C., Sánchez-Martín, M.J., Marín-Benito, J.M., 2020. Mobility monitoring of two herbicides in amended soils: a field study for modeling applications. *J. Environ. Manag.* 260, 110161.
- Cassigneul, A., Benoit, P., Nobile, C., Bergheud, V., Dumény, V., Etiévant, V., Maylin, A., Justes, E., Alletto, L., 2018. Behaviour of 5-metolachlor and its oxanilic and ethanesulfonic acids metabolites under fresh vs. partially decomposed cover crop mulches: a laboratory study. *Sci. Total Environ.* 631–632, 1515–1524.
- Dubus, I.G., Brown, C.D., Beulke, S., 2003. Sensitivity analyses for four pesticide leaching models. *Pest Manag. Sci.* 59, 962–982.
- EC (European Commission. Directorate-General Health & Consumer Protection), 2003. *Review Report for the Active Substance Flufenacet* (30 pp).
- EC (European Commission. Directorate-General Health & Consumer Protection), 2005. *Review Report for the Active Substance Chlorotoluron* 54 pp.
- FOCUS (Forum for Co-ordination of pesticide fate models and their Use), 2000. *FOCUS Groundwater Scenarios in the EU Review of Active Substances. Report of the FOCUS Groundwater Scenarios Workgroup EC Document Reference Sanco/321/2000 rev.2* (202 pp).
- FOCUS (Forum for Co-ordination of pesticide fate models and their Use), 2006. *Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics. EC Documents Reference Sanco/10058/2005 Version 2.0* 434 pp.
- Gajbhiye, V.T., Gupta, S., 2001. Adsorption-desorption behavior of flufenacet in five different soils of India. *Pest Manag. Sci.* 57, 633–639.
- García-Delgado, C., Barba, V., Marín-Benito, J.M., Igual, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2019. Influence of different agricultural management practices on soil microbial community over dissipation time of two herbicides. *Sci. Total Environ.* 646, 1478–1488.
- Garratt, J.A., Capri, E., Trevisan, M., Errera, G., Wilkins, R.M., 2002. Parameterisation, evaluation and comparison of pesticide leaching models to data from a Bologna field site, Italy. *Pest Manag. Sci.* 58, 3–20.
- Gross, D., Laanio, T., Dupuis, G., Esser, H.O., 1979. The metabolic behavior of chlorotoluron in wheat and soil. *Pestic. Biochem. Physiol.* 10, 49–59.
- Holvoet, K.M., Seuntjens, P., Vanrolleghem, P.A., 2007. Monitoring and modeling pesticide fate in surface waters at the catchment scale. *Ecol. Model.* 209, 53–64.
- IUSS Working Group WRB, 2015. World reference base for soil resources 2014, update 2015. *World Soil Resources Reports No. 106*. FAO, Rome ISSN 0532-0488.
- James, R.M., Esau, R., Boswall, A.L., 1999. Effects of quinlorac on following rotational crops. *Weed Technol.* 13, 548–553.

- Kodesová, R., Kocárek, M., Hajková, T., Hýbler, M., Drábek, O., Kodes, V., 2012. Chlorotoluron mobility in compost amended soil. *Soil Tillage Res.* 118, 88–96.
- Lam, C.K., McKinney, M.K., Clay, V.E., 2002. Evaluation of laboratory and field extraction methods: extraction of [phenyl- $U-^{14}C$ ] flufenacet from aged soils. *Pestic. Environ. Fate* 813, 155–166. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bk-2002-0813.ch011>.
- Larsbo, M., Jarvis, N., 2003. MACRO 5.0. A Model of Water Flow and Solute Transport in Macroporous Soil. Technical Description. Rep Emergo, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden (49 pp).
- Marín-Benito, J.M., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2012. Dissipation of fungicides in a vineyard soil amended with different spent mushroom substrates. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6936–6945.
- Marín-Benito, J.M., Barba, V., Ordax, J.M., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2018. Application of green compost as amendment in an agricultural soil: effect on the behavior of triasulfuron and prosulfocarb under field conditions. *J. Environ. Manag.* 207, 180–191.
- Marín-Benito, J.M., Carpio, M.J., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2019. Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: effect of the temperature and the organic amendments. *Sci. Total Environ.* 653, 1301–1310.
- Marín-Benito, J.M., Mamy, L., Carpio, M.J., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2020. Modelling herbicides mobility in amended soils: calibration and test of PRZM and MACRO. *Sci. Total Environ.* 717, 137019.
- Martínez, L., Lechón, Y., Sanchez-Brunete, C., Tadeo, J.L., 1994. Alachlor persistence under Spanish field conditions and applicability of simulation-models. *Soil Sci.* 158, 337–344.
- Milan, M., Ferrero, A., Letey, M., De Palo, F., Vidotto, F., 2013. Effect of buffer strips and soil texture on runoff losses of flufenacet and isoxaflutole from maize fields. *J. Environ. Sci. Health B* 48, 1021–1033.
- OECD-FAO, 2019. OECD-FAO Agricultural Outlook (Edition 2018). OECD Agriculture Statistics (Database) (accessed 20 December 2019).
- Palansooriya, K.N., Ok, Y.S., Awad, Y.M., Lee, S.S., Sung, J.-K., Koutsospyros, A., Moon, D.H., 2019. Impacts of biochar application on upland agriculture: a review. *J. Environ. Manag.* 234, 52–64.
- Palhano, M.G., Norsworthy, J.K., Barber, T., 2018. Sensitivity and likelihood of residual herbicide carryover to cover crops. *Weed Technol.* 32, 236–243.
- Papadopoulou, E.S., Karas, P.A., Nikolaki, S., Storck, V., Ferrari, F., Trevisan, M., Tsiamis, G., Martin-Laurent, F., Karpouzias, D.G., 2016. Dissipation and adsorption of isoproturon, tebuconazole, chlorpyrifos and their main transformation products under laboratory and field conditions. *Sci. Total Environ.* 569–570, 86–96.
- PPDB, 2019. Pesticide Properties Data Base. University of Hertfordshire, UK <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> accessed 2 December 2019.
- Ritter, A., Muñoz-Carpena, R., 2013. Performance evaluation of hydrological models: statistical significance for reducing subjectivity in goodness-of-fit assessments. *J. Hydrol.* 480, 33–45.
- Rodríguez-Liébana, J.A., ElGouzi, S., Mingorance, M.D., Castillo, A., Peña, A., 2014. Irrigation of a Mediterranean soil under field conditions with urban wastewater: effect on pesticide behaviour. *Agric. Ecosyst. Environ.* 185 (176–185). <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.12.026>.
- Rouchaud, J., Neus, O., Cools, K., Bulcke, R., 1999. Flufenacet soil persistence and mobility in corn and wheat crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 460–466. <https://doi.org/10.1007/s001289901002>.
- Rouchaud, J., Neus, O., Bulcke, R., Cools, K., Eelen, H., Dekkers, 2000. Soil dissipation of diuron, chlorotoluron, simazine, propyzamide, and diflufenican herbicides after repeated applications in fruit tree orchards. *Arch. Environ. Toxicol.* 39, 60–65.
- Rouchaud, J., Neus, O., Eelen, H., Bulcke, R., 2001. Persistence, mobility, and adsorption of the herbicide flufenacet in the soil of winter wheat crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 609–616.
- Sarmah, A.K., Close, M.E., 2009. Modelling the dissipation kinetics of six commonly used pesticides in two contrasting soils of New Zealand. *J. Environ. Sci. Health B* 44, 507–517.
- Scursoni, J.A., Montoya, J.C., Vigna, M.R., Gigón, R., Istilart, C., Renzi Pugni, J.P., López, R., Porfiri, C., 2017. Impact of imazamox and imazapyr carryover on wheat, barley and oat. *Weed Technol.* 31, 838–846.
- Smith, J., Smith, P., Addiscott, T., 1996. Quantitative methods to evaluate and compare soil organic matter (SOM) models. *NATO ASI Series* 38, 181–199.
- Sparks, D.L., 1996. Methods of Soil Analysis. Part 3—Chemical Methods. Soil Science Society of America, Inc, Madison, WI.
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., Rohan, M., 2014. Deriving sulfamethoxazole dissipation endpoints in pasture soils using first order and biphasic kinetic models. *Sci. Total Environ.* 488, 146–1565.
- Su, W., Hao, H., Ding, M., Wu, R., Xu, H., Xue, F., Shen, C., Sun, L., Lu, C., 2019. Adsorption and degradation of imazapic in soils under different environmental conditions. *PLoS One* 14, e0219462.
- Thiour-Mauprivez, C., Martin-Laurent, F., Calvayrac, C., Barthelmebs, L., 2019. Effects of herbicide on non-target microorganisms: towards a new class of biomarkers? *Sci. Total Environ.* 684, 314–325.
- Vieublé Gonod, L., El Arfaoui, A., Benoit, P., 2016. Impact of spatial distribution of exogenous organic matter on C mineralization and isoproturon fate in soil. *Soil Biol. Biochem.* 95, 180–188.
- Willkommen, S., Pfannerstill, M., Ulrich, U., Guse, B., Fohrer, N., 2019. How weather conditions and physico-chemical properties control the leaching of flufenacet, diflufenican, and pendimethalin in a tile-drained landscape. *Agric. Ecosyst. Environ.* 278, 107–116.

**CAPÍTULO 4**  
**MATERIAL SUPLEMENTARIO**



## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### **FIELD MEASUREMENT AND MODELLING OF CHLOROTOLURON AND FLUFENACET PERSISTENCE IN UNAMENDED AND AMENDED SOILS**

Jesús M. Marín-Benito<sup>a</sup>, M. José Carpio<sup>a</sup>, Laure Mamy<sup>b</sup>, M. Soledad Andrades<sup>c</sup>, María J. Sánchez-Martín<sup>a</sup>, M. Sonia Rodríguez-Cruz<sup>a,\*</sup>

*<sup>a</sup>Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain*

*<sup>b</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS 78850 Thiverval-Grignon, France*

*<sup>c</sup>Department of Agriculture and Food, University of La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain*

\*Corresponding author: [msonia.rodriguez@irnasa.csic.es](mailto:msonia.rodriguez@irnasa.csic.es) (M. Sonia Rodríguez-Cruz)

Number of Pages: 7

Number of Tables: 5

**Table S1.** Main physicochemical and hydraulic characteristics of the top 10 cm of unamended (S), spent mushroom substrate (S+SMS)- and green compost (S+GC)-amended soils.

	S	S+SMS	S+GC
Sand (%)	80.4	76.7	78.7
Silt (%)	4.7	5.8	4.7
Clay (%)	14.9	16.5	16.6
pH	6.34	7.11	6.99
Bulk density (g cm <sup>-3</sup> )	1.48	1.23	1.34
OC (%)	0.77	2.64	1.69
DOC (mg g <sup>-1</sup> )	0.12	0.50	0.38
$\theta_{\text{initial}}$ (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0.183	0.279	0.244
$\theta_r$ (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup>	0.01	0.01	0.01
$\theta_s$ (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup>	0.383	0.472	0.428
$\alpha$ (cm <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	0.087	0.068	0.078
n (-) <sup>a</sup>	1.339	1.240	1.290
$K_{\text{sat}}$ (mm h <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	76.41	75.79	76.08
CTEN (cm) <sup>b</sup>	10	10	10
$\theta_b$ (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> ) <sup>c</sup>	0.332	0.422	0.378
$K_b$ (mm h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	1.413	0.789	1.083
ASCALE (mm) <sup>c</sup>	15	15	15
ZN (-) <sup>c</sup>	4	4	4

Note: The parameters without exponent correspond to measured values taken from Carpio et al. (2020).

<sup>a</sup> Estimated by HYPRES pedotransfer functions (Wösten et al., 1999).

<sup>b</sup> Default value (Larsbo and Jarvis, 2003).

<sup>c</sup> Estimated using the pedotransfer functions included in MACRO 5.2.

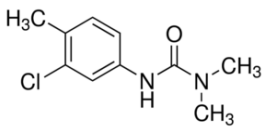
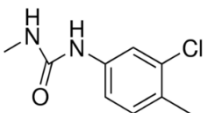
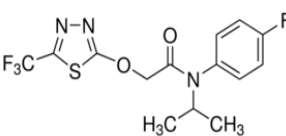
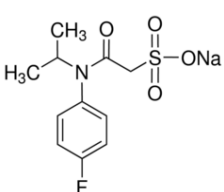
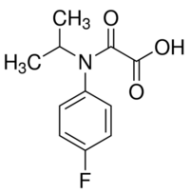


**Table S2.** Characteristics of the organic amendments: spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC) (% on a dry weight basis).

	SMS	GC
pH	7.9	7.2
electric conductivity (S/m)	0.78	0.22
ash (%)	40.6	54.0
moisture (%)	37.7	48.6
OM <sup>a</sup> (%)	59.4	46.0
DOC <sup>b</sup> (mg g <sup>-1</sup> )	11.9	7.2
OC <sup>c</sup> (%)	35.0	26.7
N (%)	2.3	1.1
C/N	15.2	24.3
CEC <sup>d</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	35.1	41.4
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	59.5	40.3
K <sub>2</sub> O (mg/100g)	858	458
CaO (mg/100g)	1774	757.3
MgO (mg/100g)	177.7	126.5

<sup>a</sup> Organic matter; <sup>b</sup> Dissolved organic carbon; <sup>c</sup> Organic carbon; <sup>d</sup> Cationic exchange capacity.

**Table S3.** Main characteristics of herbicides and their metabolites.

Common name Chemical structure	IUPAC name	WS <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Log Kow <sup>b</sup>	Field DT <sub>50</sub> <sup>c</sup> (days)	GUS index <sup>d</sup>	K <sub>oc</sub> <sup>e</sup> (mL g <sup>-1</sup> )
Chlorotoluron 	3-(3-chloro-p-tolyl)- 1,1-dimethylurea	74	2.5	34	3.02	196
Desmethyl chlorotoluron 	3-(3-chloro-p-tolyl)- 1-methylurea	-	-	60	2.84	248
Flufenacet 	4'-fluoro- <i>N</i> - isopropyl-2-[5- (trifluoromethyl)- 1,3,4-thiadiazol-2- yl]oxy]acetanilide	51	3.5	39.0	2.02	401
Flufenacet ESA 	2-(4-fluoro- <i>N</i> - propan-2-ylanilino)- 2-oxoethanesulfonic acid	5500	-	302	7.20	12.5
Flufenacet OA 	((4-fluorophenyl) (isopropyl)amino) (oxo)acetic acid	-	-	11.1	2.98	14.0

<sup>a</sup> WS, water solubility at 20°C; <sup>b</sup> Octanol/water partition coefficient at pH 7 and 20°C; <sup>c</sup> Half-life dissipation time in field conditions; <sup>d</sup> Groundwater Ubiquity Score (Gustafson, 1989); <sup>e</sup> Adsorption coefficient corrected for soil organic carbon content (PPDB, 2019).

**Table S4.** Crop input parameters for winter wheat in unamended (S) / spent mushroom substrate-amended (S+SMS) / green compost-amended (S+GC) soils.

Date	Crop development	LAI (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> ) <sup>b</sup>	Root depth (m) <sup>a</sup>	Root distribution <sup>a,c</sup>
14 Nov. 2016	sowing			
3 Dec. 2016	emergence	0.00	0.01/0.01/0.01	
5 May 2017	flowering	0.30/2.25/0.60	0.21/0.21/0.21	0.90/0.90/0.90
3 July 2017	harvest	0.30/2.25/0.60	0.21/0.21/0.21	

<sup>a</sup> Determined from field measurements or observations.

<sup>b</sup> Estimated from COVMAX (-) = LAI / 3 (Kroes et al., 2008), where COVMAX is the maximum areal coverage of the canopy determined from field measurements (=10%, 75% and 20% for S, S+SMS and S+GC, respectively), and LAI is the leaf area index.

<sup>c</sup> Fraction of root density in the uppermost 25% of the root depth.

**Table S5.** Main herbicide input parameters used in the simulations in unamended (S), spent mushroom substrate (S+SMS)- and green compost (S+GC)-amended soils.

	Chlorotoluron			Flufenacet		
	S	S+SMS	S+GC	S	S+SMS	S+GC
<i>Adsorption</i>						
$K_d$ (mL g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	0.773	4.773 (1.114)	2.563 (0.783)	1.038	6.340	2.909
$n_f$ <sup>b</sup>	0.83	0.92	0.92	0.85	0.99	0.80
<i>Degradation</i>						
DT <sub>50</sub> (days) <sup>c</sup>	38.6	51.3	67.6	49.3	93.9	91.7
TRESP (K <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	0.083	0.064	0.103	0.083	0.083	0.092
<i>Other characteristics</i>						
DV (cm) <sup>e</sup>	10	12	10	10	12	10

<sup>a</sup> Adsorption coefficients from laboratory experiments with unamended and amended soil samples taken *in situ* (Carpio et al., 2020). Values in brackets correspond to calibrated values according to DOC (Marín-Benito et al., 2020).

<sup>b</sup> Freundlich exponents from laboratory experiments with the unamended control S, and amended with SMS- and GC soils at laboratory scale (García-Delgado et al., 2020).

<sup>c</sup> Degradation half-life from Marín-Benito et al. (2019).

<sup>d</sup> Exponent in the temperature response function estimated from TRESP= (ln Q<sub>10</sub>) / 10, where Q<sub>10</sub> factor is taken from Marín-Benito et al. (2019).

<sup>e</sup> Dispersivity fitted manually from the observed Br<sup>-</sup> concentrations (Marín-Benito et al., 2020).

## Dissipation kinetic models

The dissipation kinetics for the herbicide was fitted to a single first-order (SFO) kinetic model ( $C = C_0 e^{-kt}$ ) or first order multi-compartment (FOMC) model ( $C = C_0 / ((t / \beta) + 1)^\alpha$ ), known also as the Gustafson and Holden model.  $C$  is the herbicide concentration at time  $t$ ,  $C_0$  is the initial herbicide concentration,  $k$  ( $\text{day}^{-1}$ ) is the dissipation rate,  $\alpha$  is a shape parameter determined by the coefficient of variation of  $k$  values and  $\beta$  is a location parameter. For the selection of the kinetic model that best describes the dissipation results, FOCUS work group guidance recommendations were followed (FOCUS, 2006). The coefficient of determination ( $r^2$ ) and the chi-square ( $\chi^2$ ) test were calculated as indicators of the goodness of fit. The  $\chi^2$  test considers the deviations between observed and calculated values relative to the uncertainty of the measurements for a specific fit, and was used to compare the goodness of fit of the two models tested. The error value at which the  $\chi^2$  test is fulfilled at a given degree of freedom should be below 15% (at 5% significance level). The time to 50% and 90% dissipation, or  $DT_{50}$  and  $DT_{90}$  values, were used to characterise the decay curves and compare variations in dissipation rates. The parameters of the kinetic models were estimated using the Excel Solver add-in Package (Marín-Benito et al., 2012).

