Universitat de Girona

EMISSIONS DE N2O I DESNITRIFICACIÓ EN SÒLS AGRÍCOLES I D'ECOSISTEMES NATURALS. FACTORS DE REGULACIÓ

M. Elena SAGUER I HOM

ISBN: 978-84-694-2781-1
Dipòsit legal: GI-423-2011
http://hdl.handle.net/10803/7806

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESI DOCTORAL

EMISSIONS DE N_2O I DESNITRIFICACIÓ EN SÒLS AGRÍCOLES I D'ECOSISTEMES NATURALS. FACTORS DE REGULACIÓ

M. ELENA SAGUER i HOM

1997

Universitat de Girona

Departament d'Enginyeria Química Agrària i Tecnologia Agroalimentària

EMISSIONS DE N_2O I DESNITRIFICACIÓ EN SÒLS AGRÍCOLES I D'ECOSISTEMES NATURALS. FACTORS DE REGULACIÓ

Memòria redactada per optar al Grau de Doctor en Biologia,
per la Universitat de Girona, per

M. Elena Saguer i Hom

Vist-i-plau
Dels Directors de la Tesi

Dra. Maria A. Gispert i Negrell
Professora Titular d'Edafologia

Dr. Emili Montesinos Seguí
Catedràtic de Producció Vegetal

Girona, setembre de 1997

AGRAÏMENTS

Agraeixo a la Dra. Maria Gispert el fet que confiés en mi per dur a terme aquesta recerca i, tant a ella com al Dr. Emili Montesinos, la direcció d'aquest treball, la dedicació i el recolzament durant tots aquests anys.

Vull manifestar el meu agraïment al Dr. Giacomo Arcara per la seva atenció durant la meva estada al *Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo* a Florència. També a tots els grups de recerca que han participat en el projecte STEP, finançat per la C.E.E., dins el què s'emmarca part d'aquest treball. Especialment al *Laboratoire de Microbiologie de Sols* (INRA) de Dijon i al *Laboratory of Applied Physical Chemistry* de la Universitat de Gent per facilitar-me l'estada en els seus centres.

L'Estació Experimental de la Fundació "Mas Badia" m'ha proporcionat l'espai físic (les plantacions de pomeres) per poder realitzar l'estudi en sòls agrícoles. Agraeixo particularment els valuosos consells d'en Francesc Camps.

A Josep Pereda li vull donar les gràcies per la seva disponibilitat a ajudar-me sempre que ha calgut, per la seva habilitat fent els muntatges que requerien els experiments i un munt de "xapussilles" molt útils. A Josep Puig pel seu assessorament durant la posada a punt de l'anàlisi cromatogràfica.

A Narcís Vilà per la seva col.laboració en l'estudi de l'efecte dels adobs nitrogenats. A l'Emili Garcia pel seu ajut en el tractament estadístic de les dades i sobretot per la seva paciència (sola no hagués pogut!!!!).

Als meus companys de treball: Mònica (per ser la salsa del menjador; ah! i et veig bé, Moni), Carmen, Anna Mª (pels crusants i el Paladin, ummm!!), Esther (la taula és tota teva), Jesús (casi se me ha apoderado), Josep Lluís, Isidre, Cun, Jordi (Elena, ara ja ets gran... la, la, la), Xavi i Pere. Molt i molt especialment a la Dolors Parés (ara anirem per la teva!) i a l'Anna Bonaterra (la Boni, i no cal que escrigui per què).

A la DGU per concedir-me la beca per realitzar aquest treball. També he rebut un ajut del Programa Institucional d'Ajuts a la Recerca de la UdG (PIAR).

Als meus amics "biòlegs" ... o no.

A la meva família, per haver patit amb mi.

ÍNDEX

Capítol 1. Introducció

1.1 Implicacions mediambientals de l'augment de N_2O atmosfèric 5

1.2 Principals fonts de producció i consum de N_2O: el paper dels sòls 7

1.3 Processos implicats en la producció de N_2O en el sòl 9

1.3.1 Desnitrificació 9

1.3.1.1 Microorganismes responsables 10

1.3.1.2 Producció de N_2O per desnitrificació 12

1.3.2 Nitrificació 12

1.3.2.1 Microorganismes responsables 13

1.3.2.2 Producció de N_2O per nitrificació 14

1.3.3 Producció de N_2O per altres processos 15

1.4 Factors que influeixen en les emissions de N_2O a través de la nitrificació i la desnitrificació 17

1.4.1 Factors reguladors de la taxa dels processos 17

1.4.1.1 Factors proximals 18

1.4.1.2 Factors distals 19

1.4.1.3 Reguladors distals últims 22

1.4.2 Factors que regulen la proporció de N_2O produït 27

1.4.3 Factors que controlen l'emissió de N_2O 28

1.5 Importància relativa de la nitrificació i la desnitrificació en les emissions de N_2O 29

1.6 Estudi de les emissions de N-gas: Tècnica de la inhibició amb acetilè 30

1.6.1 Utilització de la tècnica d'inhibició amb acetilè per a l'estudi de la font principal d'emissió de N_2O 31

1.6.2 Inconvenients de la tècnica d'inhibició amb acetilè 31

1.7 Objectius generals del treball 32

Capítol 2. Material i Mètodes

2.1 Material 37

2.1.1 Sòls mostrejats 37

2.1.1.1 Sòls agrícoles 37

2.1.1.2 Sòls naturals 43

2.2 Mètodes 46

2.2.1 Determinació de la taxa d'emissió de N_2O i de desnitrificació 46

2.2.1.1 Mètodes d'incubació 46

2.2.1.1.1 Incubacions amb mostra intacta 46

2.2.1.1.2 Amb mostra alterada 50

2.2.1.2 Desenvolupament dels sedassos moleculars 52

2.2.1.3 Determinació quantitativa de N_2O per cromatografia de gasos amb detector de captura d'electrons (ECD) 52

2.2.2 Determinació d'altres paràmetres edàfics 53

2.2.2.1 Determinació dels continguts de nitrat i amoni. Mètodes colorimètrics 53

2.2.2.2 Determinació de l'activitat biològica del sòl (taxa respiratòria) 55

2.2.2.3 Caracterització físico-química del sòl 56

2.3 Anàlisi estadística de les dades 56

2.3.1 Anàlisi exploratòria de les dades 56

2.3.2 Anàlisi de la variància i test de separació de mitjanes 57

2.3.3 Anàlisi de les relacions entre les diferents variables 57

2.3.4 Anàlisi de Components Principals 58

2.3.5 Anàlisi de l'autocorrelació espacial 58

Capítol 3. Efecte de Diferents Pràctiques de Conreu sobre les Emissions de N_2O i la Desnitrificació en Sòls de Clima Mediterrani

3.1 Efecte de la dosi de reg sobre les emissions de N_2O i la desnitrificació 65

3.1.1 Metodologia per a l'Estudi d'missions de N_2O i de la taxa de desnitrificació en sòls de conreu de clima mediterrani 68

3.1.1.1 Resultats 68

3.1.1.2 Discussió 74

3.1.2 Dinàmica anual de l'activitat potencial desnitrificant i dels seus principals factors reguladors 79
3.1.2.1 Resultats 79
3.1.2.1.1 Variabilitat temporal de l'activitat potencial desnitrificant 80
3.1.2.1.2 Variabilitat temporal d'alguns paràmetres edàfics relacionats amb la desnitrificació 81
3.1.2.1.3 Relació entre activitat potencial desnitrificant i algunes característiques del medi edàfic 93
3.1.2.2 Discussió 97
3.1.2.2.1 Característiques del medi edàfic 97
3.1.2.2.2 Variabilitat temporal de l'activitat potencial desnitrificant 98
3.1.2.2.3 Variabilitat temporal d'alguns paràmetres edàfics relacionats amb la desnitrificació 99
3.1.2.2.4 Relació entre activitat potencial desnitrificant i alguns paràmetres edàfics 101
3.1.3 Efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant i els seus principals factors reguladors 105
3.1.3.1 Resultats 105
3.1.3.1.1 Efecte sobre l'activitat potencial desnitrificant 105
3.1.3.1.2 Efecte sobre els principals factors reguladors de l'APD 106
3.1.3.1.3 Relació entre l'activitat potencial desnitrificant i els seus principals factors reguladors 110
3.1.3.2 Discussió 112
3.1.3.2.1 Efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant 112
3.1.3.2.2 Efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre els principals factors reguladors de la desnitrificació 114
3.1.3.2.3 Relació entre activitat potencial desnitrificant i alguns factors reguladors 116
3.2 Efecte de l'aplicació de diferents tipus i dosis de fertilitzant nitrogenat sobre les emissions de N_2O 119
3.2.1 Resultats 122
3.2.1.1 Alteració de la mostra de sòl durant l'emmagatzematge 122
3.2.1.2 Efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats sobre les emissions de N_2O 122
3.2.1.3 Efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats sobre la taxa de desnitrificació i la relació $N_2O/(N_2O+N_2)$ 124

3.2.1.4 Efecte de l'aplicació de diferents dosis de fertilitzant nitrogenat sobre les emissions de N_2O 125
3.2.2 Discussió 128
3.2.2.1 Variació de les característiques de la mostra de sòl durant el període d'emmagatzematge 128
3.2.2.2 Efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats sobre les emissions de N_2O 128
3.2.2.3 Efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats sobre la taxa de desnitrificació i la relació $N_2O/(N_2O+N_2)$ 131
3.2.2.4 Efecte de l'aplicació de diferents dosis de fertilitzant nitrogenat sobre les emissions de N_2O 131

Capítol 4. Emissió de N_2O i Desnitrificació en Ecosistemes Naturals. Relació amb alguns Paràmetres Edàfics

4.1 Taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en ecosistemes naturals. Factors reguladors 136
4.1.1 Resultats 139
4.1.1.1 Característiques de les zones 139
4.1.1.1.1 Característiques físico-químiques del sòl 139
4.1.1.1.2 Taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació. Relació entre ambdues 141
4.1.1.1.3 Agrupació de les mostres 142
4.1.1.2 Relació entre les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació amb alguns paràmetres edàfics 145
4.1.1.3 L'activitat potencial desnitrificant (APD) com a variable predictora de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació 148
4.1.1.4 Relació entre activitat potencial desnitrificant i alguns paràmetres edàfics 150
4.1.2 Discussió 152
4.1.2.1 Característiques de les zones 152
4.1.2.2 Relació de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació amb alguns paràmetres edàfics 154
4.1.2.3 L'activitat potencial desnitrificant (APD) com a variable predictiva de les taxes actuals d'emissió de N-gas 156
4.1.2.4 Relació entre activitat potencial desnitrificant i alguns paràmetres edàfics 158

4.2 Taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en sòls forestals. Variabilitat espacial i factors de regulació 161
4.2.1 Resultats 164
4.2.1.1 Caracterització físico-química i biològica dels sòls 164
4.2.1.2 Taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació. Relació entre ambdues 167
4.2.1.2.1 Estructura de la variabilitat espacial de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació 170
4.2.1.2.2 Relació entre les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació amb alguns paràmetres edàfics 171
4.2.1.3 Taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en condicions d'anaerobiosi. Relació entre ambdues 173
4.2.1.3.1 Variabilitat espacial de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en condicions d'anaerobiosi 173
4.2.1.3.2 Relació entre les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació determinades en condicions d'anaerobiosi amb alguns paràmetres edàfics 174
4.2.2 Discussió 177
4.2.2.1 Característiques físico-químiques i biològiques del medi edàfic 177
4.2.2.2 Taxes actuals d'emissió de N_2O i desnitrificació 178
4.2.2.2.1 Estructura de la variabilitat espacial de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació 179
4.2.2.3 Relació de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació amb alguns paràmetres edàfics 180
4.2.2.4 Taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en condicions d'anaerobiosi, i relació entre ambdues 181
4.2.2.4.1 Variabilitat espacial de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació determinades en anaerobiosi 181
4.2.2.5 Relació de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en anaerobiosi amb alguns paràmetres edàfics 182

Conclusions 185

Bibliografia 191

Índex de Figures

Capítol 1. Introducció

Figura 1.1 - Cicle del nitrogen en sòls de conreu 3

Figura 1.2 - Química atmosfèrica del N_2O 6

Figura 1.3 - Seqüència reductiva dels òxids de nitrogen en el procés desnitrificant 10

Figura 1.4 - Esquema proposat per al procés nitrificant autotròfic 12

Figura 1.5 - Model conceptual dels dos nivells de regulació de la producció de N-gas traça via nitrificació i desnitrificació "hole-in-the-pipe" 17

Figura 1.6 - Diagrama esquemàtic dels principals factors que regulen la nitrificació i la desnitrificació en el sòl 26

Capítol 2. Material i Mètodes

Figura 2.1 - Diagrama ombrotèrmic obtingut a partir de dades climatològiques entre 1984-93 38

Figura 2.2 - Esquema del muntatge per a la realització d'incubacions *in situ* 47

Figura 2.3 - Esquema del sistema d'incubació de nuclis intactes de sòl amb recirculació 49