## References

- Carpio, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., García-Delgado, C., Sánchez-Martín, M.J., Marín-Benito, J.M. 2020. Mobility monitoring of two herbicides in amended soils: A field study for modeling applications. *J. Environ. Manag.* 260, 110161.
- FOCUS (FORum for Co-ordination of pesticide fate models and their Use), 2006. Guidance Document on estimating persistence and degradation kinetics from environmental fate studies on pesticides in EU registration. Report of the FOCUS work group on degradation kinetics. EC Documents Reference Sanco/10058/2005 version 2.0 (434 pp).
- García-Delgado, C., Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2020. Organic carbon nature determines the capacity of organic amendments to adsorb pesticides in soil. *J. Hazard. Mater.* 290, 122162.
- Gustafson, D.I., 1989. Groundwater ubiquity score: A simple method for assessing pesticide leachability. *Environ. Tox. Chem.* 8, 339-357.
- Kroes, J.G., Van Dam, J.C., Groenendijk, P., Hendriks, R.F.A., Jacobs, C.M.J., 2008. *SWAP version 3.2. Theory description and user manual*. Alterra Report 1649, Swap32 Theory description and user manual. Wageningen, The Netherlands (262 pp).
- Kroes, J.G., Van Dam, J.C., Groenendijk, P., Hendriks, R.F.A., Jacobs, C.M.J., 2008. *SWAP version 3.2. Theory description and user manual*. Alterra Report 1649, Swap32 Theory description and user manual. Wageningen, The Netherlands (262 pp).
- Larsbo, M., Jarvis, N., 2003. MACRO 5.0. A model of water flow and solute transport in macroporous soil. Technical description. Rep Emergo, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden (49 pp).
- Marín-Benito, J.M., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2012. Dissipation of fungicides in a vineyard soil amended with different spent mushroom substrates. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6936–6945.
- Marín-Benito, J.M., Carpio, M.J., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2019. Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: Effect of the temperature and the organic amendments. *Sci. Total Environ.* 653, 1301–1310.
- Marín-Benito, J.M., Mamy, L., Carpio, M.J., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2020. Modelling herbicides mobility in amended soils: calibration and test of PRZM

and MACRO. *Sci. Tot. Environ.* (Available online 30 January 2020, 137019).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137019>.

PPDB, 2019. Pesticide Properties Data Base. University of Hertfordshire, UK  
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> (accessed 2 December 2019).

Wösten, J.H.M., Lilly, A., Nemes, A., Le Bas, C., 1999. Development and use of a database of hydraulic properties of European soils. *Geoderma* 90, 169–185.





# CAPÍTULO 5

## RESUMEN



## **CAPÍTULO 5: Accelerated dissipation of two herbicides after repeated application in field experiments with organically-amended soil.**

### **RESUMEN**

Los residuos orgánicos compostados, aplicados en suelos agrícolas como enmiendas orgánicas, pueden mejorar la calidad de suelos degradados con bajo contenido en materia orgánica (MO) y poca fertilidad, aunque al mismo tiempo pueden modificar el comportamiento de los pesticidas aplicados simultáneamente. El carbono orgánico (CO) y el carbono orgánico disuelto (COD) de las enmiendas orgánicas pueden influir en los procesos de adsorción, movilidad y degradación de los pesticidas en el suelo. Los estudios de disipación y persistencia de pesticidas en suelos enmendados con residuos orgánicos bajo condiciones de campo son poco frecuentes y, por lo general, sólo evalúan la disipación de los pesticidas después de una única aplicación. Sin embargo, la aplicación repetida de pesticidas durante sucesivos ciclos de un mismo cultivo es una práctica habitual, especialmente en agricultura convencional. En este caso, la velocidad de disipación de los pesticidas puede acelerarse por una biodegradación más rápida de los mismos, resultado de la adaptación de los microorganismos del suelo, lo que podría afectar a su persistencia y reducir su eficacia contra las malas hierbas. La disipación de pesticidas aplicados de forma repetida puede además verse afectada por los cambios en las condiciones climáticas durante cada ciclo de cultivo con el posible riesgo de contaminación del suelo y/o agua.

Por tanto, los objetivos de este trabajo fueron: i) estudiar la cinética de disipación en campo de los herbicidas clorotoluron (CTL) y flufenacet (FNC) aplicados por segundo año consecutivo en la pre-emergencia de trigo de invierno en parcelas experimentales de un suelo franco-arenoso sin enmendar (S) y enmendado con sustrato postcultivo de hongos (S+SMS) o compost vegetal (S+GC), ii) comparar su persistencia con la observada el año anterior después de una primera aplicación en el mismo experimento de campo, y iii) evaluar la influencia de la evolución de las propiedades del suelo y las condiciones climáticas en la disipación y persistencia de los herbicidas a largo plazo.

Los residuos SMS y GC fueron aplicados al suelo en la campaña de cultivo de trigo anterior (noviembre de 2016), a las dosis de 140 y 85 t ha<sup>-1</sup> en peso seco, respectivamente. Las formulaciones comerciales de los herbicidas, Erturon<sup>®</sup> (CTL 50% p/v) y Herold<sup>®</sup> (FNC 40% p/v), se aplicaron en pre-emergencia a las dosis de 15 y 5 kg

i.a.  $\text{ha}^{-1}$ , respectivamente, en noviembre de 2017 (346 días después de la primera aplicación). Las nueve parcelas experimentales de  $81 \text{ m}^2$  estuvieron distribuidas al azar con tres repeticiones por tratamiento de suelo. Se hicieron 18 muestreos de suelo superficial (0 – 10 cm) a distintos tiempos después de la aplicación de los herbicidas durante 225 días, y se determinaron las cantidades remanentes de herbicidas en el suelo. Los datos climáticos se monitorizaron durante todo el experimento en una estación meteorológica ubicada *in situ*.

Las curvas de disipación de los dos herbicidas se ajustaron mejor al modelo cinético de primer orden multicompartimental (FOMC), con valores de  $\chi^2 < 15$  y  $r^2 \geq 0.95$ , que al modelo de primer orden (SFO). Los valores de vida media ( $\text{DT}_{50}$ ) fueron dependientes de las características de los compuestos siendo más elevados para el FNC (más hidrofóbico) que para el CTL (más soluble en agua) en todos los tratamientos. Estos valores de  $\text{DT}_{50}$  oscilaron entre 20.7 – 41.1 días para CTL y entre 42.9 – 75.6 días para FNC, y disminuyeron hasta dos veces en S+SMS y S+GC con respecto a S en ambos herbicidas, siguiendo el orden  $S > S+SMS > S+GC$ .

En el caso de CTL, el mayor contenido en COD en los suelos enmendados podría haber aumentado la cantidad de herbicida en solución y facilitado su disponibilidad y disipación por diferentes procesos (degradación, movilidad, etc.). Un metabolito de CTL (desmetilclortoluron) se detectó en todos los suelos disminuyendo las cantidades detectadas en el siguiente orden  $S+SMS (4.9\%) < S+GC (7.1\%) < S (9.0\%)$ .

En el caso de FNC, se observó una mayor velocidad de disipación en los suelos enmendados durante la primera fase de disipación (valores de  $\text{DT}_{50}$  menores que en S). Este comportamiento podría ser debido a una mayor biodisponibilidad del compuesto facilitada por el mayor contenido en COD de estos suelos como se ha indicado para el CTL, mientras que durante la segunda fase la velocidad de disipación disminuyó en S+SMS y S+GC (valores de  $\text{DT}_{90}$  mayores que en S). Esta desaceleración de la disipación durante la segunda fase podría estar originada por el mayor contenido en CO de los suelos enmendados junto con la disminución del COD con el tiempo, lo cual podría facilitar la formación de residuos enlazados de FNC residual haciendo menos biodisponible al herbicida para su degradación. El metabolito FNC–OA se detectó también en todos los tratamientos pero en concentraciones inferiores al límite de cuantificación.

Los valores de  $\text{DT}_{50}$  de los dos herbicidas disminuyeron hasta cuatro veces

respecto a los calculados después de la primera aplicación, indicando una disipación acelerada de los herbicidas después de la segunda aplicación, especialmente en los suelos enmendados. La alta precipitación acumulada (68.4 mm) durante los 64 días siguientes a la segunda aplicación de los herbicidas podría haber contribuido a la disminución de la persistencia de los compuestos en superficie y a una aceleración de su disipación.

Los resultados ponen de manifiesto que las cinéticas de disipación de CTL y FNC después de su aplicación repetida en suelos naturales y enmendados siguió un patrón diferente al observado después de su aplicación inicial bajo condiciones reales de campo. Factores de los suelos tales como el contenido en CO y COD, y ambientales (altas precipitaciones después de la aplicación de los herbicidas) son claves para explicar los procesos experimentados por los herbicidas que dan lugar al aumento de la velocidad de disipación. La disipación acelerada de CTL y FNC facilita su menor persistencia en los suelos y un manejo agrícola sostenible de los mismos.

Estos resultados apoyan la necesidad de realizar estudios adicionales sobre la posible pérdida de eficacia de los herbicidas en el control de malas hierbas en suelos enmendados, estudios sobre degradación microbiana y aislamiento de microorganismos que degradan los herbicidas después de su aplicación repetida, y estudios sobre los efectos de distintas dosis de residuos orgánicos en la disipación de herbicidas.







**CAPÍTULO 5**  
**ARTÍCULO PUBLICADO**





## Article

# Accelerated Dissipation of Two Herbicides after Repeated Application in Field Experiments with Organically-Amended Soil

María José Carpio , Jesús M. Marín-Benito , María J. Sánchez-Martín  and M. Sonia Rodríguez-Cruz \* 

Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40–52, 37008 Salamanca, Spain; mjose.carpio@irnasa.csic.es (M.J.C.); jesusm.marin@irnasa.csic.es (J.M.M.-B.); mjesus.sanchez@irnasa.csic.es (M.J.S.-M.)

\* Correspondence: msonia.rodriguez@irnasa.csic.es; Tel.: +34-923-219-606

**Abstract:** Organic wastes applied as composted amendments may improve the quality of degraded soils and modify the fate of pesticides. This work has set out to study the dissipation kinetics of the herbicides chlorotoluron and flufenacet during their second-year application in field experimental plots with a sandy-loam agricultural soil without amendment (S) and amended with spent mushroom substrate (S + SMS) or green compost (S + GC). The SMS and GC were applied to the soil during the previous winter's wheat crop campaign (1 year before the second herbicide application) at rates of 140 and 85 t ha<sup>-1</sup> (dry weight basis), respectively. The experiment involved randomized complete blocks with plots of 81 m<sup>2</sup>, including three replicates per soil treatment. Surface soils were sampled after herbicide application for 225 days, and herbicide residues in the soil samples were determined by HPLC-MS. The dissipation curves of both herbicides for the three soil treatments were better fitted to the first order multi-compartment (FOMC) kinetic model. The dissipation rates of the most hydrophobic herbicide, flufenacet, were slower than those for chlorotoluron in both unamended and amended soils. The half-life (DT<sub>50</sub>) values ranged between 20.7 to 41.1 days for chlorotoluron, and 42.9 to 75.6 days for flufenacet, and they followed the order S > S + SMS > S + GC. The DT<sub>50</sub> values of chlorotoluron were close for S + SMS and S + GC, and the DT<sub>50</sub> of flufenacet for S was similar to that for S + SMS. These DT<sub>50</sub> values decreased up to four times with respect to those calculated after the first application indicating an accelerated dissipation of the herbicides after the second application especially in amended soil in comparison with unamended soil. The persistence of chlorotoluron and flufenacet in an agricultural soil was modified by the effect of the organic amendments, weather conditions, and possibly the repeated application of the compounds under real field conditions.

**Keywords:** chlorotoluron; flufenacet; commercial formulation; repeated application; soil; spent mushroom substrate; green compost; accelerated dissipation; field plot



**Citation:** Carpio, M.J.; Marín-Benito, J.M.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Accelerated Dissipation of Two Herbicides after Repeated Application in Field Experiments with Organically-Amended Soil. *Agronomy* **2021**, *11*, 1125. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061125>

Academic Editors: Enrique Eymar, Carlos García Delgado and Connor Ferguson

Received: 22 March 2021

Accepted: 27 May 2021

Published: 31 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The composted organic residues applied to soils as amendments to increase the organic matter (OM) in soils with content <1% is a common agricultural management practice which improves soil fertility and quality, as well as crop yields [1]. The organic residues applied to soil as amendments have a high content of organic carbon (OC) and dissolved organic carbon (DOC), which may modify the dynamics (adsorption, mobility, and degradation) of pesticides applied simultaneously to combat pests and diseases [2–4]. The OC content has been positively correlated with the adsorption of hydrophobic compounds with high affinity by organic soil components and amendments [5,6], although functional groups of OC from amendments are also important factors controlling the adsorption-desorption of pesticides by amended soils [6]. On the one hand, DOC is a diverse mixture of complex compounds with different chemical structures and molecular weights that might enhance the formation of multiple interactions with organic pesticides, controlling their distribution in the soil. This is why DOC may increase the adsorption of organic pesticides through

the formation of complexes that are adsorbed by soils, although on the other hand, it may increase the amount of compound in solution through the formation of complexes leached throughout the soil [7–9]. Moreover, organic residues improve soil microbial activity, which has influence on the degradation of pesticides applied in amended soils [10].

The soil dissipation of pesticides depends on several processes, with the most significant ones being degradation, adsorption, and mobility, which control pesticide behavior [11]. The dissipation rate of pesticides after the repeated application of the same pesticide, or another with a similar chemical structure, during several crop cycles may be accelerated by faster pesticide biodegradation due to microorganism adaptation, which affects their persistence and reduces their efficacy against weeds [12–15]. Furthermore, pesticide dissipation under field conditions in the same soil may be influenced by different weather conditions (temperature, precipitation, and solar irradiation) recorded over time [16]. Accelerated pesticide degradation depends on soil properties, such as soil OC content, clay content, pH, moisture content, pesticide structure, microbial activity, degrader growth, plant exudates, environmental factors, and soil management practices [13,14,17]. This phenomenon is well known and has been reported for pesticides under laboratory conditions [4,18,19]. At field scale, accelerated herbicide dissipation has been reported in unamended and amended soils for atrazine [20], butachlor [16,17], metribuzin [21], and sulfosulfuron [15].

Studies on the dissipation and persistence of pesticides in soils amended with organic residues under field conditions are less frequent, and, in general, they only evaluate dissipation after a single application. However, the repeated application of pesticides during successive cycles of the same crop is a common agricultural practice, especially in conventional agriculture, with the consequent risk of soil and/or water contamination [16,22].

The herbicides chlorotoluron and flufenacet are applied at the pre-emergence stage of cereal crops such as winter wheat. Chlorotoluron belongs to the phenylurea family, and records moderate water solubility ( $74 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), low hydrophobicity ( $\log K_{ow}$  2.5), and high leaching potential (GUS index 3.02). Flufenacet is an oxyacetamide with moderate water solubility ( $56 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), high hydrophobicity ( $\log K_{ow}$  3.2), and intermediate capacity for leaching (GUS index 2.23) [23,24].

There are only a few results on the dissipation and persistence of chlorotoluron and flufenacet in unamended and amended soils at field scale [11,25–28], being influenced by soil properties, herbicide characteristics, and environmental conditions. However, the dissipation of chlorotoluron after repeated application in field studies has been assessed solely in unamended soils [29]. To the best of our knowledge, there are no studies on the dissipation of these herbicides after repeated application in field soils amended with organic residues.

This study therefore pursued the following objectives: (i) study the field dissipation kinetics of the herbicides chlorotoluron and flufenacet after their repeated application at the pre-emergence stage of winter wheat in an agricultural soil unamended and amended with two organic residues, (ii) compare their persistence with that observed the previous year after a first application in the same field experiment, and (iii) assess the influence of soil property evolution and weather conditions on the long-term dissipation and persistence of these herbicides. This study is part of a research project carried out under field conditions involving the dissipation and mobility of chlorotoluron and flufenacet over a 2 year experimental period following an initial, single application of the organic residues to the soil [11,30].

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Field Dissipation Study

The organic wastes used as soil amendments originated from *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* (2:1) cultivation (SMS), and from the pruning of plants and trees in parks and gardens (GC). They were composted following an aerobic process, and were supplied by Sustratos de la Rioja S.L. (Pradejón, Spain) and Viveros El Arca S.L. (Salamanca,

Spain), respectively. The soil was an Eutric-Chromic Cambisol (IUSS Working Group WRB, 2015) with a sandy-loam texture (80.4% sand, 4.7% silt, and 14.9% clay). The main physicochemical characteristics of both organic residues and unamended and amended soils were determined in air-dried and sieved (<2 mm) samples (Table 1) by standard analytical methods, as reported by Carpio et al. [30]. Briefly, the DOC content was determined in organic residues extracts 1/100 *w/v* or soil extracts 1/2 *w/v* ratio in deionized water after soil shaking 24 h at 20 °C, centrifugation 20 min at 10,000 rpm, and filtering (Minisart NY 25 filter 0.45 µm, Sartorius Stedim Biotech, Germany). DOC, OC and N content was determined on a LECO CN628 (Saint Joseph, MI, USA) elemental analyzer.