Capítol 3. Efecte de Diferents Pràctiques de Conreu sobre les Emissions de N_2O i la Desnitrificació en Sòls de Clima Mediterrani

Figura 3.1 - Efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre la taxa desnitrificant durant el període de reg en dos camps de pomera 68

Figura 3.2 - Exemple de l'evolució en l'emissió de N_2O durant el període d'incubació 71

Figura 3.3 - Efecte de les diferents condicions d'incubació sobre l'expressió dels enzims desnitrificants en mostres de sòl corresponents a diferents tractaments de reg 72

Figura 3.4 - Efecte de la dosi de reg aplicada sobre el valor mig d'activitat potencial desnitrificant en mostres de sòl recollides en les dues plantacions de pomeres 73

Figura 3.5 - Variació de l'activitat potencial desnitrificant (APD) al llarg de l'any en cadascuna de les dues plantacions de pomera 80

Figura 3.6 - Relació entre l'activitat potencial desnitrificant (APD) i el contingut hídric del sòl (CHS) en la plantació de pomeres joves 82

Figura 3.7 - Variació temporal del contingut de matèria orgànica (MO) en la plantació de pomeres joves. Relació amb l'activitat potencial desnitrificant del sòl en el moment de prendre la mostra (APD) 83

Figura 3.8 - Evolució del contingut de matèria orgànica i de la relació C/N al llarg de l'any en la plantació de pomeres joves 84

Figura 3.9 - Variació mensual del contingut de nitrats i amoni en la plantació de pomeres joves 85

Figura 3.10 - Fluctuació al llarg de l'any de la taxa respiratòria del sòl en la plantació de pomeres joves 86

Figura 3.11 - Variació anual de l'activitat potencial desnitrificant (APD) i del contingut d'aigua del sòl (CHS) en la plantació de pomeres adultes 88

Figura 3.12 - Variació de l'activitat potencial desnitrificant (APD) i del contingut de matèria orgànica del sòl (MO) al llarg de l'any en la plantació de pomeres adultes 89

Figura 3.13 - Variació en el contingut de matèria orgànica del sòl i de les seves característiques al llarg de l'any 90

Figura 3.14 - Variació anual del contingut de $N\text{-}NO_3$ i de $N\text{-}NH_4$ del sòl en la plantació de pomeres adultes 91

Figura 3.15 - Variació al llarg de l'any de la taxa respiratòria del sòl en la plantació de pomeres adultes 92

Figura 3.16 - Variació de l'activitat potencial desnitrificant (APD) durant el període d'irrigació en funció de la dosi de reg aplicada. 106

Figura 3.17 - Variació del contingut hídric del sòl durant el període d'irrigació en funció de la dosi de reg aplicada. 108

Figura 3.18 - Variació del contingut de matèria orgànica del sòl durant el període d'irrigació en funció de la dosi de reg aplicada. 109

Figura 3.19 - Variació del contingut de nitrats del sòl durant el període d'irrigació en funció de la dosi de reg aplicada. 110

Figura 3.20 - Variació de l'activitat potencial desnitrificant (APD) en funció del contingut hídric del sòl en ambdues plantacions de pomera. 111

Figura 3.21 - Cinètica acumulativa del N_2O emès en aplicar 100 ppm de N en forma de diferents adobs al llarg del període d'incubació. 123

Figura 3.22 - Emissions de N_2O i N-gas (N_2O + N_2) degudes a l'aplicació de 100 mg de $N.kg^{-1}$ de sòl sec. 124

Figura 3.23 - Cinètica acumulativa del N_2O emès en aplicar diferents dosis de N en forma de nitrat amònic. 125

Figura 3.24 - Cinètica acumulativa del N_2O emès en aplicar diferents dosis de N en forma de N32. 126

Figura 3.25 - Cinètica acumulativa del N_2O emès en aplicar diferents 100 ppm N en forma de N32 comercial i preparat al laboratori, juntament amb una incubació control 127

Capítol 4. Emissió de N_2O i Desnitrificació en Ecosistemes Naturals. Relació amb alguns Paràmetres Edàfics

Figura 4.1 - Representació gràfica de les diferents mostres considerant com a eixos les dues primeres components principals obtingudes pel mètode de rotació Varimax. 144

Figura 4.2 - Representació gràfica de les diferents mostres considerant com a eixos la primera i la tercera components principals obtingudes pel mètode de rotació Varimax. 144

Figura 4.3 - Relació entre activitat potencial desnitrificant (APD) i taxa actual d'emissió de N_2O en algunes de les zones mostrejades 149

Figura 4.4 - Variació de les taxes d'emissió de N-gas (N_2O i desnitrificació) en funció de l'activitat potencial desnitrificant (APD) en el sòl dels Aiguamolls de Vilaût 150

Figura 4.5 - Esquema del mostreig realitzat per a la determinació de l'estructura de la variabilitat espacial de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació 163

Figura 4.6 - Variació al llarg del transecte de cadascun dels paràmetres mesurats a Monte Amiata i Pania 165

Figura 4.7 - Activitat potencial desnitrificant (APD) determinada sota diferents condicions d'incubació 166

Figura 4.8 - Distribució de freqüències per a les dades de taxa d'emissió de N_2O i de desnitrificació: Monte Amiata i Pania 167

Figura 4.9 - Relació entre les taxes de desnitrificació i d'emissió de N_2O en els sòls mostrejats. Monte Amiata i Pania 169

Figura 4.10 - Variació al llarg del transecte de les taxes d'emissió de N_2O (N_2O) i de desnitrificació en el sòl de Monte Amiata i de Pania 170

Figura 4.11 - Semivariogrames construïts a partir de les dades de taxa d'emissió de N_2O transformades logarítmicament. Monte Amiata i Pania 171

Figura 4.12 - Variació de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en funció del contingut de matèria orgànica (MO) en el sòl de Monte Amiata 172

Figura 4.13 - Variació de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en funció del contingut de matèria orgànica (MO) en el sòl de Pania 172

Figura 4.14 - Taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació determinades en condicions d'anaerobiosi. Monte Amiata i Pania. 173

Figura 4.15 - Variació al llarg del transecte de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació (N_2O+N_2) en condicions d'anaerobiosi en els sòls de Monte Amiata i de Pania 174

Figura 4.16 - Variació de la taxa de desnitrificació determinada en condicions d'anaerobiosi en funció del contingut de nitrats en el sòl en el sòl de Monte Amiata 175

Figura 4.17 - Variació de la taxa d'emissió de N_2O determinada en condicions d'anaerobiosi en funció del contingut de nitrats en el sòl de Monte Amiata 175