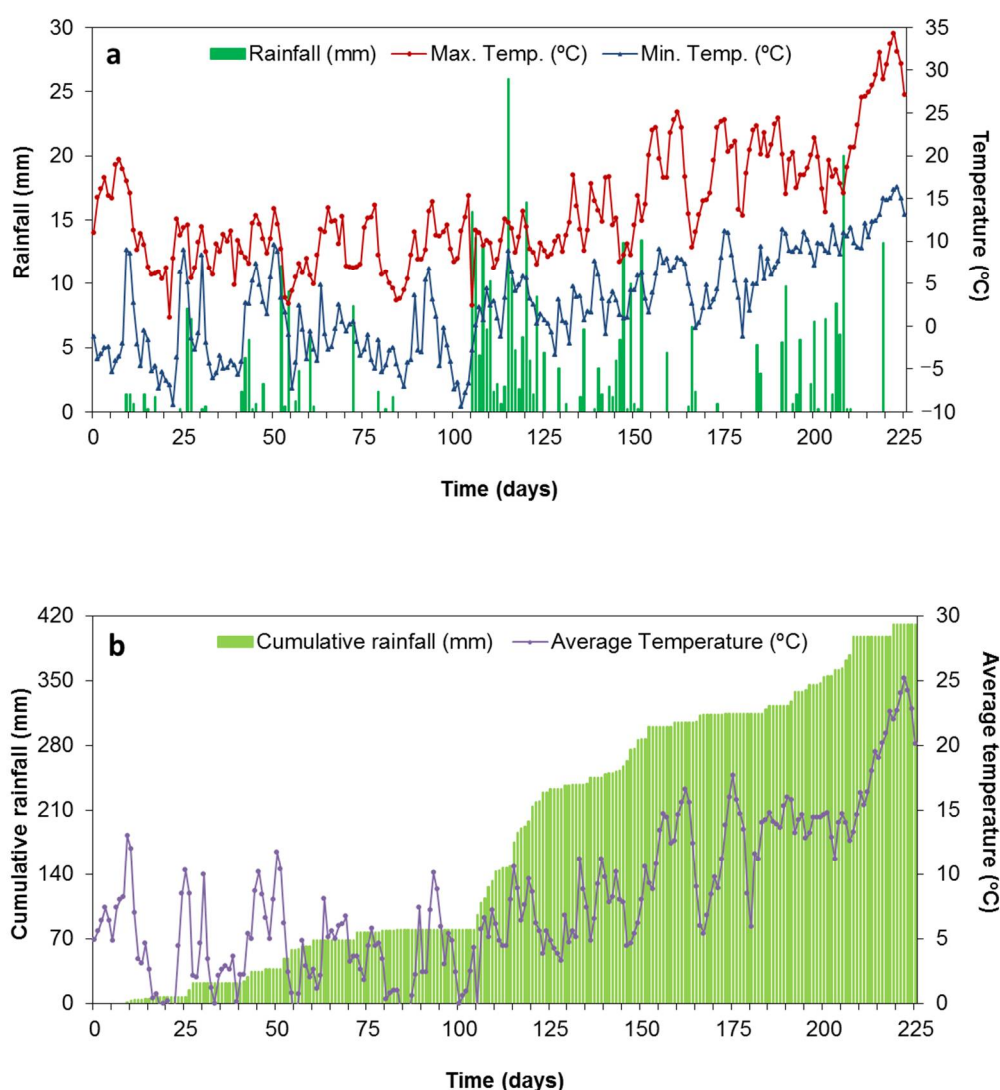
**Table 1.** Characteristics of organic residues spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC), unamended soil (S) and soil amended with SMS (S + SMS) or GC (S + GC). Soil OC and DOC include the range of values determined between 29 and 225 days after the second herbicides' application.

Soil	pH	OC (%) <sup>a</sup>	DOC (mg g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	N (%)	C/N	CEC (cmolc kg <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>
SMS	7.9	35.0	11.9	2.3	15.2	35.1
GC	7.2	26.7	7.18	1.1	24.3	41.4
S	6.3	0.76–0.80	0.37–0.18	0.05	15.2–16.0	8.5
S + SMS	7.1	2.22–2.43	0.75–0.45	0.24	9.25–10.1	10.9
S + GC	7.0	1.65–1.72	0.66–0.33	0.14	11.8–12.3	11.0

<sup>a</sup> Organic carbon; <sup>b</sup> dissolved organic carbon; <sup>c</sup> cation exchange capacity.

Herbicides were initially applied during the 2016–2017 winter wheat crop campaign in a field experiment set up at the Muñovela experimental farm belonging to the Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca, Spain (40°54'15" N latitude and 5°46'26" W longitude) [30]. The experiment involved randomized complete blocks with plots of 81 m<sup>2</sup> corresponding to the following three treatments, each in three replicates: unamended control soil (S), soil amended with spent mushroom substrate (S + SMS), and soil amended with green compost (S + GC). The SMS and GC were applied to the soil once in the previous winter wheat crop campaign (November 2016) at rates of 140 and 85 t ha<sup>-1</sup> (dry weight basis), respectively, and incorporated into the top 20 cm. The commercial formulations, Erturon<sup>®</sup> (chlorotoluron 50% *w/v*, Cheminova Agro S.A., Madrid, Spain) and Herold<sup>®</sup> (flufenacet 40% *w/v*, Bayer Crop Science S.L., Valencia, Spain), were sprayed at the pre-emergence stage at 15 and 5 kg a.i. ha<sup>-1</sup>, respectively, the first time in November 2016 and 346 days after their first application (in November 2017) at similar concentrations by second time. Herbicide dissipation was evaluated after repeated application.

Weather data (precipitation, maximum, minimum, and average air temperature) were recorded at the Spanish State Agency of Meteorology (AEMET) weather station on the Muñovela farm itself. During the 2017–2018 campaign corresponding to field dissipation experiment after second application of herbicides, the average air temperature was 8.0 °C, with average maximum and minimum temperatures of 13.6 °C and 2.5 °C, respectively. The total precipitation recorded was 411.0 mm during the 225-day-long experiment, starting 10 days after herbicide application. Precipitation >10 mm was recorded 52, 105, 106, 108, 110, 116, 120, 147, 152, 208, and 219 days after herbicide application, so less precipitation was recorded up to 104 days (79.6 mm). The maximum precipitation was 20.0 mm at 208 days after herbicide application (Figure 1).



**Figure 1.** (a) Rainfall, maximum and minimum air temperatures; (b) cumulative rainfall and average temperature recorded in the Muñovela farm during the field dissipation experiment (225 days).

## 2.2. Herbicide Extraction and Analysis

Surface soils (0–10 cm) were sampled eighteen different times for 225 days after herbicide application. On each occasion, five soil subsamples were randomly collected in each plot, and representative average samples were obtained for each plot by mixing the five subsamples. The composite samples were homogenized, sieved (<2 mm), and stored at 4 °C until their analysis.

The analytical standards of chlorotoluron and flufenacet (>99.5% purity), and of their major metabolites, desmethyl chlorotoluron, flufenacet ESA sodium salt, and flufenacet OA (>99.3% purity), were supplied by Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). Both the herbicides and their major metabolites were extracted and analyzed according to [31]. Briefly, triplicate subsamples of moist soil (6 g) from each composite sample of unamended or amended soils taken at each sampling time were extracted with acetonitrile (12 mL). They then underwent an ultrasonic bath (1 h, 20 °C), shaken (24 h, 20 °C), centrifuged (5045 g, 15 min), and filtrated (<0.45 µm). Extracts (8 mL) were evaporated until dryness at 25 °C under a nitrogen stream using an EVA-EC2-L evaporator (VLM GmbH, Bielefeld, Germany). The residue was dissolved in 0.75 mL of acetonitrile and transferred to a glass vial for analysis. The herbicides and their metabolites were determined by HPLC-DAD-MS using a Waters chromatograph (Waters Assoc., Milford, MA, USA).

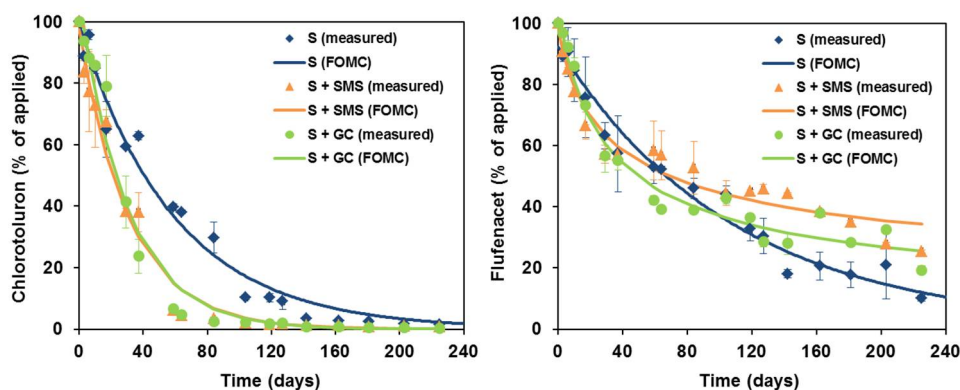
### 2.3. Data Analysis

FOCUS work group guidelines were followed to select the best kinetic model for each herbicide and soil treatment [32]. According to these guidelines, herbicide dissipation kinetics were fitted to single first-order (SFO) and first-order multi-compartment (FOMC) kinetic models. The coefficient of determination and the chi-squared test were calculated as indicators of the goodness of fit. The herbicide concentrations, which were measured 1 day after the application in the three soil treatments, were considered as 100% of the amounts applied. The  $DT_{50}$  and  $DT_{90}$  values were used to characterize the decay curves and compare the variations in dissipation rates. The kinetic model parameters were estimated using the Excel Solver Add-in Package [32].

## 3. Results

### 3.1. Dissipation of Chlorotoluron and Flufenacet during the Second-Year Application

The dissipation curves of the herbicides for the three soil treatments were fitted to the SFO and FOMC kinetic models. Although the fitting of the observed data to both kinetic models was acceptable, the goodness of fit of both herbicides in all soil treatments was better for the FOMC model than for the SFO one (Figure 2, Table 2). The chi-squared ( $\chi^2$ ) test was  $\leq 14.7$  and the coefficient of determination ( $R^2$  value) was  $\geq 0.95$  when herbicide dissipation curves were fitted to the FOMC model (Table 2). In a previous work, the dissipation of chlorotoluron in unamended and amended soils under field conditions was better described by the double first-order in parallel (DFOP) model [33]. The dissipation of flufenacet in unamended soils in field trials was more accurately described by the SFO model [25].



**Figure 2.** Dissipation curves of chlorotoluron and flufenacet in the unamended soil (S) and soil amended with SMS (S + SMS) or GC (S + GC). Dissipation data were fitted to the FOMC kinetic model (FOCUS, 2006).

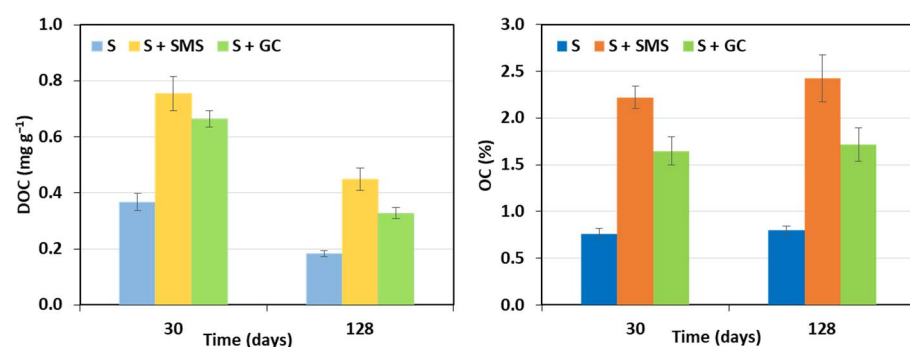
**Table 2.** Dissipation parameters ( $DT_{50}$  and  $DT_{90}$ ) for chlorotoluron and flufenacet in unamended (S) and SMS- and GC-amended (S + SMS and S + GC) soils. Goodness of fit parameters ( $\chi^2$  and  $R^2$ ) obtained from the fitting of dissipation curves to a first-order multi-compartment (FOMC) kinetic model [32].

Soil	M0 (%)	$\alpha$	$\beta$	$DT_{50}$ (Days)	$DT_{90}$ (Days)	$\chi^2$	$R^2$
Chlorotoluron							
S	99.21	$1.14 \times \exp 4$	$6.75 \times \exp 5$	41.1	136.5	9.3	0.982
S + SMS	97.54	$6.23 \times \exp 4$	$1.96 \times \exp 6$	21.8	72.3	8.1	0.983
S + GC	107.79	$5.39 \times \exp 5$	$1.61 \times \exp 7$	20.7	68.8	14.7	0.975
Flufenacet							
S	92.41	64.496	6995.6	75.6	254.3	5.8	0.972
S + SMS	97.98	0.35	11.7	73.6	8515.6	6.4	0.951
S + GC	105.16	0.511	14.9	42.9	1333.5	5.3	0.969

A total of 64 days after its application, the dissipation of chlorotoluron was >60% in S, and >93% in S + SMS and S + GC, indicating rapid dissipation during the first phase of the kinetic curve. This behavior would be related with this compound's characteristics (high solubility in water and low hydrophobicity). For flufenacet, the percentages of dissipation were >47% in S, >43% in S + SMS, and >60% in S + GC at 64 days after its application in the field plots. These results indicate that the flufenacet dissipation rate was slower than for chlorotoluron in both unamended and amended soils. This may be due to flufenacet's lower solubility in water and higher hydrophobicity [23]. However, both herbicides dissipated faster after the second application in field conditions than after their first application previously evaluated in the same unamended and amended soils [11].

The  $DT_{50}$  values for chlorotoluron were two times lower in amended soils than in the unamended soil (Table 2). The  $DT_{50}$  value for flufenacet was 1.76 times lower in S + GC than in the unamended one. The  $DT_{50}$  values of both herbicides followed the order S > S + SMS > S + GC, although the  $DT_{50}$  values of chlorotoluron were close for S + SMS and S + GC, while the  $DT_{50}$  value of flufenacet for S was similar to that for S + SMS (Figure 2, Table 2). The  $DT_{50}$  and  $DT_{90}$  values calculated for chlorotoluron were in the same range or lower than those reported in unamended soils under field conditions [23,25]. However, the  $DT_{50}$  and  $DT_{90}$  values for flufenacet were always higher than those reported for unamended soils [23,26].

The higher DOC content in amended soils (Figure 3) than in unamended one may explain the lower persistence of chlorotoluron, as DOC could increase the amount of chlorotoluron in solution, facilitating its dissipation through different pathways, such as biodegradation by microorganisms or its mobility to lower soil layers, as reported in previous research [30]. Flufenacet recorded a high dissipation rate in amended soils (lower  $DT_{50}$  values for S + SMS and S + GC than for S) during the first kinetic phase, probably due to its higher availability in solution enhanced by the DOC content, as shown for chlorotoluron. However, the dissipation rate decreased in S + SMS and S + GC (higher  $DT_{90}$  values than for S) during the second kinetic phase (Figure 2, Table 2). The higher OC content of amended soils together with their decreased DOC content over time (Figure 3) could facilitate the formation of bound residues from residual flufenacet, making this herbicide less prone to dissipation over time than chlorotoluron. It has been reported that the formation of non-extractable bound residues for flufenacet at ~100 days after its application varied between 16.3% and 56.2% [26]. Carpio et al. [30] have reported the adsorption and persistence of flufenacet in the soil surface by the OC content as the main parameter influencing its behavior in the soil.



**Figure 3.** Dissolved organic carbon (DOC) and organic carbon (OC) for unamended soil (S) and soil amended with SMS (S + SMS) or GC (S + GC) at 30 and 128 days after the second application of herbicides.

Over the field experimental period, the metabolite desmethyl chlorotoluron was detected in all three soil treatments assayed (Figure 4). Desmethyl chlorotoluron is the major degradation product of chlorotoluron formed in soil [23], as reported in previous laboratory and field studies [11,25,31]. Its concentrations increased up to 84, 29, and 17 days

in S, S + GC and S + SMS, respectively, and then the metabolite concentrations decreased through to 225 days (Figure 4). The total amounts of metabolite formed in soils over the experimental period (225 days) followed the order: S + SMS (4.9%) < S + GC (7.1%) < S (9.0%) (Figure 4). These results are consistent with the adsorption of chlorotoluron by these soils [11]. The herbicide is therefore less bioavailable for degradation in S + SMS due to its higher adsorption. The metabolite desmethyl chlorotoluron has a higher adsorption constant than chlorotoluron [23], so it could have been adsorbed by S + SMS, forming bound residues as previously reported [11]. The flufenacet-OA metabolite was detected in the soil for all three treatments at different sampling times, but always at lower concentrations than its limit of quantification, indicating that other processes were involved in its dissipation.

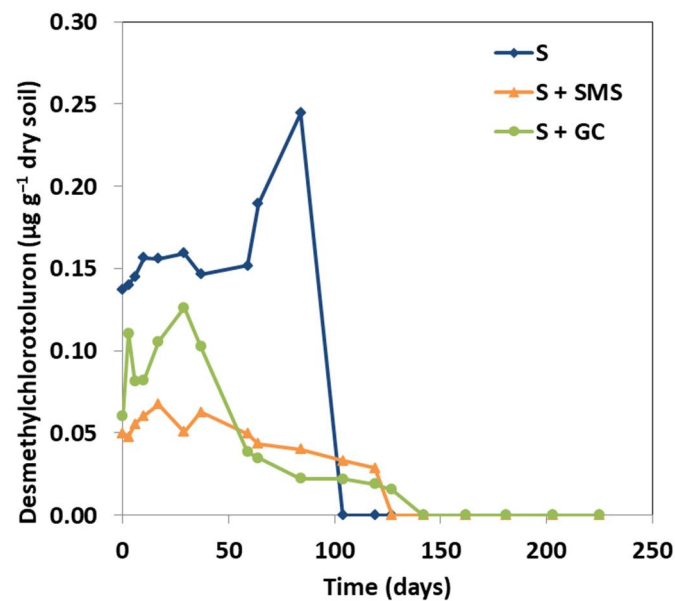
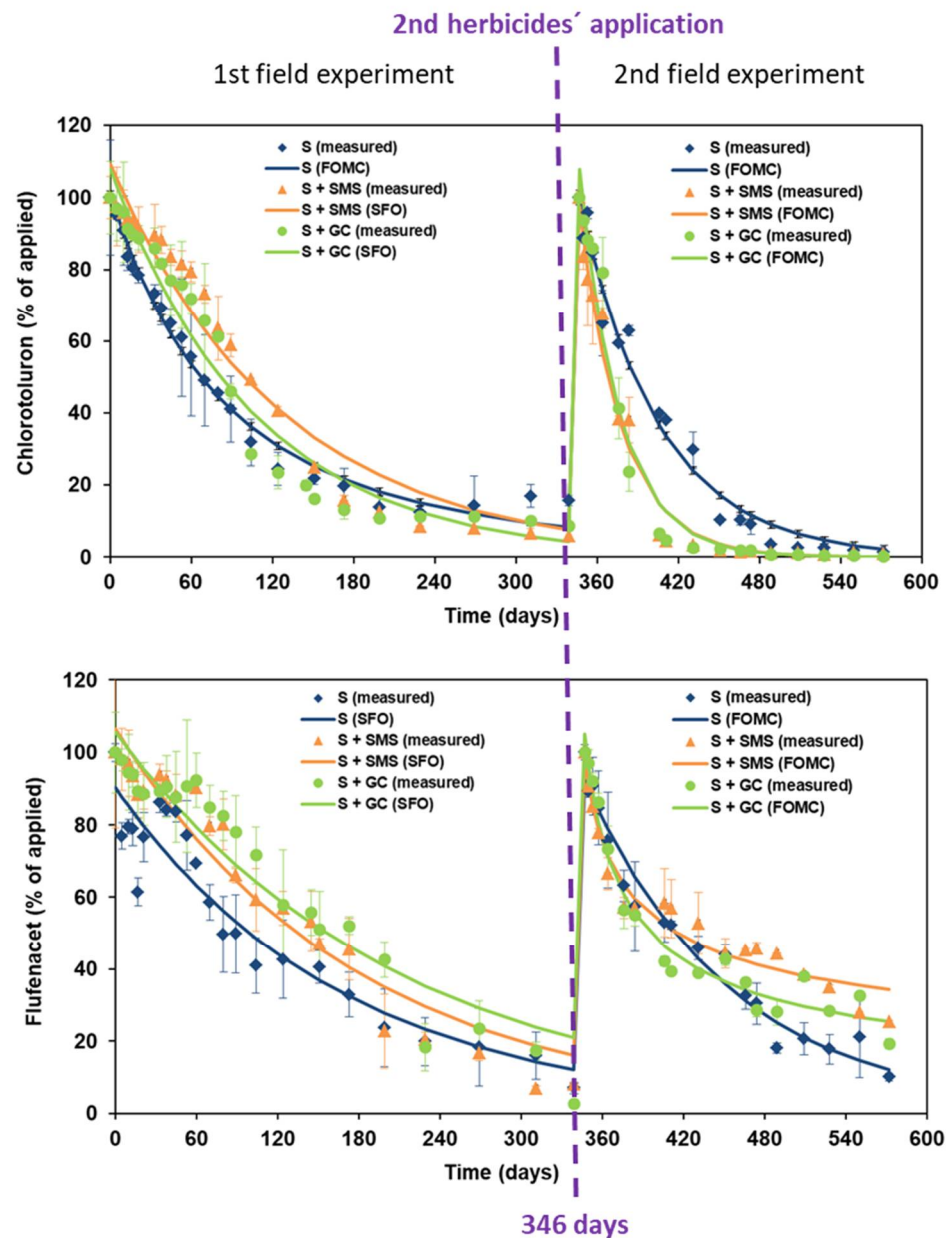


Figure 4. Formation of desmethyl chlorotoluron in unamended soil (S) and soil amended with SMS (S + SMS) or GC (S + GC).

### 3.2. Comparison of the Dissipation Kinetics of Chlorotoluron and Flufenacet after Repeated Application

The dissipation pattern of chlorotoluron and flufenacet after the second herbicide application was different to the first one, where the herbicide dissipation curves were best described by the SFO and FOMC models after the first and second application, respectively. For comparison purposes, Figure 5 shows these dissipation curves of chlorotoluron and flufenacet during both field experiments in unamended soil and SMS- and GC-amended soils.

The kinetic parameters indicate that chlorotoluron and flufenacet dissipated more quickly after the second application than after the first one. The  $DT_{50}$  values of both herbicides were lower by between 1.6 and 4.0 times (chlorotoluron) and by between 1.6 and 3.4 times (flufenacet) than those calculated after the first application [11]. A higher dissipation was observed after the repeated application of both herbicides in the same field plots. Previous studies have detected a similar effect (higher dissipation rate) for chlorotoluron [29] and other herbicides [15,16,20,22] applied repeatedly in field dissipation studies. Other studies have also reported an increase in dissipation rates of 1.35 times for sulfosulfuron [15], 2.0 for atrazine [34], 5.81 for chlorotoluron [29], and up to 8.0 for simazine [35] following repeated herbicide application in unamended soils.



**Figure 5.** Dissipation kinetics of chlorotoluron and flufenacet in unamended FOMC soil and soil amended with SMS (S + SMS) or GC (S + GC) after the first application (0–339 days) and after the second application (346–572 days) of herbicides to field plots.

In this paper changes in some variables such as soil properties (pH, OC, and DOC contents), and the presence of a crop (winter wheat) and amendments (SMS and GC) during both application years may also be responsible for changes in soil microorganisms which could help to explain chlorotoluron and flufenacet dissipation in the soil, as observed in previous studies [15,22,36,37]. It is expected that different dissipation processes, including biodegradation/mineralization and/or mobility in the soil profile, could explain the behavior of chlorotoluron and flufenacet, especially in amended soils after the repeated application, although this was not compared with control plots with a single herbicide application during the second year.

### 3.3. Relationship between Dissipation Parameters and Weather Conditions

Variations in precipitation and temperature over the different seasons will have an effect on the leaching, degradation, and persistence of herbicides and on their efficacy for



weed control [35,36]. High accumulated precipitation (68.4 mm) at 64 days (Figure 1b) after the second application of the herbicides could have decreased the persistence of these compounds in the topsoil and accelerated their dissipation. Cumulative precipitation at 64 days after the second herbicide application was 2.5 times higher than at 60 days (27.2 mm) after the first herbicides application [11]. The DOC content and the higher cumulative precipitation during the second application of herbicides may facilitate the availability of chlorotoluron for biodegradation, and possibly the greater mobility of flufenacet through the soil profile [30]. Janaki et al. [17] have reported the increased dissipation of butachlor due to higher initial precipitation which might have diluted or entrained the herbicide residues during the rice growing period. Similarly, Liu et al. [36] have reported lower residues of fungicide tricyclazole in rice fields from April to June due to the more frequent precipitation, which could accelerate the dissipation of pesticides by increasing their mobility through the soil profile.

The average temperature at 64 days after the second herbicide application (4.49 °C) was slightly higher than after the first application (3.86 °C) [11]. In a previous laboratory study, Marín-Benito et al. [31] have reported that chlorotoluron and flufenacet degradation rates increase with higher temperature due to higher microbial biomass and/or activity. Rouchaud et al. [27,28] have reported that the field dissipation of flufenacet accelerated with the higher temperatures in spring and summer due to increased soil microbial activities. Similarly, Johnstone et al. [38] have found a relationship between the persistence of the herbicide trifluralin and weather conditions (total precipitation and maximum average temperatures) at 60 days after its repeated application in experimental plots.

#### 4. Conclusions

The dissipation kinetics of chlorotoluron and flufenacet after their repeated application in unamended and amended soils under field conditions followed different patterns from those observed after their initial application. Both herbicides dissipated likely faster in all the soils after the second application and in the presence of SMS and GC residues. Both soil factors (OC and DOC contents) and environmental ones (high cumulative precipitation after herbicide application) are key to explaining the higher dissipation. The possible increased availability of chlorotoluron enhanced by the DOC could increase its dissipation supported by the degradation products specified. However, the DOC content for the more hydrophobic herbicide flufenacet could initially increase its mobility in the soil profile, while the OC content would enhance the retention of residual fractions over time, explaining the high DT<sub>90</sub> values obtained. This study demonstrates that dissipation rate of herbicides repeatedly applied in amended soils was also affected by weather conditions and soil characteristics. The accelerated dissipation of chlorotoluron and flufenacet facilitates their lower persistence in soils and at the same time a sustainable agricultural management of soils. Further research should focus on: (1) the determination of possible loss of weed control by these herbicides in organically-amended soils; (2) studies on microbial degradation and isolation of herbicides degraders after repeated application; and (3) studies on the effects of different amounts of organic residues on herbicide dissipation after their repeated application.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.J.S.-M. and M.S.R.-C.; methodology, M.J.C. and J.M.M.-B.; software, M.J.C., J.M.M.-B., and M.S.R.-C.; validation, M.J.C., J.M.M.-B., and M.S.R.-C.; formal analysis, M.J.C. and J.M.M.-B.; investigation, M.J.C. and J.M.M.-B.; resources, M.J.S.-M.; data curation, J.M.M.-B. and M.S.R.-C.; writing—original draft preparation, M.S.R.-C.; writing—review and editing, M.J.S.-M., J.M.M.-B., M.J.C., and M.S.R.-C.; visualization, J.M.M.-B.; supervision, M.J.S.-M., J.M.M.-B., and M.S.R.-C.; project administration, M.J.S.-M.; funding acquisition, M.J.S.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by MINECO/FEDER EU, Project AGL2015-69485-R, and MCIU/AEI/FEDER EU, Project RTI2018-101587-J-I00. J.M.M.-B. thanks MINECO for his Juan de la Cierva-Incorporación (IJCI-2014-19538) contract. M.J.C. thanks for her predoctoral contract

co-funded by European Social Fund (ESF) and the Consejería de Educación (Junta de Castilla y León Government).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors thank José M. Ordax for his technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Sánchez-Monedero, M.A.; Cayuela, M.L.; Sánchez-García, M.; Vandecasteele, B.; D'Hose, T.; López, G.; Martínez-Gaitán, C.; Kuikman, P.J.; Sinicco, T.; Mondini, C. Agronomic evaluation of biochar, compost and biochar-blended compost across different cropping systems: Perspective from the European project FERTIPLUS. *Agronomy* **2019**, *9*, 225. [[CrossRef](#)]
2. Mamy, L.; Mougin, C.; Benoit, P.; Houot, S.; Brault, A.; Cheviron, N.; Delarue, G.; Dumény, V.; Vieuble-Gonod, L. Effect of multiple stresses, organic amendment and compaction, on the fate and impact of isoproturon in soil. *Environments* **2020**, *7*, 79. [[CrossRef](#)]
3. Marín-Benito, J.M.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. 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* **2016**, *4*, 17. [[CrossRef](#)]
4. Pose-Juan, E.; Marín-Benito, J.M.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Dissipation of herbicides after repeated application in soils amended with green compost and sewage sludge. *J. Environ. Manag.* **2018**, *223*, 1068–1077. [[CrossRef](#)]
5. Rojas, R.; Morillo, J.; Usero, J.; Delgado-Moreno, L.; Gan, J. Enhancing soil sorption capacity of an agricultural soil by addition of three different organic wastes. *Sci. Total Environ.* **2013**, *458–460*, 614–623. [[CrossRef](#)]
6. García-Delgado, C.; Marín-Benito, J.M.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Organic carbon nature determines the capacity of organic amendments to adsorb pesticides in soil. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *390*, 122162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Marín-Benito, J.M.; Andrades, M.S.; Rodríguez-Cruz, M.S.; Sánchez-Martín, M.J. Changes in the sorption-desorption of fungicides over time in an amended sandy clay loam soil under laboratory conditions. *J. Soil Sediment* **2012**, *12*, 1111–1123. [[CrossRef](#)]
8. Barba, V.; Marín-Benito, J.M.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Transport of 14C-prosulfocarb through soil columns under different amendment, herbicide incubation and irrigation regimes. *Sci. Total Environ.* **2020**, *701*, 134542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. García-Jaramillo, M.; Trippe, K.M.; Helmus, R.; Knicker, H.E.; Cox, L.; Hermosín, M.C.; Parsons, J.R.; Kalbitz, K. An examination of the role of biochar and biochar water-extractable substances on the sorption of ionizable herbicides in rice paddy soils. *Sci. Total Environ.* **2020**, *706*, 135682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Maroušek, J.; Bartoš, P.; Filip, M.; Kolář, L.; Konvalina, P.; Maroušková, A.; Moudrý, J.; Peterka, J.; Šál, J.; Šoch, M.; et al. Advances in the agrochemical utilization of fermentation residues reduce the cost of purpose-grown phytomass for biogas production. *Energy Source Part A* **2020**. [[CrossRef](#)]
11. Marín-Benito, J.M.; Carpio, M.J.; Mamy, L.; Andrades, M.S.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Field measurement and modelling of chlorotoluron and flufenacet persistence in unamended and amended soils. *Sci. Total Environ.* **2020**, *725*, 138374. [[CrossRef](#)]
12. Kulshreshtha, S.; Singh, S.B.; Lal, S.P.; Yaduraju, N.T. Effect of long term application of pendimethalin enhanced degradation in soil. *Pest Manag. Sci.* **2000**, *56*, 202–206. [[CrossRef](#)]
13. Arbeli, Z.; Fuentes, C.L. Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Prot.* **2007**, *26*, 1733–1746. [[CrossRef](#)]
14. Yale, R.L.; Sapp, M.; Sinclair, C.J.; Moir, J.W.B. Microbial changes linked to the accelerated degradation of the herbicide atrazine in a range of temperate soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24*, 7359–7374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Paporisch, A.; Laor, Y.; Rubin, B.; Eizenberg, H. Effect of Repeated Application of Sulfonylurea Herbicides on Sulfosulfuron Dissipation Rate in Soil. *Agronomy* **2020**, *10*, 1724. [[CrossRef](#)]
16. Kaur, P.; Bhullar, M.S. Effect of repeated application of pendimethalin on its persistence and dissipation kinetics in soil under field and laboratory conditions. *Environ. Technol.* **2019**, *40*, 997–1005. [[CrossRef](#)]
17. Janaki, P.; Chinnusamy, C.; Meena, S.; Shanmugasundaram, R.; Sakthivel, N. Effect of repeated and long term application of butachlor on its dissipation kinetics in rice soil. *Asian J. Chem.* **2016**, *28*, 2277–2282. [[CrossRef](#)]
18. Karpouzias, D.G.; Karanasios, E.; Menkissoglu-Spiroudi, U. Enhanced microbial degradation of cadusafos in soils from potato monoculture: Demonstration and characterization. *Chemosphere* **2004**, *56*, 549–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Celis, R.; Gámiz, B.; Adelino, M.A.; Cornejo, J.; Hermosín, M.C. Effect of formulation and repeated applications on the enantioselectivity of metalaxyl dissipation and leaching in soil. *Pest Manag. Sci.* **2015**, *71*, 1572–1581. [[CrossRef](#)]
20. Zablotowicz, R.M.; Krutz, L.J.; Reddy, K.N.; Weaver, M.A.; Koger, C.H.; Locke, M.A. Rapid development of enhanced atrazine degradation in a Dundee silt loam soil under continuous corn and in rotation with cotton. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 852–859. [[CrossRef](#)]

21. Mutua, G.K.; Ngigi, A.N.; Getenga, Z.M. Degradation characteristics of metribuzin in soils within the Nzoia River Drainage Basin, Kenya. *Toxicol. Environ. Chem.* **2016**, *98*, 800–813.
22. García-Delgado, C.; Barba-Vicente, V.; Marín-Benito, J.M.; Igual, J.M.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Influence of different agricultural management practices on soil microbial community over dissipation time of two herbicides. *Sci. Total Environ.* **2019**, *646*, 1478–1488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. PPDB, Pesticide Properties Database. UK: University of Hertfordshire. 2021. Available online: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> (accessed on 11 January 2021).
24. Willkommen, S.; Lange, J.; Ulrich, U.; Pfannerstill, M.; Fohrer, N. Field insights into leaching and transformation of pesticides and fluorescent tracers in agricultural soil. *Sci. Total Environ.* **2021**, *751*, 141658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. EC, European Commission, Directorate-General Health & Consumer Protection. *Review Report for the Active Substance Chlorotoluron*; European Commission: Brussels, Belgium, 2005; 54p.
26. EFSA, European Food Safety Authority. Rapporteur Assessment Report on the Active Substance Flufenacet. 2017. Available online: <http://www.efsa.europa.eu> (accessed on 11 January 2021).
27. Rouchaud, J.; Neus, O.; Cools, K.; Bulcke, R. Flufenacet soil persistence and mobility in corn and wheat crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, *63*, 460–466. [[CrossRef](#)]
28. Rouchaud, J.; Neus, O.; Eelen, H.; Bulcke, R. Persistence, mobility, and adsorption of the herbicide flufenacet in the soil of winter wheat crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2001**, *67*, 609–616. [[CrossRef](#)]
29. Rouchaud, J.; Neus, O.; Bulcke, R.; Cools, K.; Eelen, H.; Dekkers, T. Soil dissipation of diuron, chlorotoluron, simazine, propyzamide, and diflufenican herbicides after repeated applications in fruit tree orchards. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2000**, *39*, 60–65. [[CrossRef](#)]
30. Carpio, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S.; García-Delgado, C.; Sánchez-Martín, M.J.; Marín-Benito, J.M. Mobility monitoring of two herbicides in amended soils: A field study for modeling applications. *J. Environ. Manag.* **2020**, *260*, 110161. [[CrossRef](#)]
31. Marín-Benito, J.M.; Carpio, M.J.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: Effect of the temperature and the organic amendments. *Sci. Total Environ.* **2019**, *653*, 1301–1310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. FOCUS, FORum for Co-Ordination of Pesticide Fate Models and Their Use. Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics. EC Documents Reference Sanco/10058/2005 Version 2.0, 2006; 434p. Available online: [https://esdac.jrc.ec.europa.eu/public\\_path/projects\\_data/focus/dk/docs/finalreportFOCDegKinetics.pdf](https://esdac.jrc.ec.europa.eu/public_path/projects_data/focus/dk/docs/finalreportFOCDegKinetics.pdf) (accessed on 15 December 2020).
33. Rodríguez-Liébaná, J.A.; ElGouzi, S.; Mingorance, M.D.; Castillo, A.; Peña, A. Irrigation of a Mediterranean soil under field conditions with urban wastewater: Effect on pesticide behavior. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2014**, *185*, 176–185. [[CrossRef](#)]
34. Krutz, L.J.; Zablotowicz, R.M.; Reddy, K.N.; Koger, C.H.; Weaver, M.A. Enhanced degradation of atrazine under field conditions correlates with a loss of weed control in the glasshouse. *Pest Manag. Sci.* **2007**, *63*, 23–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Abit, M.; Rainbolt, C.; Krutz, L.; Shaner, D.; Hanson, B. Effects of long-term use on simazine dissipation in central California vineyards. *Weed Sci.* **2012**, *60*, 531–536. [[CrossRef](#)]
36. Liu, J.; Song, Y.; Tang, M.; Lu, Q.; Zong, G. Enhanced dissipation of xenobiotic agrochemicals harnessing soil microbiome in the tillage-reduced rice-dominated agroecosystem. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *398*, 122954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. García-Delgado, C.; Carpio, M.J.; Marín-Benito, J.M.; Igual, J.M.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Soil microbial community changes in a field treatment with chlorotoluron, flufenacet and diflufenican and two organic amendments. *Agronomy* **2020**, *10*, 1166. [[CrossRef](#)]
38. Johnstone, P.K.; Jolley, A.V.; Code, G.R.; Moerkerk, M.R.; Corbett, A. Degradation of trifluralin in three Victorian soils—Long-term field trials. *Aust. J. Exp. Agric.* **1998**, *38*, 363–374. [[CrossRef](#)]



# CAPÍTULO 6

## RESUMEN



## **CAPÍTULO 6: Soil microbial community changes in a field treatment with chlorotoluron, flufenacet and diflufenican and two organic amendments.**

### **RESUMEN**

La aplicación conjunta de herbicidas y enmiendas orgánicas es una práctica agrícola común para aumentar la productividad de los cultivos y mejorar la calidad del suelo asegurando una producción sostenible. Sin embargo, la materia orgánica (MO) aportada por las enmiendas puede alterar el comportamiento fisicoquímico de los herbicidas y su biodisponibilidad en los suelos. Estas variaciones en la biodisponibilidad junto con la presencia de nuevos microorganismos procedentes de las enmiendas influyen en la disipación de los herbicidas en el suelo. Sin embargo, existe poca información sobre los cambios en la comunidad microbiana del suelo como consecuencia de esta práctica agronómica bajo condiciones reales de campo.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en las comunidades microbianas (actividad, biomasa y estructura) en un suelo agrícola cultivado con trigo sin enmendar (S) y enmendado con sustrato postcultivo de hongos (S + SMS) o compost verde (S + GC) a lo largo del tiempo después de la aplicación en el campo de las formulaciones comerciales Erturon<sup>®</sup> y Herold<sup>®</sup> correspondientes a los herbicidas clortoluron (CTL) y flufenacet (FNC) + diflufenican (DFN), respectivamente.