Figura 4.18 - Variació de la taxa d'emissió de N_2O determinada en condicions d'anaerobiosi en funció del contingut de matèria orgànica (MO) en el sòl de Pania 176

Figura 4.19 - Variació de la taxa desnitrificant determinada en condicions d'anaerobiosi en funció del pH en el sòl de Pania 176

Índex de Taules

Capítol 1. Introducció

Taula 1.1 - Fonts d'emissió i consum de N_2O estimats 8

Capítol 2. Material i Mètodes

Taula 2.1 - Característiques de les plantacions de pomera de la Finca Experimental "Mas Badia" 39

Taula 2.2 - Caracterització físico-química de l'horitzó A_p d'ambdós camps de pomeres, joves i adultes, situats a la Finca Experimental "Mas Badia" 41

Taula 2.3 - Característiques dels adobs nitrogenats assajats 42

Taula 2.4 - Característiques descriptives de les zones mostrejades (sòls naturals) 44

Taula 2.5 - Especificació i condicions d'operació del cromatògraf de gasos utilitzat per a la determinació quantitativa del N_2O 53

Capítol 3. Efecte de Diferents Pràctiques de Conreu sobre les Emissions de N_2O i la Desnitrificació en Sòls de Clima Mediterrani

Taula 3.1 - Efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre la taxa de desnitrificació durant el període d'irrigació en dues plantacions de pomera que difereixen en l'edat de plantació 69

Taula 3.2 - Estadística descriptiva dels paràmetres edàfics mesurats mensualment durant un any a la plantació de pomeres joves i la plantació adulta. 79

Taula 3.3 - Contingut hídric del sòl (CHS) de la plantació de pomeres joves en funció del mes de mostreig. 82

Taula 3.4 - Contingut de matèria orgànica del sòl (MO) de la plantació de pomeres joves en funció del mes de mostreig 83

Taula 3.5 - Valor de la relació C/N de la matèria orgànica del sòl de la plantació de pomeres joves en funció del mes de mostreig 84

Taula 3.6 - Contingut de nitrats i d'amoni en el sòl de la plantació de pomeres joves en funció del mes de mostreig 86

Taula 3.7- Taxa respiratòria del sòl de la plantació de pomeres joves en funció del mes de mostreig 87

Taula 3.8 - Contingut hídric del sòl (CHS) de la plantació de pomeres adultes en funció del mes de mostreig 88

Taula 3.9 - Contingut de matèria orgànica (MO) del sòl de la plantació adulta en funció del mes de mostreig 89

Taula 3.10 - Valor mig de la relació C/N de la matèria orgànica del sòl de la plantació adulta en funció del mes de mostreig 90

Taula 3.11 - Contingut de N-mineral (ppm) en el sòl de la plantació adulta en funció del mes de mostreig 92

Taula 3.12 - Taxa respiratòria del sòl de la plantació de pomeres adultes en funció del mes de mostreig 93

Taula 3.13 - Matriu de correlacions entre els diferents paràmetres edàfics mesurats en la plantació jove 94

Taula 3.14 - Matriu de correlacions entre els diferents paràmetres edàfics mesurats en la plantació adulta 95

Taula 3.15 - Efecte dels factors camp, dosi de reg i mes de mostreig sobre l'activitat potencial desnitrificant. 105

Taula 3.16 - Efecte dels factors camp, dosi de reg i mes de mostreig sobre el contingut hídric, de matèria orgànica i de nitratsdel sòl. 107

Taula 3.17 - Variació de les característiques de la mostra de sòl durant el període d'emmagatzemament a baixes temperatures. 122

Capítol 4. Emissió de N_2O i Desnitrificació en Ecosistemes Naturals. Relació amb alguns Paràmetres Edàfics

Taula 4.1 - Característiques físico-químiques del sòl de les diferents zones mostrejades 140

Taula 4.2 - Valor mig i rang de variació de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació i de la proporció de N emès en forma de N_2O respecte a les emissions totals (N_2O+N_2) en cadascuna de les zones mostrejades 142

Taula 4.3 - Càrregues factorials corresponents a les 3 primeres components principals obtingudes pel mètode de rotació Varimax 143

Taula 4.4 - Matriu de correlacions utilitzant el coeficient de Pearson entre les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació i els seus principals factors reguladors 145

Taula 4.5 - Significació i variabilitat explicada per diferents models de regressió lineal obtinguts entre les taxes d'emissió de N-gas i algunes variables edàfiques. 147

Taula 4.6 - Valors mig, màxim i mínim d'activitat potencial desnitrificant en cadascuna de les zones mostrejades 148

Taula 4.7 - Estadística descriptiva per a cadascun dels paràmetres mesurats a Monte Amiata i Pania. 164

Taula 4.8 - Valors del test de Shapiro-Wilks i probabilitat per a les taxes d'emissió de N_2O i desnitrificació en cadascun dels sòls 168

Taula 4.9 - Estadística descriptiva de les dades corresponents a les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació 168

CAPÍTOL 1

Introducció

El N és present en les diferents esferes de la Terra. Tanmateix, una característica xocant del seu patró de distribució és la grandària de la reserva inert: s'estima que el 94 % del N total es troba en la litosfera. La major part de la resta forma part de l'atmosfera, on el N_2 constitueix el 79 % de la seva composició volumètrica; només una petita part es troba en la biosfera. Malgrat tot, la grandària dels diferents reservoris no indica res sobre la dinàmica i la intensitat dels fluxos entre ells. En aquest sentit, tot i que la quantitat de N en el sòl és negligible comparada amb la d'altres reservoris s'ha definit un cicle del N intern, part integral del cicle global del N en la natura, el qual és possible gràcies a la quantitat poc comú de nivells d'oxidació que presenta aquest element (Figura 1.1).