El SMS y el GC fueron aplicados a una dosis de 140 y 85 t ha<sup>-1</sup> en peso seco, respectivamente, y los herbicidas CTL, FNC y DFN a una dosis cinco veces superior a la dosis agronómica recomendada (15, 5 y 2.5 kg i.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente). Después de la aplicación de los herbicidas, se tomaron muestras de suelo superficial (0 – 10 cm) de las parcelas experimentales (9 m × 9 m) con los diferentes tratamientos de suelo (tres réplicas por tratamiento) ubicadas en la finca experimental Muñovela del IRNASA, CSIC. Las muestras se tomaron a distintos tiempos hasta 339 días, y se determinaron las cantidades residuales de los herbicidas (disipación), la actividad deshidrogenasa del suelo (DHA) como actividad microbiana global, y la biomasa y estructura microbiana a partir del análisis del perfil de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFAs) del suelo.

Las concentraciones de herbicidas registradas a los diferentes tiempos indicaron una degradación continua de CTL y FNC en todas las muestras, mientras que las del DFN manifestaron una persistencia elevada en todo el periodo de experimentación. Sin

embargo, sólo en el caso de CTL hubo una relación significativa de las cantidades residuales con los factores manejo de suelo y tiempo simultáneamente considerados. Las cantidades más elevadas de CTL se encontraron en los suelos enmendados con SMS con una disipación más rápida en comparación a los otros dos herbicidas. La disipación de CTL y FNC fue casi completa en el último tiempo de muestreo ( $< 15\%$  y  $< 8\%$ , respectivamente), mientras que para el DFN se observó una concentración residual  $< 70\%$  a los 339 días. La persistencia de los herbicidas fue mayor en los suelos enmendados debido a su mayor adsorción y menor biodisponibilidad para la degradación.

En general, los valores de DHA evolucionaron de un modo significativo y progresivo a valores más bajos en los suelos sin enmendar y tratados con herbicidas (S+H) en comparación con sus respectivos controles. La combinación de los tres herbicidas tuvo un impacto negativo en la actividad microbiana del suelo, con una relación significativa entre las cantidades residuales de los herbicidas y los valores de DHA en el suelo sin enmendar (la DHA disminuyó simultáneamente con la disipación de los herbicidas). Esta actividad no se recuperó con el tiempo, posiblemente debido a la toxicidad de los residuos de herbicidas más persistentes, como el DFN. Por otro lado, el uso de enmiendas orgánicas tuvo un efecto amortiguador del impacto de los herbicidas sobre la DHA porque los valores de esta actividad microbiana fueron más constantes en los suelos enmendados a lo largo del periodo experimental posiblemente debido a la interacción de los herbicidas con los componentes de la MO del residuo que conducen a su inactivación o a actividades microbianas alteradas en presencia de cosustratos. A pesar de ello, la capacidad tampón de las enmiendas no fue suficiente para neutralizar completamente el efecto negativo de la mezcla de herbicidas.

La población microbiana total se expresó como la suma de los PLFAs, y la estructura microbiana se determinó por la abundancia relativa de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) que diagnostican específicamente bacterias Gram–negativas y Gram–positivas, Actinobacterias y hongos. Los suelos enmendados registraron valores más altos de PLFAs, sin embargo, la biomasa microbiana disminuyó con el tiempo independientemente de la enmienda orgánica y/o los herbicidas, y no se observó ningún efecto de recuperación. La mezcla de herbicidas produjo una disminución significativa en la población y estructura microbiana en el suelo sin enmendar, de acuerdo con la disminución observada en los valores de DHA. Este cambio corresponde a una reducción significativa en la concentración total de FAMEs bacterianos en S + H, explicado por una



disminución significativa en la abundancia relativa de bacterias Gram-positivas. En el último tiempo de muestreo, se detectaron cantidades residuales de los tres herbicidas en los suelos enmendados, lo que significa que SMS y GC amortiguaron la biodisponibilidad de los herbicidas durante su disipación o sus efectos tóxicos en la población microbiana total. Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas de biomasa y estructura microbiana en los suelos enmendados sin tratar o tratados con herbicidas. La aplicación de SMS y GC produjo un cambio significativo de la comunidad microbiana del suelo, independientemente de los herbicidas. Este cambio se debió a la deriva temporal, por variaciones de humedad y temperatura del suelo durante el año del ensayo.

En este trabajo se confirmó la capacidad de amortiguación de las enmiendas orgánicas para minimizar los efectos tóxicos de los herbicidas en la comunidad microbiana del suelo. Sin embargo, a pesar de su efecto amortiguador, la aplicación combinada de estos herbicidas en los suelos enmendados produjo un descenso en la actividad microbiana del suelo en comparación con los suelos control. Por esta razón, es necesario evaluar el impacto de la aplicación individual de cada herbicida, de sus principales productos de degradación en el suelo y de los aditivos presentes en las formulaciones comerciales de herbicidas sobre la comunidad microbiana del suelo.



**CAPÍTULO 6**  
**ARTÍCULO PUBLICADO**





Article

# Soil Microbial Community Changes in a Field Treatment with Chlorotoluron, Flufenacet and Diflufenican and Two Organic Amendments

María José Carpio <sup>1</sup>, Carlos García-Delgado <sup>1,2</sup> , Jesús María Marín-Benito <sup>1</sup>,  
María Jesús Sánchez-Martín <sup>1</sup> and María Sonia Rodríguez-Cruz <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Natural Resources and Agrobiological of Salamanca (IRNASA-CSIC), Cordel de Merinas 40–52, 37008 Salamanca, Spain; mjose.carpio@irnasa.csic.es (M.J.C.); carlos.garciadelgado@uam.es (C.G.-D.); jesusm.marin@irnasa.csic.es (J.M.M.-B.); mjesus.sanchez@irnasa.csic.es (M.J.S.-M.)

<sup>2</sup> Department of Geology and Geochemistry, Autonomous University of Madrid, 28049 Madrid, Spain

\* Correspondence: msonia.rodriguez@irnasa.csic.es; Tel.: +34-923-219-606

Received: 3 July 2020; Accepted: 6 August 2020; Published: 8 August 2020



**Abstract:** The soil microbial activity, biomass and structure were evaluated in an unamended (S) and organically amended soil treated with two commercial formulations of the herbicides chlorotoluron (Erturon<sup>®</sup>) and flufenacet plus diflufenican (Herold<sup>®</sup>) under field conditions. Soils were amended with spent mushroom substrate (SMS) or green compost (GC). Soil microbial dehydrogenase activity (DHA), biomass and structure determined by the phospholipid fatty acid (PLFA) profiles were recorded at 0, 45, 145, 229 and 339 days after herbicide treatment. The soil DHA values steadily decreased over time in the unamended soil treated with the herbicides, while microbial activity was constant in the amended soils. The amended soils recorded higher values of concentrations of PLFAs. Total soil microbial biomass decreased over time regardless of the organic amendment or the herbicide. Herbicide application sharply decreased the microbial population, with a significant modification of the microbial structure in the unamended soil. In contrast, no significant differences in microbial biomass and structure were detected in S + SMS and S + GC, untreated or treated with herbicides. The application of SMS and GC led to a significant shift in the soil microbial community regardless of the herbicides. The use of SMS and GC as organic amendments had a certain buffer effect on soil DHA and microbial biomass and structure after herbicide application due to the higher adsorption capacity of herbicides by the amended soils.

**Keywords:** herbicides; field experiment; soil; green compost; spent mushroom substrate; bioindicators

## 1. Introduction

Pesticides are used intensively in modern agriculture to increase and protect crop yields [1,2]. However, their increasing use poses a potential hazard for the environment due to their persistence in soil, their toxicity to non-target organisms, and the increase in resistant species [3,4]. The presence of certain pesticides and their degradation products may alter the functional balance of the soil ecosystem, as they may promote, inhibit or even have no effect on the growth of most soil-dwelling microorganisms when applied at agronomical rates [2,5]. In turn, they may have a positive, negative or no effect on the structure and diversity of microbial communities and soil enzymatic activities [1,6,7].

The use of organic amendments rich in nutrients and organic matter (OM) is a common practice in agriculture and soil remediation processes [4,8–10]. This practice is often used to increase crop yields, improve soil quality and fertility, preserve the soil from degradation, mitigate pesticide leaching, and enhance soil microbial activity [6,11]. Organic residues with a potential value are those from

agricultural, industrial, and urban activities, such as the composted spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC) [12,13]. The OM of these residues may modify the persistence, dynamics, and environmental fate of herbicides applied to amended soils [14,15].

Generally, organic amendments alter the biodegradation of pesticides, increasing sorption and reducing bioavailability to microorganisms by introducing exogenous microorganisms with biodegradation abilities, or by modifying soil properties, and consequently changing the structure and activity of native microbiota [13,16]. Some soil properties such as microbial biomass and enzymatic activities and in particular dehydrogenase activity (DHA) are used as bioindicators of changes in the soil after agricultural management practices involving the application of herbicides and organic amendments [6,17–19].

Chlorotoluron, flufenacet, and diflufenican are herbicides extensively applied in agriculture in pre- and post-emergence for the selective control of grasses and certain broad-leaved weeds in winter cereals and other crops. These compounds belong to different substance groups (phenylurea, oxyacetamide, and carboxamide, respectively) and have different hydrophobicity [20].

A previous laboratory study assessed the degradation kinetics of chlorotoluron and flufenacet at temperatures of 6 and 16 °C in an unamended soil and one amended with SMS and GC. The application of the organic amendments to soil decreased the degradation rates of both herbicides due to their higher sorption and lower bioavailability for degradation in amended soil. An expected faster degradation was observed at a higher temperature due to increased microbiological activity [21].

Little is known about the effects these herbicides and organic residues have on the various groups of soil microorganisms when they are applied jointly. Most of the studies on soil microbial response to pesticides and organic residues have been assessed at laboratory or greenhouse scale [6,14,22–25], but only a few assays have been performed at field scale [13,19]. Moreover, only one study has been found in the literature that refers to the impact on soil microbial activity of the combined application of the herbicide chlorotoluron with organic residues under field conditions [11]. However, several studies have reported the effects of chlorotoluron, flufenacet, and diflufenican on soil microbial communities in unamended soils under laboratory conditions [7,18,26,27]. Because of the significance of soil microorganisms in many soil cycles and soil health [28], it is very important to assess the impact that this simultaneous application has on the soil microbial community [19].

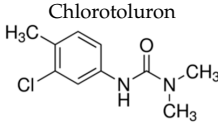
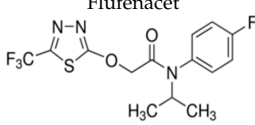
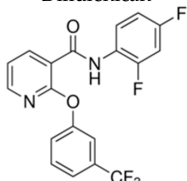
The objective here, therefore, was to evaluate the changes in soil microbial communities over time after the application of Erturon<sup>®</sup> and Herold<sup>®</sup> commercial formulations of the herbicides chlorotoluron and flufenacet plus diflufenican, respectively, under field conditions. To achieve this objective, a study of bioindicators including overall soil microbial activity and biomass and structure was performed in the unamended and amended soil surface over time. A field experiment was established and the soil dehydrogenase activity (DHA) and the profile of phospholipid fatty acids (PLFAs) extracted from the soil were determined after the application of two organic amendments, SMS and GC. Therefore, we expect that the application of herbicides and organic amendments in an agricultural soil at field scale has an impact on the activity, biomass and structure of soil microbial community over the herbicide dissipation period.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

The commercial formulations Erturon<sup>®</sup> (chlorotoluron 50% *w/v*) and Herold<sup>®</sup> (flufenacet 40% *w/v* and diflufenican 20% *w/v*) were supplied by Cheminova Agro S.A. (Madrid, Spain), and Bayer Crop Science S.L. (Valencia, Spain), respectively. Analytical standards of chlorotoluron, flufenacet, and diflufenican (>97.9% purity) were supplied by Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). Their main characteristics are included in Table 1 [20].

**Table 1.** Main characteristics of herbicides.

Common Name and Chemical Structure	IUPAC Name	WS <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Log Kow <sup>b</sup>	Koc <sup>c</sup> (mL g <sup>-1</sup> )	DT <sub>50</sub> <sup>d</sup> (days)	GUS Index <sup>e</sup>
 <p>Chlorotoluron</p>	3-(3-chloro-p-tolyl)-1,1-dimethylurea	74	2.5	196	34.0	3.02
 <p>Flufenacet</p>	4'-fluoro-N-isopropyl-2-[5-(trifluoromethyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yloxy]acetanilide	51	3.5	401	39.0	2.02
 <p>Diflufenican</p>	2',4'-difluoro-2-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-m-tolyloxy) nicotinamide	0.05	4.2	5504	315	1.29

<sup>a</sup> WS, water solubility at 20 °C; <sup>b</sup> octanol/water partition coefficient at pH 7 and 20 °C; <sup>c</sup> sorption coefficient normalized to organic carbon content; <sup>d</sup> time to degradation of 50% of compound in field; <sup>e</sup> the Gustafson mobility index [20].

## 2.2. Soil and Organic Amendments

The soil was an Eutric-Chromic Cambisol soil with a sandy loam texture (14.9% clay, 4.7% silt, and 80.4% sand). The organic amendments were spent mushroom substrate (SMS) from *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* (2:1) cultivation (Sustratos de la Rioja S.L., Pradejon, Spain) and green compost (GC) from the pruning of plants and trees in parks and gardens (El Arca, S.L., Salamanca, Spain). Both organic residues (size <2 mm) were composted in piles for 2 to 6 months under aerobic conditions. Their main characteristics of soils and organic amendments (Table 2) were determined by the methods reported previously [29,30] for air-dried samples.

**Table 2.** Characteristics of the organic residues spent mushroom substrate (SMS) and green compost (GC), unamended (S) and amended (S + SMS and S + GC) soils (0–10 cm depth).

Characteristic	SMS	GC	S	S + SMS	S + GC
pH	7.9	7.2	6.34	7.11	6.99
OM (%) <sup>a</sup>	59.4	46.0	1.33	4.36	2.81
DOC (%) <sup>b</sup>	0.8	0.7	0.008	0.023	0.018
N (%)	2.3	1.1	0.05	0.24	0.14
C/N	15.2	24.3	14.5	10.7	12.0

<sup>a</sup> Organic matter; <sup>b</sup> dissolved organic carbon.

## 2.3. Field Experiment

A field experiment was conducted on the Muñovela experimental farm belonging to the Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca (IRNASA-CSIC), Spain. It was designed in triplicate on experimental plots (9 m × 9 m), randomly distributed, with the following treatments: unamended soil (S), unamended soil with herbicides (S + H), SMS-amended soil (S + SMS) at a rate of 140 t SMS ha<sup>-1</sup>, SMS-amended soil with herbicides (S + SMS + H), GC-amended soil (S + GC) at a rate of 85 t GC ha<sup>-1</sup>, and GC-amended soil with herbicides (S + GC + H). The amount of organic amendments was adjusted to 34 t of organic carbon (OC) ha<sup>-1</sup> on a dry weight basis. SMS and GC were uniformly spread on a field with a tractor and then dug into the 20 cm topsoil with a rotavator.

Topsoil samples (0–10 cm) were characterized after 30 days of SMS and GC application just before the herbicides were applied to replicate the initial state of the soil samples as faithfully as possible.

Herbicides were applied manually after winter wheat sowing in December 2016 as a water suspension using a backpack sprayer (10 L volume). The doses applied to the plots were five times the recommended agronomic application rates for chlorotoluron, flufenacet, and diflufenican (15, 5, and 2.5 kg a.i. ha<sup>-1</sup>, respectively). The increase in the soil's capacity for adsorbing the herbicides after the addition of an organic amendment supports the use of rates higher than those recommended to remain minimally phyto available and maintain the efficacy of the compounds against weeds [31]. No herbicide residues were detected in the field soil prior to the application of the herbicides. After herbicide application (0 days), and at 45, 145, 229 and 339 days after treatment, the samples of surface soil (0–10 cm) were collected to determine, in all treatments, residual amounts of herbicides, soil dehydrogenase activity (DHA), microbial biomass, and phylogenetic structure by phospholipid fatty acids (PLFAs) in all the treatments. Additionally, soil samples were collected 3 days before herbicide application (−3 days) to determine the phylogenetic structure. A detailed description of the soil sampling procedure is included in Appendix A. Analytical methods to determine the residual concentration of herbicides, the soil DHA activity, the microbial biomass and specific PLFAs used as biomarkers to quantify the relative abundances of Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria, *Actinobacteria*, and fungi are included in Appendix B [21,32–34]. Rainfall and air temperature data were recorded throughout the experimental period (Figure A1). The average air temperature ranged from −3.8 to 27 °C, with a mean value of 13.1 °C over the experimental period. Accumulated precipitation at the end of the experimental period was 273.2 mm, with the average intensity being 2.5 mm h<sup>-1</sup>.

#### 2.4. Statistical Analysis

The normal distribution of data was checked using the Shapiro–Wilk test and the homogeneity of variance was checked using Levene's test. Data underwent two-way analysis of variance (ANOVA), with the main factors being soil treatments and sampling times. The Tukey post hoc test at  $p < 0.05$  was used to determine significant differences between means, and evaluate the effects of the different soil treatments and sampling times on the remaining amounts of herbicides in soils and on DHA, the total microbial biomass and the relative abundance of microorganism groups. Pearson correlation coefficients were determined between the remaining percentages of herbicides and DHA values. ANOVA and correlation analyses were carried out using the IBM SPSS Statistics v26 software package (IBM, New York, NY, USA). Principal component analysis (PCA) was performed with PAST v3.23 software (Øyvind Hammer, Oslo, Norway) [35] to determine the most meaningful variables and the global impact of the herbicides on soil microbial communities. Besides PCA, two-way PERMANOVA analysis was performed to determine the significance of herbicide application, sampling times, soil treatments, and their interactions.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Herbicide Residues in Unamended and Amended Soils

The herbicide concentrations determined in unamended and amended soils after their application ranged between 11.6 and 13.1, 4.11 and 5.08 and 2.24 and 2.81 µg g<sup>-1</sup> dry soil for chlorotoluron, flufenacet, and diflufenican, respectively. These concentrations recorded at different times indicated a continuous degradation of chlorotoluron and flufenacet in all the samples. However, the two-way ANOVA performed with time and soil management as factors for each herbicide separately indicated that this interaction was only significant for chlorotoluron ( $p = 0.000$ ), with higher amounts in SMS-amended soils than in unamended ones, but there were no significant differences for flufenacet ( $p = 0.3322$ ) (Table 3). The results confirm that chlorotoluron dissipates faster than flufenacet in the same soils determined at laboratory scale [21]. Both herbicides persisted longer in amended soils due to their higher adsorption and lower bioavailability for degradation [36]. Diflufenican concentration



decreased in S and S + GC after 45 days of treatment (Table 3), but no decrease was observed in S + SMS possibly due to different initial adsorption of diflufenican by the soils as reported previously [37]. However, no more significant decreases in concentrations were determined over time up to the end of experiment due to its high persistence [38]. Diflufenican was more persistent than flufenacet and chlorotoluron, and >65% of the herbicide was found after 339 days of its application in the surface soils. The dissipation of chlorotoluron and flufenacet was almost complete at the last sampling time in the field experiment. At 339 days after herbicide application, residual concentrations of flufenacet (<8%) were lower than those of chlorotoluron (<15%) and diflufenican (<70%).

**Table 3.** Remaining residues of chlorotoluron, flufenacet and diflufenican in unamended (S) and amended (S + SMS and S + GC) soils at different sampling times after application of the herbicides.

Herbicide/Soil	Residual Herbicide ( $\mu\text{g Herbicide g}^{-1}$ Dry Soil) $\pm$ SD <sup>a</sup>				
	0 Days	45 Days	145 Days	229 Days	339 Days
Chlorotoluron					
S	11.6 $\pm$ 1.05ab	7.53 $\pm$ 0.46c	2.53 $\pm$ 0.20de	1.44 $\pm$ 0.20ef	1.82 $\pm$ 0.17ef
S + SMS	13.1 $\pm$ 0.77a	11.0 $\pm$ 0.28b	3.39 $\pm$ 0.16d	1.12 $\pm$ 0.02ef	0.78 $\pm$ 0.21f
S + GC	11.8 $\pm$ 1.20ab	9.14 $\pm$ 1.18c	2.36 $\pm$ 0.17def	1.34 $\pm$ 0.06ef	1.04 $\pm$ 0.03ef
Flufenacet					
S	4.11 $\pm$ 0.10ab	3.46 $\pm$ 0.12bc	1.68 $\pm$ 0.19de	0.82 $\pm$ 0.08ef	0.29 $\pm$ 0.06f
S + SMS	5.08 $\pm$ 1.05a	4.47 $\pm$ 0.30ab	2.70 $\pm$ 0.42cd	1.03 $\pm$ 0.11ef	0.40 $\pm$ 0.02f
S + GC	4.44 $\pm$ 0.50ab	3.94 $\pm$ 0.56ab	2.51 $\pm$ 0.29cd	0.82 $\pm$ 0.30ef	0.12 $\pm$ 0.03f
Diflufenican					
S	2.24 $\pm$ 0.27ab	1.72 $\pm$ 0.53b	1.62 $\pm$ 0.24b	1.30 $\pm$ 0.18b	1.43 $\pm$ 0.31b
S + SMS	2.81 $\pm$ 0.64a	2.03 $\pm$ 0.22ab	2.26 $\pm$ 0.53ab	2.00 $\pm$ 0.34ab	1.95 $\pm$ 0.17ab
S + GC	2.27 $\pm$ 0.31ab	1.45 $\pm$ 0.26b	1.58 $\pm$ 0.07b	1.48 $\pm$ 0.14b	1.53 $\pm$ 0.21b

<sup>a</sup> Standard deviation of the mean. For each compound separately, the values followed by the same letter in lines and columns were not significantly different according to the Tukey post hoc test at a confidence level of 95%.

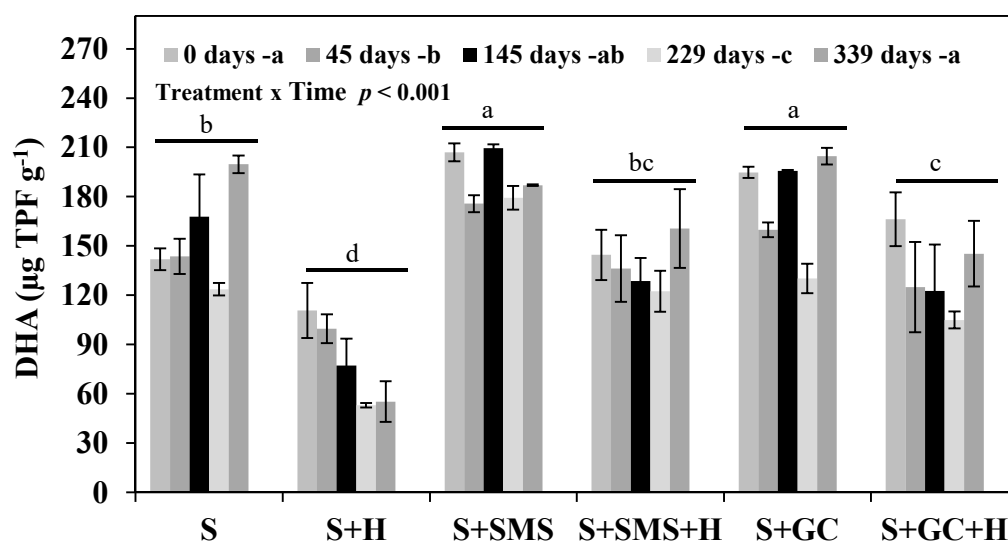
### 3.2. Soil Dehydrogenase Activity (DHA)

The effect of organic amendments and herbicides on overall soil microbial activity was assessed by determining the soil DHA at different sampling times during the assay (Figure 1). Soil DHA values were lower in unamended soils and those treated with herbicides compared to their respective controls ( $p \leq 0.05$ ).

A progressive decrease in DHA values was observed in S + H throughout the assay compared to the soil control, mainly at the last sampling times (145–339 days after herbicide application) ( $p < 0.05$ ). Therefore, the combination of the three herbicides had a negative impact on soil microbial activity, with a significant relationship ( $r = 0.94$ ,  $p < 0.05$ ) between residual amounts of the three herbicides and DHA values in unamended soil, indicating that DHA decreased simultaneously with the dissipation of the herbicides applied. Consequently, DHA recovery did not occur over time, possibly due to the toxicity of the most persistent herbicide residues. In previous work, authors have reported that soil DHA increased by 4.21% when treated with flufenacet + isoxaflutole at the recommended dose ( $0.250 \text{ mg kg}^{-1}$ ) compared to the soil control [7]. However, when applied at the highest dose ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ), it inhibited the DHA, which could be due to the toxic effect of the herbicide flufenacet with a higher  $DT_{50}$  value than isoxaflutole on soil microorganisms with enzymatic activity [27]. Diflufenican, with a long persistence in this soil, could also be responsible for the decrease in DHA in S + H.

The application of organic amendments to soil promoted DHA with respect to unamended soil ( $p \leq 0.05$ ). This effect has previously been reported by other authors for soils amended with different organic residues, being explained as the higher available nutrients and OC contents of amended soils [6,11,39]. The use of organic amendments had a certain buffer effect on DHA after herbicide application because values of this microbial activity were more constant during the assay in S + SMS + H and S + GC + H. This buffer effect might be due to chemical binding of the herbicides to the matrix, or due to altered microbial activities in the presence of co-substrates. Despite this positive effect,

the buffer capacity of the organic amendments, SMS and GC, was not enough to fully neutralize the negative effect of the herbicide mixture. The soil DHA of S + SMS + H and S + GC + H was significantly lower than the DHA of S + SMS and S + GC during the assay, although the values were constant over time (Figure 1). Significant interaction between soil treatment and time was detected ( $p < 0.001$ ). No significant changes in DHA were observed simultaneously to the dissipation of herbicides applied as observed in S + H, and a non-significant relationship was found between herbicide residues and DHA values in the amended soils. This was probably due to the combination of herbicides applied with different adsorption and bioavailability rates in the amended soils, and the long persistence of some of them to produce more toxic effects on soil microbial biomass and activity than the single application of individual compounds [3,13]. Previous studies have reported this trend for one of the herbicides used here, namely, diflufenican, which mixed with glyphosate or with mesosulfuron-methyl and iodosulfuron methyl-sodium decreased DHA and other enzymatic activities [18,26].

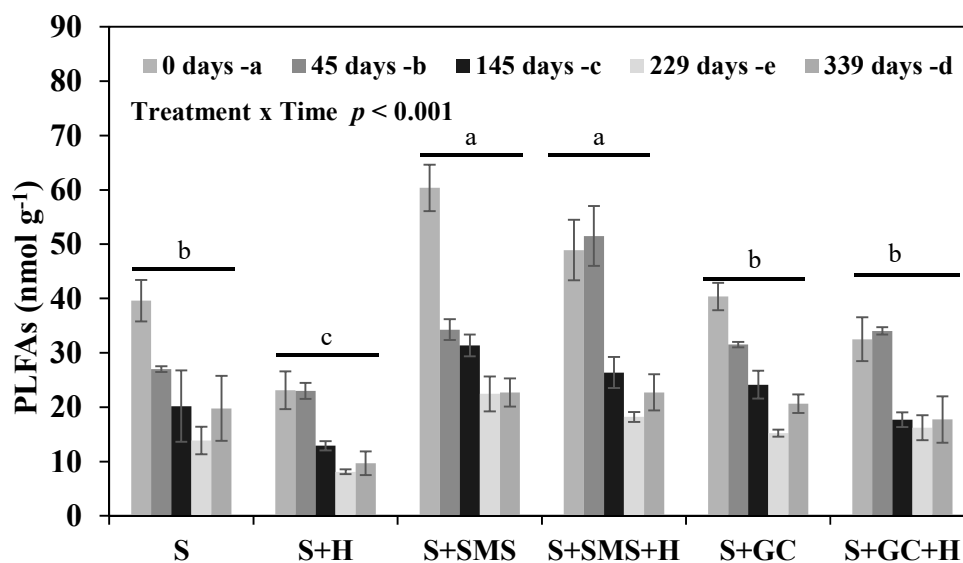


**Figure 1.** Dehydrogenase activity (DHA) for unamended soil (S) and soils amended with spent mushroom substrate (SMS) or green compost (GC) in the absence or presence of herbicides (H). Data present the mean  $\pm$  standard deviation of three replicated plots. Letters at the legend provide the dose main effect groupings according to the Tukey post hoc test ( $p \leq 0.05$ ). Soil treatments designed by different letters are significantly different (Tukey post hoc test;  $p \leq 0.05$ ).

The soil DHA values of the unamended soil and the SMS- and GC-amended soils without herbicides tended to remain constant during the assay period (Figure 1). This also occurred in the soils with herbicides, with the exception of S + H, indicating that soil microbiota retained their functional activity over time. In the SMS- and GC-amended soils with herbicides, amendments may minimize the impact of herbicides on soil microbial activity compared to unamended soil (S + H). The herbicides studied were hydrophobic compounds, and adsorption increased in the amended soils [21,36], hampering their bioavailability and their possible use as a carbon source by microorganisms for increasing microbial activity. This effect has also been reported for prosulfocarb and triasulfuron when applied in field plots with GC-amended soils [13,19].

### 3.3. Soil Microbial Community

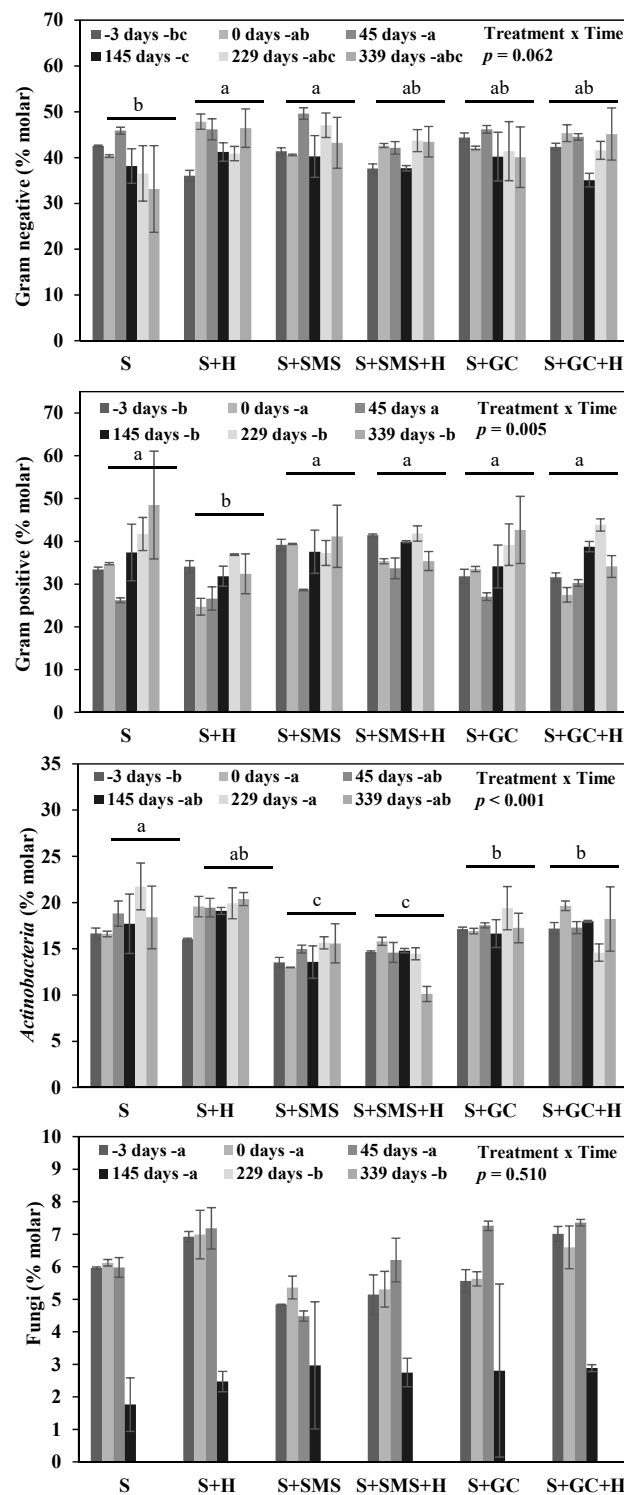
Microbial biomass and structure were monitored in the unamended and amended soils during the assay period. The total microbial population was expressed as the sum of PLFAs (Figure 2), and the structure was shown by the relative abundance of PLFAs that specifically diagnose Gram-negative and Gram-positive bacteria, Actinobacteria, and fungi (Figure 3).



**Figure 2.** Total microbial population (nmol PLFAs g<sup>-1</sup>) for unamended soil (S) and soils amended with spent mushroom substrate (SMS) or green compost (GC) in the absence or presence of herbicides (H). Data present the mean  $\pm$  standard deviation of three replicated plots. Letters at the legend provide the dose main effect groupings according to the Tukey post hoc test ( $p \leq 0.05$ ). Soil treatments designed by different letters are significantly different (Tukey post hoc test;  $p \leq 0.05$ ).

The concentrations of PLFAs in the unamended soils during the assay ranged between 39.6 and 8.11 nmol g<sup>-1</sup>. The SMS- and GC-amended soils recorded higher values of PLFAs ( $p \leq 0.05$ ) with concentration ranges of 63.9–18.2 and 40.9–15.2 nmol g<sup>-1</sup>, respectively. These PLFA concentrations provide information on the microbial community's total biomass. They significantly decreased over time ( $p \leq 0.05$ ) regardless of organic amendment and/or herbicide application, and no recovery effect was observed as occurred with other organic amendments [39] and/or herbicides [13].

The mixture of herbicides produced only a significant decrease ( $p \leq 0.05$ ) in the microbial population for S + H compared to the soil control, which is consistent with the decrease in DHA values observed (Figure 1). This change corresponds to a significant reduction in the total concentration of bacterial PLFAs in S + H (data not shown). In addition, the ratio of Gram-negative/Gram-positive bacteria was modified by herbicide application. The relative abundance of Gram-positive bacteria was negatively impacted by herbicide application, whereas the relative abundance of Gram-negative bacteria increased ( $p < 0.05$ ) (Figure 3). Decreases in the Gram-positive bacteria more sensitive to environmental stresses than Gram-negative bacteria were also observed after the application of other pesticides, including herbicides such as acetochlor [40] and fomesafen [41] or insecticides such as teflubenzuron [42], in unamended soil. A previous study reported the toxic effects of both diflufenican and diflufenican + glyphosate on soil microbial biomass in two unamended soils [18]. No significant effects by herbicide application were detected for Actinobacteria or fungi in unamended soil (Figure 3).