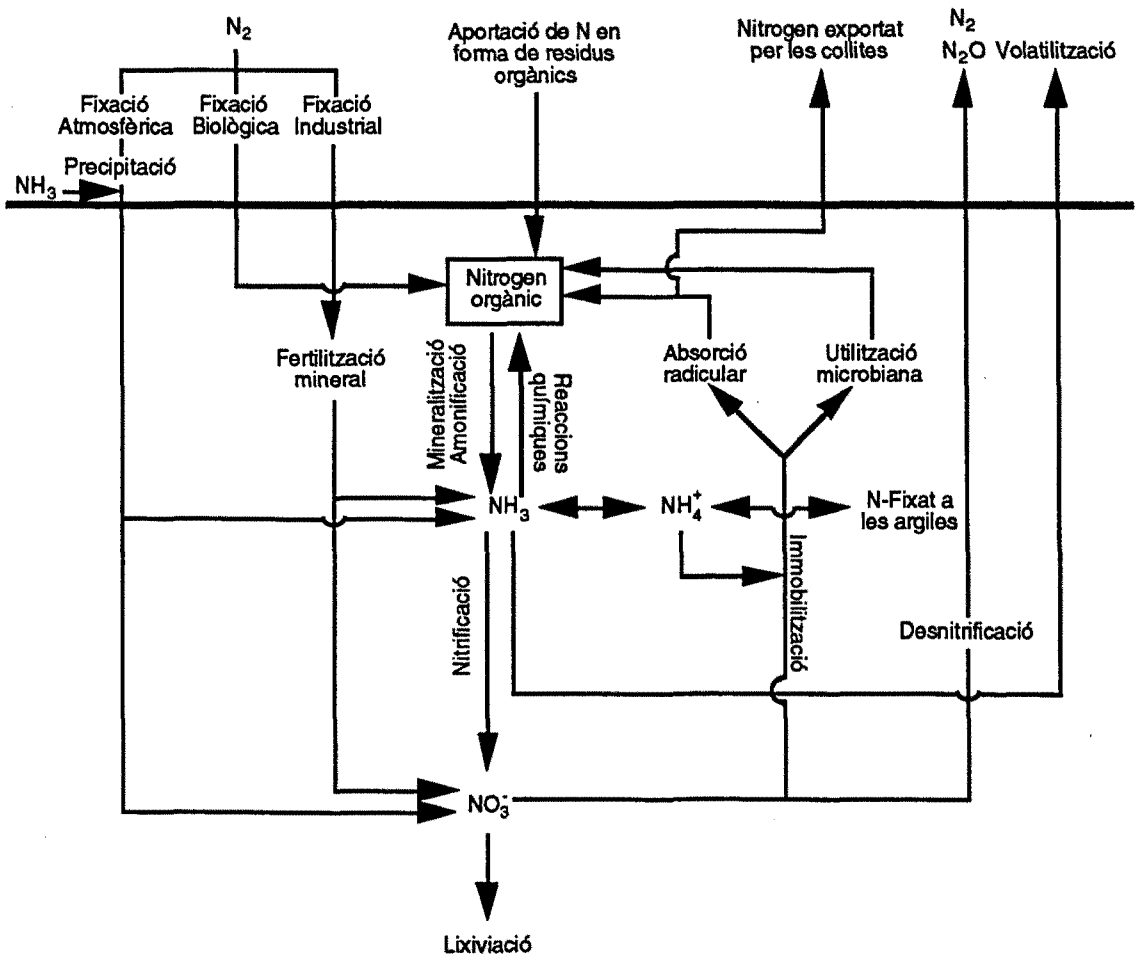

Figura 1.1 - Cicle del nitrogen en sòls de conreu

En el cicle del N en el sòl, un àtom de N és transferit d'un estat d'oxidació a un altre de manera arbitrària (Stevenson, 1986) gràcies fonamentalment a l'activitat dels microorganismes edàfics. El seu punt clau és la renovació del N a través dels processos de mineralització i immobilització, ja que les quantitats de N disponibles per a les plantes (ions amoni o nitrat) en un moment donat són sovint limitades.

La major part d'ecosistemes terrestres naturals es caracteritzen per presentar un cicle del N gairebé tancat en el que les entrades i sortides del sistema són petites en relació a les quantitats ciclades entre sòl i vegetació; pràcticament el 95 % del N que es recicla en el sòl interacciona exclusivament dins el sistema sòl-planta, de manera que només el 5 % restant del flux total fa referència als intercanvis amb l'atmosfera i la hidrosfera (Stevenson, 1986). Tanmateix, aquest equilibri dinàmic natural pot estar fortament alterat com a conseqüència de l'activitat antròpica. En aquest sentit, el pas d'un sistema de subsistència a una agricultura basada en l'explotació massiva ha comportat, entre d'altres coses, l'ús desmesurat de fertilitzants nitrogenats donat que el N és el nutrient que sovint limita la producció vegetal, i afavorit per la bona relació cost/producció. La recuperació del N aplicat normalment és inferior al 50 % (Byrnes *et al.*, 1990; Egginton i Smith, 1986; Haider i Schneider, 1992; Hallmark i Terry, 1985), una taxa que varia en funció de l'espècie vegetal, les propietats del sòl, les pràctiques agrícoles, i les característiques climatològiques. El N remanent en el sòl és susceptible de perdre's del sistema sòl-planta ja sigui per lixiviació o bé en forma gasosa.

Si en un principi l'interès d'estudi de les pèrdues de N del sòl cap a l'atmosfera responia bàsicament a un intent de minimitzar-les per tal de millorar el rendiment agrícola, la major conscienciació actual dels problemes de pol.lució atmosfèrica que acompanyen aquestes pèrdues ha reorientat les investigacions cap a un coneixement més profund dels processos implicats així com dels seus principals factors reguladors en les emissions dels compostos nitrogenats que comporten un major perjudici des d'un punt de vista ecològic, entre ells el monòxid de dinitrogen (N_2O).

Concretament, l'objectiu d'aquest capítol introductori és intentar reflexar la dificultat que comporta aprofundir en el coneixement de les emissions de N_2O del sòl a l'atmosfera. La participació de diferents processos, amb una regulació particular en cada cas tant pel que fa a la taxa del procés com a les pèrdues de N_2O a través del procés, i les imbricades interrelacions entre els diferents factors reguladors ja siguin d'un o altre procés fan del seu estudi una tasca realment difícil. Això ha fet que, en determinats aspectes, aquesta introducció vagi més enllà del que realment afecta als objectius particulars de l'estudi pròpiament dit.

1.1 Implicacions mediambientals de l'augment de N_2O atmosfèric

El N_2O és un component natural de l'atmosfera de la Terra. Tanmateix, entre el 29 i el 46 % de les emissions globals de N_2O corresponen a fonts antròpiques. S'ha estimat que abans de la revolució industrial els nivells de N_2O atmosfèrics es trobaven entre 280-285 ppb (Pearman *et al.*, 1986). En l'actualitat la seva concentració es troba al voltant de les 310 ppb (Crutzen, 1994). Això suposa un increment aproximat del 8 % en la concentració atmosfèrica de N_2O des de l'inici de la revolució industrial. Es calcula que cada any s'emeten a l'atmosfera entre 13 i 17 Tg de N-N_2O (Kroeze i Bouwman, 1994; Yoshinari, 1990), amb una taxa d'eliminació estratosfèrica de 10-11 Tg de N-N_2O.any^{-1} i amb una acumulació d'entre 3 i 6 Tg de N-N_2O.any^{-1} (Bouwman, 1990b; Yoshinari, 1990). Per tant, se suposa una taxa d'increment anual d'aproximadament 0.2-0.4 % (Yoshinari, 1990).