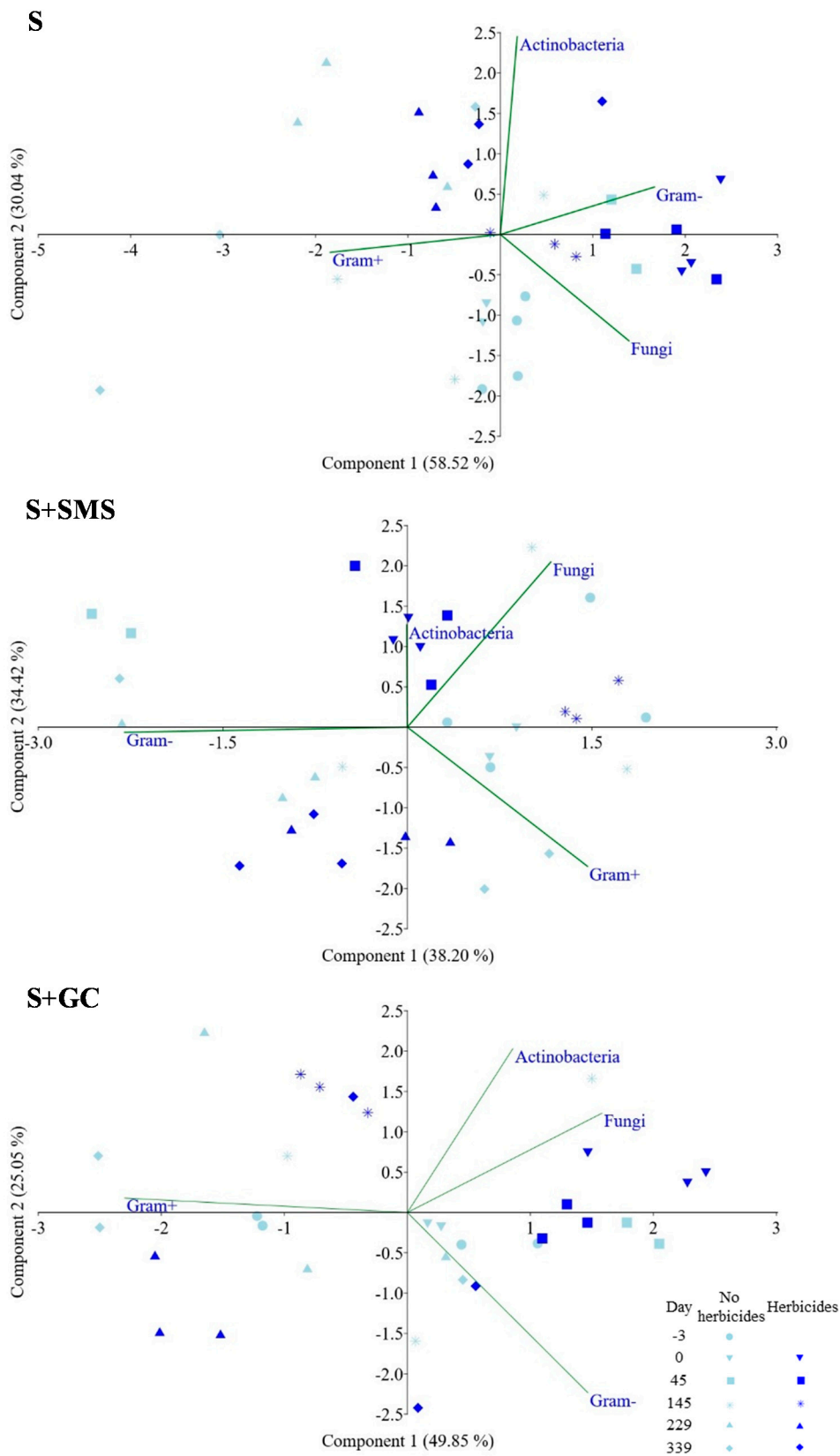


**Figure 3.** Relative abundance (% mol) of PLFAs specifically diagnostic of Gram-negative and Gram-positive bacteria, Actinobacteria and fungi in unamended soil (S) and soils amended with spent mushroom substrate (SMS) or green compost (GC) in the absence or presence of herbicides (H). Data present the mean  $\pm$  standard deviation of three replicated plots. Letters at the legend provide the dose main effect groupings according to the Tukey post hoc test ( $p \leq 0.05$ ). Soil treatments designed by different letters are significantly different (Tukey post hoc test;  $p \leq 0.05$ ). Lack of letters indicates no significant differences.

In contrast to the unamended soil, there were no significant differences during the assay in soil microbial biomass between SMS- or GC-amended soils with and without herbicides ( $p > 0.05$ ) (Figure 2). Residual amounts of the three herbicides studied were detected at the experiment's last sampling time (Table 3), which means SMS and GC buffered the herbicides' bioavailability during their dissipation or their toxic effects on total microbial population. As indicated for the DHA changes, this may be due to the combination of certain positive properties of the organic amendments, such as the adsorption capacity of herbicides, which minimize their bioavailability, an increased input of microorganisms and improve the soil's nutrient status and physical properties [15,43,44]. In SMS- or GC-amended soils, the increase in soil microbial biomass at day 0 might be due to the input of organic matter born microorganisms, but there was a decrease in soil microbial biomass from day 45 (Figure 2). No significant differences in the total concentration of bacterial and/or fungal PLFAs were found in S + SMS or S + GC in the presence of herbicides (data not shown). Complex interactions of different factors related to pesticide properties and the microbial community have been reported to explain the microbial community's response to pesticides in some biobed organic substrates [45]. In the present work, the application of herbicides did not produce significant effects in the relative abundance of Gram-negative and Gram-positive bacteria, Actinobacteria, and fungi in SMS- and GC-amended soils, respectively (Figure 3). However, the application of SMS reduced the relative abundance of Actinobacteria with respect to unamended or GC-amended soils. Because of the assay's long duration, modifications of the microbial structure were to be expected. The modifications of soil moisture and temperature over the year were probably responsible for the soil microbial shift over the 339 days of assay. Moreover, over this time, it should be noted that the specific PLFAs of fungi (18:2  $\omega$ 6cis) were not detected after 145 days (samples at 229 and 339 days) because values were below the detection limit, irrespective of the herbicides or organic amendments applied.

Changes in the soil microbial structure in response to herbicide application in the unamended soil and in the SMS- and GC-amended soils were studied through the PCA of the relative abundance of Gram-negative and Gram-positive bacteria, Actinobacteria, and fungi (Figure 4). According to the PERMANOVA test (Table 4), the global microbial structure was significantly impacted by herbicide application and sampling time ( $p < 0.005$ ). Therefore, the simultaneous application of chlorotoluron, flufenacet, and diflufenican led to a significant shift in the soil microbial structure compared to no herbicide application. Microbial adaptation is a well-known phenomenon which allows bacteria to withstand exposure to a toxicant. By means of physiological acclimation or genetic inheritance, it allows selecting tolerant populations that can cope better with xenobiotics [46]. Kucharski et al. has reported microorganism changes depending on the herbicide dose and soil incubation time, and the results indicate that the application of flufenacet + isoxaflutole could influence the structure of microorganism communities [7]. Similarly, Tomkiel et al. have reported that soil contaminated by a mixture of flufenacet and isoxaflutole usually has a negative impact on soil-dwelling microorganisms, which might be due to these substances' different half-lives [27].

S + H samples are located in the upper right zone of the PCA related to Gram-negative bacteria and Actinobacteria. In contrast, S samples were widely dispersed in the PCA. S samples of -3 and 0 days recorded low values of PC1 that denoted a certain equilibrium between Gram-negative and Gram-positive bacteria. In contrast, these samples were clearly located in the negative values of PC2, and therefore had a weak relationship with the high abundance of Actinobacteria, and some relationship with the high abundance of fungi. The application of herbicides in S + H prompted a clear shift of the microbial structure towards the higher relative abundance of Gram-negative bacteria than the S treatment at 0 days. The microbial structure's evolution over time in the S and S + H samples was similar, moving towards a closer relationship with Gram-positive bacteria and Actinobacteria at the last sampling times (229–339 days). Despite this similar trend over time, the S samples at the last sampling time recorded lower values in PC1 than the S + H samples. Hence, S samples were more closely related to a high relative abundance of Gram-positive bacteria than S + H samples (Figure 4).



**Figure 4.** Principal components analysis (PCA) of unamended (S) and amended soils (S + SMS and S + GC) showing loading scores for Gram– and Gram+ bacteria, Actinobacteria and fungi, and the scores of sampling times on the two main components. The application of herbicides is denoted by dark blue, the non-application of herbicides by light blue. Percent variability explained by each principal component is shown in parentheses after each axis legend.

**Table 4.** Results of PERMANOVA of the effect of herbicides (H) application, sampling time (T), soil treatment (STr) and their interaction on the relative abundance ( $\text{nmol g}^{-1}$ ) of PLFAs specific for Gram-positive and -negative bacteria, *Actinobacteria* and fungi in unamended (S) and amended (S + SMS and S + GC) soils.

Variable	F-Value	p-Value
S		
Herbicide	7.112	<b>0.0050</b>
Time	13.23	<b>0.0001</b>
H × T	−1.517	0.9356
S + SMS		
Herbicide	0.792	0.3802
Time	36.07	<b>0.0001</b>
H × T	0.449	<b>0.0019</b>
S + GC		
Herbicide	1.012	0.3193
Time	25.41	<b>0.0001</b>
H × T	0.394	<b>0.0014</b>
Global		
Herbicide	6.373	<b>0.0039</b>
Time	31.63	<b>0.0001</b>
STr	5.777	<b>0.0010</b>
H × T	−2.051	0.3472
H × STr	1.279	<b>0.0215</b>
T × STr	0.717	<b>0.0452</b>

The presence of herbicides promoted the relative abundance of Actinobacteria at the final sampling time. Actinobacteria is one of the world's most abundant and ubiquitous phylotypes of soil bacteria [28], whereby its versatility for colonizing a wide variety of soils and environments could be responsible for its resistance towards herbicides. Kalia and Gosal have reported that fungi and Actinobacteria are characterized by the highest capabilities for metabolizing xenobiotics [47]. Baćmaga et al. have reported that the diflufenican + mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl-sodium mixture has a generally stimulating effect on Actinobacteria, among others, and inhibits the proliferation of fungi [26]. García-Delgado et al. have reported a positive relationship between herbicide degradation and Actinobacteria, and a negative relationship between fungi and residual herbicides, as confirmation of this work [19]. Likewise, Petric et al. have reported Actinobacteria to be a nicosulfuron-tolerant bacteria [46].

The application of herbicides did not produce significant effects according to the PERMANOVA test of SMS- and GC-amended soils (Table 4). In fact, the PCA profiles of samples with and without herbicides from the SMS- and GC-amended soils clearly overlapped (Figure 4). However, the significant interaction H × T in SMS- and GC-amended soils denoted isolated differences between samples with and without herbicide application. The interaction in SMS-amended soils was at 45 days when samples without herbicide were more related to Gram-negative bacteria than samples with herbicide application. The interaction in GC-amended soil was at 339 days when samples without herbicides were more related to Gram-positive bacteria than samples with herbicide application. However, these changes of trend are not crucial from the agricultural management point of view because they are temporary. Therefore, in contrast to the unamended soil, the simultaneous application of chlorotoluron, flufenacet, and diflufenican was not responsible for the soil microbial shift. Once again, the buffer capacity of organic amendments to minimize the toxic effects of herbicides on the soil microbial community has been confirmed in this work. Previous studies have reported this positive effect of organic amendments, but the buffer capacity of organic amendments to detoxify herbicides was limited, and mixtures of other herbicides had an impact on the soil microbial structure [13,19]. Hence, the interaction between

herbicides and organic amendments seems a key factor to determine the latter's ability to buffer the negative effects of herbicides on the soil microbial structure. This interaction could be enhanced by the low water solubility of chlorotoluron, flufenacet, and diflufenican (Table 1), which could enhance the adsorption by the amendments' OM and minimize their bioavailability. Marín-Benito et al. have determined the sorption coefficients ( $K_d$ ) and the degradation kinetics of chlorotoluron and flufenacet by unamended and SMS- and GC-amended soils similar to the ones used here [21]. The application of SMS and GC produced a significant increase in the  $K_d$  values of these herbicides compared to unamended soil, and a decrease in the degradation rates of both herbicides due to their higher sorption and lower bioavailability for degrading.

The microbial shift in SMS- and GC-amended soils in response to herbicides during the assay was due to a temporal drift (Table 4). The SMS-amended soils samples treated with herbicides at 0 days were related to the high relative abundance of Actinobacteria and fungi and were clearly less related to Gram-negative bacteria. At the last sampling times, 229 and 339 days, the microbial structure shifted towards Gram-positive and Gram-negative bacteria in detriment to Actinobacteria and fungi. This behavior was also observed in results presented in Figure 3, where specific PLFAs of fungi were not detected. The microbial structure of GC-amended soils at 0 and 45 days after herbicide application was characterized by a high relationship with the positive zone of PC1 (Actinobacteria, fungi and Gram-negative bacteria) and clear poor relationship with Gram-positive bacteria. During the assay, the microbial structure shifted towards the negative zone of PC1, increasing the weight of Gram-positive bacteria in the microbial equilibrium. The interaction herbicide  $\times$  time could be reflected in the PCA in the long term due to the high distance between S + GC and S + GC + H samples at 229 and 339 days.

#### 4. Conclusions

The simultaneous application of GC or SMS as organic amendments and the herbicides chlorotoluron, flufenacet, and diflufenican in an agricultural soil at field scale had little effect on the biological parameters that were tested in the soil microbial community. In the amended soils, total soil microbial biomass decreased over time regardless of the organic amendment or the herbicides, and microbial activity (DHA) was constant, although it decreased in the presence of herbicides. In contrast, a significant decrease in microbial activity and a significant modification of the microbial structure were observed in the unamended soil treated with the herbicides. The organic amendments were useful for buffering the effects of herbicides on soil microbial biomass and activity, and for reducing the shift in the soil microbial composition. However, despite its buffer effect on the microbiota with respect to herbicides, the combined application of these herbicides in the amended soils prompted a decrease in soil microbial activity compared to the control soils. Consequently, the use of these organic residues is suggested for reducing the impact of herbicides on soil microbiota, and furthermore for decreasing the risk of pollution by herbicide leaching. However, there is a need to evaluate the impact the following have on soil microbial communities: individual herbicides, the major degradation products of herbicides in soil, and the additives (solvents and surfactants) present in commercial formulations of herbicides.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.J.S.-M. and M.S.R.-C.; methodology, C.G.-D., M.J.C. and J.M.M.-B.; validation, C.G.-D. and M.J.S.-M.; formal analysis, C.G.-D. and M.J.S.-M.; investigation, M.J.C., C.G.-D. and J.M.M.-B.; resources, M.S.R.-C. and M.J.S.-M.; writing—original draft preparation, C.G.-D., M.J.C. and M.S.R.-C.; writing—review and editing, M.J.C., C.G.-D., M.S.R.-C., J.M.M.-B. and M.J.S.-M.; visualization, M.J.C. and C.G.-D.; supervision, M.S.R.-C., J.M.M.-B. and M.J.S.-M.; project administration, M.J.S.-M.; funding acquisition, M.J.S.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by MINECO/FEDER UE, grant number AGL2015-69485-R. M.J.C. thanks "Consejería de Educación, Junta de Castilla y León" for her predoctoral contract co-funded by the European Social Fund. C.G.-D. and J.M.M.-B. thank MINECO for their Juan de la Cierva-Formación (JCFI-2015-23543) and Juan de la Cierva-Incorporación (IJCI-2014-19538) contracts, respectively.



**Acknowledgments:** The authors thank J.M. Igual for his collaboration in the PFLA analysis and J.M. Ordax for his technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

### Appendix A. Analysis of Herbicides

At each sampling time, five 0–10 cm soil subsamples were randomly collected in each plot. Representative average soil samples of each plot were obtained by mixing the five subsamples. Composite samples were put into plastic bags and transported in portable refrigerators to the laboratory, where they were homogenized and sieved (<2 mm) for their analysis.

Triplicate subsamples of moist soil (6 g) were extracted from each plot with acetonitrile (12 mL) to determine herbicide residues. The samples were sonicated for 1 h, shaken at 20 °C for 24 h, and then centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The extracts were filtered in a GHP Acrodisc filter (Waters Corporation) to remove particles >0.45 µm, and then evaporated until dryness at 25 °C under a nitrogen stream using an EVA- EC2-L evaporator (VLM GmbH, Bielefeld, Germany). The residue was dissolved in 0.75 mL of acetonitrile and transferred to a HPLC glass vial for analysis. Herbicides were quantified by high-performance liquid chromatography/diode array detector/mass spectrometry (HPLC-DAD-MS) (Waters Assoc., Milford, USA). A detailed description of the analytical method is included in [21].

### Appendix B. Soil Biochemical Properties and PLFA Analysis

Soil DHA was determined by the Tabatabai method [33]. Briefly, 6 g of fresh soil was mixed with 60 mg of calcium carbonate and 1 mL of 3% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and 2.5 mL of ultrapure water. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 24 h in the dark. At the end of incubation, the 1,3,5-triphenylformazan (TPF) was extracted with 7 mL of methanol, centrifuged (3000 rpm, 10 min), and extracted twice more. The three fractions were mixed and diluted to 25 mL with methanol. The absorbance of the supernatant was measured in a spectrophotometer at 485 nm. The results were expressed as µg TPF g<sup>-1</sup> dry soil.

The soil samples' microbial biomass and structure were determined using phospholipid fatty acid (PLFA) analysis [32]. Lyophilized soil samples were extracted by sonication with a one-phase chloroform-methanol-phosphate buffer solvent. The samples were then purified by solid-phase extraction (SPE), and polar lipids were transesterified with methanol-KOH. Finally, hexane extracts containing the resultant fatty acid methyl esters (FAMEs) were analyzed by gas chromatography. Quantification was performed using an Agilent 7890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) equipped with a 25-mUltra 2 (5% phenyl)-methylpolysiloxane column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) and a flame ionization detector. PLFAs were identified using bacterial fatty acid standards and software from the Microbial Identification System (Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA). Nonadecanoic acid (19:0) was used as an internal standard for the quantitative determination of PLFAs. The total microbial biomass was estimated by the total sum of PLFAs and expressed as nmol g<sup>-1</sup>. Specific PLFAs [34] were used as biomarkers to quantify the relative abundances of Gram-negative bacteria (monounsaturated fatty acids and cyclopropyl 17:0) and Gram-positive bacteria (iso and anteiso saturated branched chain fatty acids), *Actinobacteria* (10-methyl fatty acids), and fungi (18:2 ω6 cis and 16:1ω5).

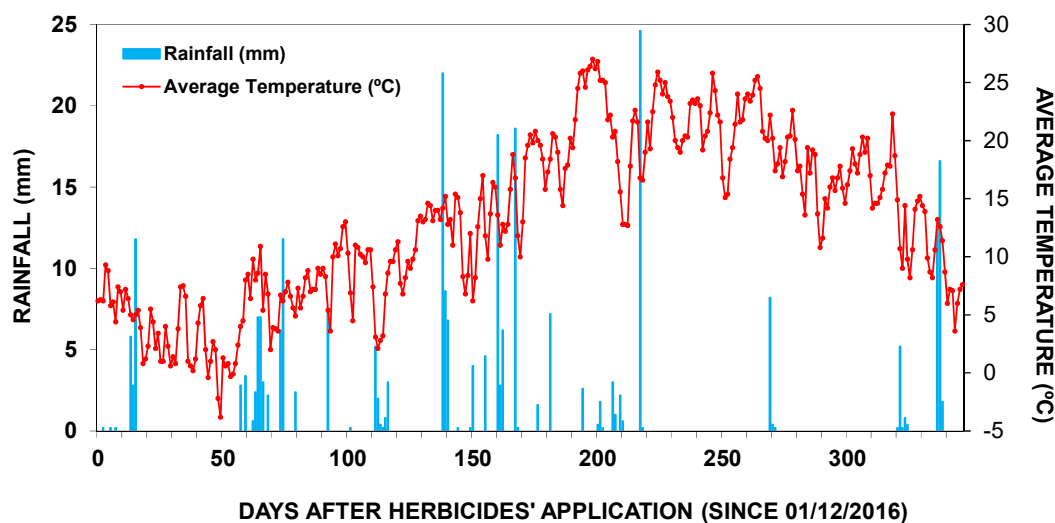


Figure A1. Rainfall and average temperature monitored over the experimental period.