Canvis en el flux cap a l'atmosfera dels principals constituents atmosfèrics no tenen pràcticament efecte sobre la grandària del seu reservori en aquest compartiment; per contra, l'augment de la concentració d'alguns dels seus components minoritaris té conseqüències no sempre satisfactòries. En aquest sentit, la creixent preocupació per l'increment en la concentració atmosfèrica de N_2O a partir de la revolució industrial és deguda a les seves interaccions amb la fotoquímica atmosfèrica i el balanç de la radiació de la Terra donat que el N_2O:

a. intervé en la destrucció de la capa estratosfèrica d'ozó

El N_2O és el principal compost no-sintètic involucrat en l'exhauriment de l'ozó estratosfèric. Donada la seva estabilitat a nivell de troposfera, el N_2O pot arribar a l'estratosfera convertint-se en la font principal de NO_x estratosfèrics ja que, malgrat ser principalment destruït per fotòlisi, també es donen pèrdues secundàries (de l'ordre del 5 %) per reacció amb l'oxigen dissociat de l'O_3 [O (^{1}D)]. Conseqüentment es forma NO, el qual juga un paper important com a catalitzador en la destrucció de les molècules d'ozó (Figura 1.2), sobretot si es té en compte que el NO resta incòlume en el procés.

Aquesta alteració de l'equilibri dinàmic existent entre els processos de formació i destrucció de la molècula d'ozó, ambdós depenents de la radiació solar de longitud d'ona curta però requerint fotons de longitud diferents, comporta una disminució de la quantitat mitja d'ozó present en l'estratosfera. Segons Stolarski *et al.* (1992), del 1979 al 1991 la capa d'ozó va experimentar pèrdues d'entre el 3 i el 5 % a latituds mitges, i del 6 al 8 % a latituds elevades; a latituds properes a l'Equador no es va observar una disminució del seu contingut. Que es

manitngui la capa d'ozó és important donat que absorbeix més del 99 % de la radiació ultraviolada que arriba en la longitud d'ona més perillosa per la biosfera (λ<300 nm). Sembla que una disminució del 10 % en la quantitat d'O_3 atmosfèric comporta un increment del 20 % de radiació UV de λ=350 nm que arriba a la superfície de la Terra, del 250 % a 290 nm, i del 500 % a 287 nm.

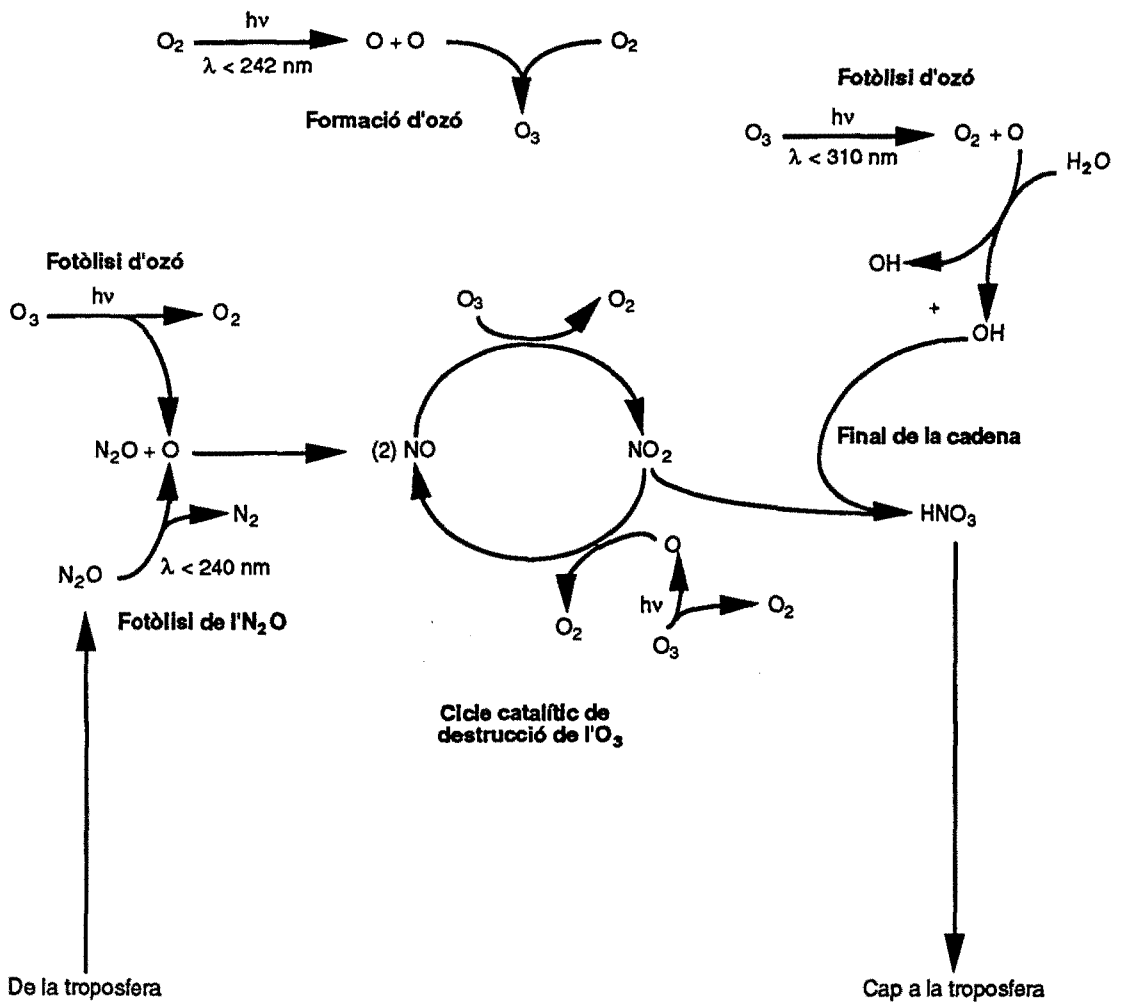

Figura 1.2 - Química atmosfèrica del N_2O

b. contribueix a l'efecte hivernacle

El N_2O és un gas capaç d'absorbir radiació infraroja. Sobre una base molècula a molècula, el potencial d'absorció radiatiu del N_2O és 150 vegades el del CO_2. En base a la seva força radiativa per molècula i al seu temps de residència atmosfèric (100-200 anys), es calcula que

l'impacte acumulatiu relatiu és de l'ordre de 3400 $W.m^{-2}.any^{-1}.Pmol^{-1}$, mentre que el del CO_2 és de 19 (Lashof i Ahuja, 1990). D'aquí que el N_2O pugui explicar entre el 4-5 % de l'efecte hivernacle (Bouwman, 1990b; Schimel *et al.*, 1992), tot i que en l'atmosfera el N_2O és unes 1000 vegades menys abundant que el CO_2. S'estima que doblant la concentració atmosfèrica de N_2O, l'escalfament global podria incrementar 0.3 °C (Crutzen, 1983).

Aquest canvi climàtic pot tenir conseqüències sobre els diferents ecosistemes terrestres des del punt de vista de la biodiversitat. El fet de que elevades temperatures superficials puguin comportar una disminució del contingut de matèria orgànica del sòl i augmentar la seva erosivitat, i que l'increment del nivell del mar conseqüència del desgel dels casquets polars inundés zones costaneres sovint molt productives agrícolament i amb una elevada densitat de població- són altres possibles efectes indirectes del canvi climàtic que incrementen l'interés per l'estudi dels processos involucrats en les emissions de N_2O i els factors que els regulen.

c. participa en la pluja àcida

D'altra banda, la formació de NO a partir de la destrucció estratosfèrica del N_2O també té com a conseqüència indirecta la seva participació en la pluja àcida. El NO_2 format a partir de l'oxidació del NO pot dissoldre's amb l'aigua de pluja per donar àcid nítric (HNO_3), disminuint el seu pH.

Tot i que, degut a la seva capacitat esmorteïdora, l'efecte de la pluja àcida sobre els sòls és menys greu que en els llacs, un impacte prolongat pot saturar aquesta capacitat. Si això arriba a passar, la conseqüent disminució del pH de la solució del sòl pot anar acompanyada d'un increment en la concentració d'Al dissolt, fins a nivells que poden resultar tòxics per als organismes vius.

1.2 Principals fonts de producció i consum de N_2O: el paper dels sòls

Es considera que els sòls, els quals emeten 4 vegades més N_2O que els oceans, són la font principal de N_2O atmosfèric (Yoshinari, 1990). Incloent tant les fonts naturals com les antròpiques, sembla que contribueixen en més d'un 50 % de les emissions totals (Bouwman,

1990b; Langeveld i Hofman, 1994). Temps enrera alguns autors mantenien que el N_2O provinent de la combustió de carburant fòssil podia explicar bona part de l'increment en la concentració atmosfèrica de N_2O (Weiss i Craig, 1976). Tanmateix, sembla que aquestes estimacions podrien ser errònies ja que el N_2O s'hauria format a l'interior de les ampolles de recollida de mostres a partir de NO i a través d'una reacció que involucra SO_2 i H_2O (Muzio i Kramlich, 1988). Això ha comportat una notable revalorització de les emissions de N_2O dels sistemes edàfics. A la Taula 1.1 es mostra la importància de les diferents fonts d'emissió.

Taula 1.1 - Fonts d'emissió i consum de N_2O estimats (en Tg de N-N_2O. any^{-1}) (Font: IPCC, 1992 - ct. Batjes, 1992).

Emissió	
Natural	
Oceans	1.4-2.6
Sòls tropicals	
Boscos humits	2.2-3.7
Sabanes seques	0.5-5.0
Sòls Temperats	
Boscos	0.05-2.0
Prats	?
Antròpica	
Sòls de conreu	0.03-3.0
Combustió de biomassa	0.2-1.0
Combustió de carburants fòssils	
Fonts estacionàries	0.1-0.3
Fonts mòbils	0.2-0.6
Producció d'àcid adípic	0.4-0.6
Producció d'àcid nítric	0.1-0.3
Consum	
Eliminat pels sòls	?
Fotòlisi atmosfèrica	7-13
Increment atmosfèric	3-4.5

Bouwman *et al.* (1993) estimen una emissió global dels sòls actualment amb vegetació natural de 4.3 Tg de N-N_2O.any^{-1}. Els valors més elevats d'emissió de N_2O es donen en sòls de boscos tropicals humits (Keller *et al.*, 1986; Livingston *et al.*, 1988;). Tot i que els sòls de les sabanes tropicals es caracteritzen per presentar taxes d'emissió de N_2O inferiors, aquests ecosistemes també són importants fonts de N_2O donada la seva gran extensió (Bouwman, 1990b; Johansson *et al.*, 1988).

S'estima que la contribució de l'agricultura i activitats relacionades a les emissions de N_2O d'origen antropogènic es troba entre el 70 - 92 % (Duxbury *et al.*, 1993). En sòls de conreu, les emissions de N_2O resultat de l'aplicació d'adobs nitrogenats poden arribar a representar el 20 %

de les emissions globals anuals (Colbourn i Dowdell, 1984). Altres pràctiques agrícoles, com l'aplicació de reg, també poden afectar aquestes emissions. A més, cal considerar l'expansió de l'àrea agrícola actual. En aquest sentit, s'ha observat que la conversió de boscos tropicals en terres de pastura comporta un augment de la taxa d'emissió de N_2O respecte a la del bosc original, tot i que no està clar si aquesta situació es mantindrà durant un període llarg de temps (Bouwman, 1990b).

El sòl no només és una font de producció important de N_2O sinó que també pot actuar com a consumidor, entenent aquest terme com la difusió del N_2O de l'atmosfera externa cap el sòl on és reduït a N_2 (Letey *et al.*, 1981; Robertson i Tiedje, 1987; Ryden, 1981). Segons Rosswall *et al.* (1989), els sòls fortament anaerobis en són els principals responsables ja que en aquests ambients el N_2O és fàcilment utilitzat com a acceptor d'electrons per part dels microorganismes desnitrificants. La quantitat de N_2O reduït a través d'aquesta via probablement és molt baixa degut a que la difusió de N_2O de l'atmosfera externa cap al sòl pot ser extremadament lenta sota condicions molt humides. D'altra banda, el N_2O produït a major profunditat pot ser consumit en les capes més superficials durant el seu transport cap a l'atmosfera a través d'un procés difusiu. Globalment, Cicerone (1989) estima una taxa global anual d'eliminació de N_2O per part dels sòls d'entre 1.5 - 3 Tg N. Les principals pèrdues de N_2O es donen per fotòlisi estratosfèrica.