## References

1. Imfeld, G.; Vuilleumier, S. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *Eur. J. Soil Boil.* **2012**, *49*, 22–30. [[CrossRef](#)]
2. Thiour-Mauprivez, C.; Martin-Laurent, F.; Calvayrac, C.; Barthelmebs, L. Effects of herbicide on non-target microorganisms: Towards a new class of biomarkers? *Sci. Total. Environ.* **2019**, *684*, 314–325. [[CrossRef](#)]
3. Pampulha, M.E.; Oliveira, A. Impact of an Herbicide Combination of Bromoxynil and Prosulfuron on Soil Microorganisms. *Curr. Microbiol.* **2006**, *53*, 238–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Varjani, S.; Kumar, G.; Rene, E.R. Developments in biochar application for pesticide remediation: Current knowledge and future research directions. *J. Environ. Manag.* **2019**, *232*, 505–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lo, C.-C. Effect of pesticides on soil microbial community. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2010**, *45*, 348–359. [[CrossRef](#)]
6. Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Parrado, J.; Tejada, M. Behaviour of oxyfluorfen in soils amended with edaphic biostimulants/biofertilizers obtained from sewage sludge and chicken feathers. Effects on soil biological properties. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21*, 11027–11035. [[CrossRef](#)]
7. Kucharski, J.; Tomkiel, M.; Baćmaga, M.; Borowik, A.; Wyszowska, J. Enzyme activity and microorganisms diversity in soil contaminated with the Boreal 58 WG herbicide. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2016**, *51*, 446–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Medina, E.; Paredes, C.; Bustamante, M.A.; Moral, R.; Moreno-Caselles, J. Relationships between soil physico-chemical, chemical and biological properties in a soil amended with spent mushroom substrate. *Geoderma* **2012**, *173*, 152–161. [[CrossRef](#)]
9. Marín-Benito, J.M.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. 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* **2016**, *4*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Galán-Pérez, J.A.; Peña, A. Conditioning of a Calcaric Soil with Biosolid and Compost Under Laboratory Conditions: Exploration of Soil Property Evolution. *Pedosphere* **2019**, *29*, 266–272. [[CrossRef](#)]
11. Rodríguez-Liévana, J.A.; ElGouzi, S.; Mingorance, M.D.; Castillo, A.; Peña, A. Irrigation of a Mediterranean soil under field conditions with urban wastewater: Effect on pesticide behaviour. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2014**, *185*, 176–185. [[CrossRef](#)]
12. Pérez-Piqueres, A.; Edel-Hermann, V.; Alabouvette, C.; Steinberg, C. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Boil. Biochem.* **2006**, *38*, 460–470. [[CrossRef](#)]
13. García-Delgado, C.; Barba-Vicente, V.; Marín-Benito, J.M.; Igual, J.M.; Sánchez-Martín, M.; Rodríguez-Cruz, M.S. Simultaneous application of two herbicides and green compost in a field experiment: Implications on soil microbial community. *Appl. Soil Ecol.* **2018**, *127*, 30–40. [[CrossRef](#)]

14. Álvarez-Martín, A.; Hilton, S.; Bending, G.D.; Rodríguez-Cruz, M.S.; Sánchez-Martín, M.J. Changes in activity and structure of the soil microbial community after application of azoxystrobin or pirimicarb and an organic amendment to an agricultural soil. *Appl. Soil Ecol.* **2016**, *106*, 47–57. [[CrossRef](#)]
15. Marín-Benito, J.M.; Barba, V.; Ordax, J.; Andrades, M.; Sánchez-Martín, M.; Rodríguez-Cruz, M.S. Application of green compost as amendment in an agricultural soil: Effect on the behaviour of triasulfuron and prosulfocarb under field conditions. *J. Environ. Manag.* **2018**, *207*, 180–191. [[CrossRef](#)]
16. Cabrera, A.; Cox, L.; Spokas, K.A.; Hermosín, M.D.C.; Cornejo, J.; Koskinen, W. Influence of biochar amendments on the sorption–desorption of aminocyclopyrachlor, bentazone and pyraclostrobin pesticides to an agricultural soil. *Sci. Total. Environ.* **2014**, *470*, 438–443. [[CrossRef](#)]
17. Schloter, M.; Dilly, O.; Munch, J. Indicators for evaluating soil quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2003**, *98*, 255–262. [[CrossRef](#)]
18. Tejada, M. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere* **2009**, *76*, 365–373. [[CrossRef](#)]
19. García-Delgado, C.; Barba-Vicente, V.; Marín-Benito, J.M.; Igual, J.M.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Influence of different agricultural management practices on soil microbial community over dissipation time of two herbicides. *Sci. Total. Environ.* **2019**, *646*, 1478–1488. [[CrossRef](#)]
20. Lewis, K.; Green, A. The Pesticide Properties DataBase. *Chem. Int.* **2011**, *33*. [[CrossRef](#)]
21. Marín-Benito, J.M.; Carpio, M.J.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Previous degradation study of two herbicides to simulate their fate in a sandy loam soil: Effect of the temperature and the organic amendments. *Sci. Total. Environ.* **2019**, *653*, 1301–1310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Saleh, O.; Pagel, H.; Enowashu, E.; Devers, M.; Martin-Laurent, F.; Streck, T.; Kandeler, E.; Poll, C. Evidence for the importance of litter as a co-substrate for MCPA dissipation in an agricultural soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *23*, 4164–4175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cheng, J.; Lee, X.; Gao, W.; Chen, Y.; Pan, W.; Tang, Y. Effect of biochar on the bioavailability of difenoconazole and microbial community composition in a pesticide-contaminated soil. *Appl. Soil Ecol.* **2017**, *121*, 185–192. [[CrossRef](#)]
24. Juan, E.P.; Marín-Benito, J.M.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Dissipation of herbicides after repeated application in soils amended with green compost and sewage sludge. *J. Environ. Manag.* **2018**, *223*, 1068–1077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rodríguez-Cruz, M.S.; Pose-Juan, E.; Marín-Benito, J.M.; Igual, J.M.; Sánchez-Martín, M.J. Pethoxamid dissipation and microbial activity and structure in an agricultural soil: Effect of herbicide rate and organic residues. *Appl. Soil Ecol.* **2019**, *140*, 135–143. [[CrossRef](#)]
26. Baćmaga, M.; Borowik, A.; Kucharski, J.; Tomkiel, M.; Wyszowska, J. Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with a mixture of diflufenican + mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl-sodium. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *22*, 643–656. [[CrossRef](#)]
27. Tomkiel, M.; Baćmaga, M.; Borowik, A.; Kucharski, J.; Wyszowska, J. Effect of a mixture of flufenacet and isoxaflutole on population numbers of soil-dwelling microorganisms, enzymatic activity of soil, and maize yield. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2019**, *54*, 832–842. [[CrossRef](#)]
28. Delgado-Baquerizo, M.; Oliverio, A.M.; Brewer, T.E.; Benavent-González, A.; Eldridge, D.J.; Bardgett, R.D.; Maestre, F.T.; Singh, B.K.; Fierer, N. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* **2018**, *359*, 320–325. [[CrossRef](#)]
29. Sparks, D.L. *Methods of Soil Analysis, Part 3-Chemical Methods*; Soil Science Society of America, Inc.: Madison, WI, USA, 1996.
30. Marín-Benito, J.M.; Andrades, M.S.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Dissipation of Fungicides in a Vineyard Soil Amended with Different Spent Mushroom Substrates. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 6936–6945. [[CrossRef](#)]
31. Worrall, F.; Fernández-Pérez, M.; Johnson, A.C.; Flores-Cesperedes, F.; González-Pradas, E. Limitations on the role of incorporated organic matter in reducing pesticide leaching. *J. Contam. Hydrol.* **2001**, *49*, 241–262. [[CrossRef](#)]
32. Frostegård, A.; Bååth, E.; Tunlio, A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* **1993**, *25*, 723–730. [[CrossRef](#)]

33. Tabatabai, M.A. Soil enzymes. In *Methods of Soil Analysis, Part 2-Microbiological and Biochemical Properties*; Weaver, R.W., Angl, J.S., Bottomley, P.S., Eds.; Soil Science Society of America (SSSA): Madison, WI, USA, 1994; pp. 903–947.
34. Zelles, L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Boil. Fertil. Soils* **1999**, *29*, 111–129. [[CrossRef](#)]
35. Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* **2001**, *4*, 1–9.
36. Carpio, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S.; García-Delgado, C.; Sánchez-Martín, M.J.; Marín-Benito, J.M. Mobility monitoring of two herbicides in amended soils: A field study for modeling applications. *J. Environ. Manag.* **2020**, *260*, 110161. [[CrossRef](#)]
37. Svendsen, S.B.; Carvalho, P.N.; Bollmann, U.E.; Ellegaard-Jensen, L.; Albers, C.N.; Strobel, B.W.; Jacobsen, C.S.; Bester, K. A comparison of the fate of diflufenican in agricultural sandy soil and gravel used in urban areas. *Sci. Total. Environ.* **2020**, *715*, 136803. [[CrossRef](#)]
38. Bending, G.; Lincoln, S.D.; Edmondson, R.N. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isotoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environ. Pollut.* **2006**, *139*, 279–287. [[CrossRef](#)]
39. Moreno, J.L.; Bastida, F.; Sánchez-Monedero, M.A.; Hernandez, T.; Garcia, C. Response of Soil Microbial Community to a High Dose of Fresh Olive Mill Wastewater. *Pedosphere* **2013**, *23*, 281–289. [[CrossRef](#)]
40. Bai, Z.; Xu, H.-J.; He, H.-B.; Zheng, L.-C.; Zhang, X.-D. Alterations of microbial populations and composition in the rhizosphere and bulk soil as affected by residual acetochlor. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2012**, *20*, 369–379. [[CrossRef](#)]
41. Wu, X.; Xu, J.; Dong, F.; Liu, X.; Zheng, Y. Responses of soil microbial community to different concentration of fomesafen. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *273*, 155–164. [[CrossRef](#)]
42. Cycoń, M.; Wójcik, M.; Borymski, S.; Piotrowska-Seget, Z. A broad-spectrum analysis of the effects of teflubenzuron exposure on the biochemical activities and microbial community structure of soil. *J. Environ. Manag.* **2012**, *108*, 27–35. [[CrossRef](#)]
43. Jorge-Mardomingo, I.; Soler-Rovira, P.; Casermeiro, M.Á.; De La Cruz, M.T.; Polo, A. Seasonal changes in microbial activity in a semiarid soil after application of a high dose of different organic amendments. *Geoderma* **2013**, *206*, 40–48. [[CrossRef](#)]
44. Álvarez-Martín, A.; Rodríguez-Cruz, M.S.; Andrades, M.S.; Sánchez-Martín, M.J. Application of a biosorbent to soil: A potential method for controlling water pollution by pesticides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 9192–9203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Marinozzi, M.; Coppola, L.; Monaci, E.; Karpouzas, D.G.; Papadopoulou, E.; Menkissoglu-Spiroudi, U.; Vischetti, C. The dissipation of three fungicides in a biobed organic substrate and their impact on the structure and activity of the microbial community. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2012**, *20*, 2546–2555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Petrić, I.; Karpouzas, D.G.; Bru, D.; Udiković-Kolić, N.; Kandeler, E.; Djuric, S.; Martin-Laurent, F. Nicosulfuron application in agricultural soils drives the selection towards NS-tolerant microorganisms harboring various levels of sensitivity to nicosulfuron. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *23*, 4320–4333. [[CrossRef](#)]
47. Kalia, A.; Gosal, S.K. Effect of pesticide application on soil microorganisms. *Arch. Agron. Soil Sci.* **2011**, *57*, 569–596. [[CrossRef](#)]



# CONCLUSIONES





## 5. CONCLUSIONES

- 1) El modelo cinético que mejor describió las cinéticas de degradación de CTL y FNC en condiciones controladas de laboratorio dependió únicamente del herbicida y no de las enmiendas orgánicas aplicadas al suelo o de la temperatura de incubación. La presencia de los metabolitos desmetilclortoluron, FNC-ESA y FNC-OA detectada en todos los tratamientos del suelo y temperaturas, confirmó la degradación de los herbicidas como una de sus posibles vías de disipación.
- 2) Los valores del factor  $Q_{10}$  estimados a partir de los valores de  $DT_{50}$  de los herbicidas a ambas temperaturas subrayaron la necesidad de determinar este parámetro en suelos enmendados para generar datos de entrada más reales en los modelos FOCUS que eviten la subestimación o sobreestimación del efecto de la temperatura en la velocidad de degradación de herbicidas y conseguir una evaluación más precisa de su destino medioambiental.
- 3) Las enmiendas orgánicas aumentaron la capacidad de retención de agua por el horizonte superficial del suelo ralentizando la percolación y lixiviación de los compuestos químicos en el perfil del suelo. Sin embargo, la rápida movilidad de los compuestos se vio inicialmente más afectada por los eventos de lluvia registrados poco después de su aplicación que por las altas precipitaciones registradas en todo el periodo.
- 4) El contenido de CO y COD aportado por las enmiendas orgánicas al suelo tuvo un efecto opuesto sobre la dinámica de los herbicidas. Mientras que el CO aumentó la adsorción y/o persistencia de los herbicidas en las capas superiores del suelo, disminuyendo su movilidad (especialmente para FNC), el COD aumentó la biodisponibilidad de los herbicidas en solución para ser degradados y su movilidad a horizontes más profundos del suelo (especialmente para CTL) en ambos periodos experimentales.
- 5) El bajo balance total de los compuestos registrado en los perfiles del suelo al final de ambos periodos experimentales no está de acuerdo con las bajas cantidades de ambos herbicidas lixiviados a 1 m de profundidad, por lo que otros procesos de disipación diferentes a la movilidad (degradación, mineralización, formación de residuos

enlazados no extraíbles y/o absorción por el cultivo) podrían estar involucrados en su disipación, especialmente en los perfiles de los suelos enmendados.

- 6) Los modelos PRZM y MACRO aplicados al estudio de movilidad de los herbicidas predijeron con éxito la distribución vertical de  $\text{Br}^-$ , CTL y FNC a lo largo de los perfiles del suelo sin enmendar y enmendados, confirmando que ambos modelos podrían ser utilizados satisfactoriamente como herramienta predictiva a largo plazo de la contaminación de aguas subterráneas por CTL y FNC en este tipo de escenarios, al menos a una escala bianual, después de calibrar los parámetros de  $\text{DT}_{50}$  y/o  $\text{K}_d$  de acuerdo al contenido de COD de los suelos enmendados.
- 7) La aplicación de las enmiendas orgánicas ralentizó la velocidad de disipación de ambos herbicidas e incrementó su persistencia en la capa superficial del suelo tras su aplicación inicial en las parcelas experimentales, como se observó previamente en condiciones de laboratorio, debido a una mayor adsorción y menor biodisponibilidad de los herbicidas en solución para ser degradados. El efecto de la enmienda orgánica fue diferente dependiendo del herbicida.
- 8) Los valores de  $\text{DT}_{50}$  de ambos herbicidas obtenidos bajo condiciones reales de campo fueron superiores a los obtenidos bajo condiciones controladas de laboratorio, señalando un patrón de disipación diferente en ambas escalas y destacando la importancia de las condiciones ambientales variables en el proceso de disipación. Las condiciones ambientales también afectaron a la velocidad de formación de los principales metabolitos de ambos herbicidas a escala de campo en comparación con aquellas observadas en laboratorio.
- 9) La buena concordancia entre la cinética de disipación superficial de los herbicidas observada en campo en el primer año experimental y la simulada por el modelo MACRO en los tres tratamientos de suelo pone de manifiesto el potencial uso de este modelo como herramienta de predicción dirigida a estimar las cantidades remanentes de herbicidas en la zona de las raíces de los suelos enmendados y preservar al cultivo posterior de efectos adversos por la presencia de residuos de herbicidas.
- 10) La aplicación repetida de los herbicidas CTL y FNC en las parcelas experimentales de campo incrementó su velocidad de disipación y disminuyó su persistencia en el suelo, debido a una adaptación de los microorganismos del suelo a los compuestos



(biodegradación acelerada), a la presencia de los residuos orgánicos (contenidos de CO y COD), y a los factores ambientales (alta precipitación acumulada).

- 11) La persistencia del herbicida FNC, en la capa superior del suelo fue mayor que la del CTL en los tres tratamientos ensayados durante los dos periodos experimentales de acuerdo a las características de hidrofobicidad y solubilidad de cada herbicida.
- 12) En general, las enmiendas orgánicas provocaron un cambio significativo en la comunidad microbiana del suelo independientemente de los herbicidas, y fueron útiles para amortiguar los efectos de estos compuestos sobre la biomasa y la actividad microbiana del suelo, así como para reducir los cambios en la composición microbiana del suelo después de su aplicación, debido a la mayor capacidad de adsorción de estos compuestos por los suelos enmendados.
- 13) Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto el gran interés de obtener un conjunto de datos reales de campo sobre la movilidad/persistencia/disipación de herbicidas en suelos enmendados, necesario para diseñar protocolos racionales de aplicación conjunta de enmiendas orgánicas y herbicidas, ya que los cambios en la movilidad de los herbicidas en el perfil del suelo podría disminuir la presencia y/o efectividad del control de malas hierbas y dar lugar a contaminaciones de las aguas subterráneas, mientras que la presencia de cantidades residuales en el perfil del suelo podrían exceder el umbral de sensibilidad para especies o cultivos sensibles a estos compuestos con el consiguiente daño en cultivos posteriores.
- 14) Las simulaciones obtenidas apoyan el interés de integrar la práctica agronómica de aplicación de residuos orgánicos ampliamente extendida en la actualidad, en los estudios de modelización que se realizan como parte del proceso de registro de pesticidas en la Unión Europea para la evaluación de riesgos medioambientales. En este sentido, previamente a la utilización de los modelos como herramientas de predicción en suelos enmendados, y especialmente en el contexto regulatorio, es necesario llevar a cabo modelizaciones adicionales bajo diferentes combinaciones pedoclimáticas, de pesticidas, residuos orgánicos y cultivos, y además de ser probados durante periodos más prolongados, debido a la disminución en la eficiencia de los modelos con el tiempo de simulación para predecir la persistencia y movilidad de los herbicidas en los suelos enmendados.







**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**  
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**María José Carpio Espinosa**  
**TESIS DOCTORAL 2021**