1.3 Processos implicats en la producció de N_2O en el sòl

Tot i que en les emissions de N_2O del sòl a l'atmosfera hi estan involucrats processos tant abiòtics com biòtics, al voltant del 90 % d'aquestes emissions són d'origen biòtic (Bouwman, 1990a). Els processos biològics bàsicament responsables d'aquestes emissions són la desnitrificació (Firestone i Davidson, 1989; Goodroad i Keeney, 1984) i la nitrificació (Hutchinson *et al.*, 1993; Lipschultz *et al.*, 1981); tanmateix, la major part dels processos microbians en els què es dóna oxidació o reducció de N a través dels estats d'oxidació +1 o +2 poden produir quantitats traça de N_2O (Firestone i Davidson, 1989).

1.3.1 Desnitrificació

La desnitrificació es defineix com el procés de respiració anaeròbica en el què els òxids de N (NO_3^-, NO_2^-) actuen com a acceptors terminals d'electrons substituint l'oxigen amb la producció de formes gasoses de N, bàsicament N_2O i N_2 (Firestone, 1982). En aquest procés el nitrat és

successivament reduït via NO_2^-, NO i N_2O a N_2 a través de reductases específiques lligades a la cadena de transport electrònic de la membrana citoplasmàtica.

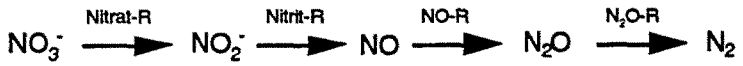

Figura 1.3 .- Seqüència reductiva dels òxids de nitrogen en el procés desnitrificant. R=reductasa

La respiració de l'oxigen i la respiració dels òxids de nitrogen són processos similars. Molts dels acceptors d'electrons intermediaris utilitzats durant la respiració de l'oxigen són també utilitzats durant la desnitrificació (Firestone, 1982). Tanmateix, sembla que amb aquest procés només s'obté aproximadament el 60 % de l'energia obtinguda per respiració aeròbica (Koike i Hattori, 1975), amb una eficiència de creixement amb NO_3^-, NO_2^- i N_2O com a acceptors terminals proporcional a l'estat d'oxidació del N, indicant que per a cada dos passos reductius es genera el mateix nombre d'ATP (Firestone, 1982).

La utilització seqüencial dels acceptors electrònics sembla que està controlada per una inhibició de les reductases posteriors pels substrats de les reductases anteriors (Payne i Balderston, 1978). Els valors de K_m per a les NO_2-, NO- i N_2O-reductases són suficientment baixos per ser compatibles amb baixes concentracions dels seus substrats. El pas clau que caracteritza el procés desnitrificant és la reducció irreversible del NO_2^- a NO i N_2O (Coyne i Tiedje, 1990).

Des d'un punt de vista ecològic, la desnitrificació es pot entendre com el principal procés biològic a través del qual el nitrogen fixat és retornat del sòl a l'atmosfera (Firestone, 1982; Tamm, 1991), jugant un paper central en la dinàmica global de les formes traça de nitrogen gas donat que és l'únic procés, tant biòtic com abiòtic, capaç de produir i consumir NO i N_2O (Firestone i Davidson, 1989).

1.3.1.1 Microorganismes responsables

La gran majoria de microorganismes desnitrificants són bacteris anaeròbics facultatius, generalment heterotròfics. La major part d'ells no són fermentadors, però sí capaços d'oxidar completament compostos no fermentables fins a CO_2. No tots ells poden realitzar la reducció

completa del NO_3^- a N_2; tanmateix, sembla ser vàlid assumir que tots els desnitrificants funcionalment significatius en els diferents ambients naturals són capaços de realitzar la seqüència desnitrificant completa.

Pseudomonas, *Flavobacterium* i *Alcaligenes* són tres gèneres de bacteris desnitrificants freqüentment aïllats del sòl (Smith i Zimmerman, 1981). Segons Gamble *et al.* (1977) *Pseudomonas fluorescens* és el bacteri desnitrificant dominant en els sòls, el qual pot arribar a representar una tercera part de les espècies aïllades. Tot i això, la capacitat per desnitrificar està difosa entre un ampli nombre de grups taxonòmics i fisiològics.

Malgrat que la desnitrificació és un procés essencialment anaeròbic, actualment s'ha mostrat que sòls aparentment ben drenats també desnitrifiquen. Fins ara, això era atribuït a l'existència de microzones anaeròbiques dins dels agregats del sòl (Tiedje *et al.*, 1984). Tanmateix, sembla que la desnitrificació també es pot donar en presència d'oxigen. El rang de concentracions en el que aquest procés es pot donar va des de condicions pràcticament anaeròbiques per *Paracoccus denitrificans*, fins al 90 % de saturació d'aire per *Thiosphaera pantotropha*; *Alcaligenes* sp. desnitrifica en condicions d'un 53 % de saturació d'aire (Körner i Zumft, 1989).

D'altra banda, s'ha observat que, tot i semblar una paradoxa, microorganismes fixadors de N_2 del gènere *Rhizobium* lliures o bé simbionts (García-Plazaola *et al.*, 1993; Zablotowicz *et al.*, 1978), *Azospirillum* sp. (Firestone, 1982) i *Spirillum lipoferum* (Neyra i Van Berkum, 1977; Neyra *et al.*, 1977) també poden contribuir als fluxos de N_2O, en particular a les sabanes i els boscos tropicals, no només per l'addició de N a l'ecosistema (Bouwman, 1990a), sinó també directament a través de la desnitrificació. Tanmateix, desnitrificació i fixació de N_2 no es poden donar simultàniament de manera significativa (Firestone, 1982). Sembla que la desnitrificació en aquests microorganismes es pot entendre més aviat com un mecanisme de protecció de la nitrogenasa enfront els nitrits, als quals és sensible (García-Plazaola *et al.*, 1993; Pagan *et al.*, 1977). El nitrit podria inhibir l'activitat d'una oxidasa terminal, canalitzant el flux d'electrons cap a la nitrit-reductasa de manera que aquell seria reduït ràpidament a N_2O, permetent reprendre la respiració amb O_2. En alguns casos s'ha observat que la desnitrificació s'atura a nivell de N_2O (Daniel *et al.*, 1982). Tanmateix, s'ha mostrat que la nitrogenasa també pot actuar com a N_2O-reductasa i que és inhibida per l'acetilè (Jensen i Burris, 1986).

Finalment, tot i que fins ara s'atribuïa l'activitat desnitrificant a microorganismes procariotes, recentment s'ha observat que diferents fongs també poden desnitrificar (Nakahara *et al.*, 1993; Shoun *et al.*, 1992; Usuda *et al.*, 1995). Sembla que aquest procés pot ser comú entre els fongs del sòl, variant l'eficiència en la producció d'energia entre espècies fúngiques (Usuda *et*

al., 1995); de fet, els sistemes desnitrificants dels diferents fongs en els què s'ha establert aquesta capacitat presenten característiques diferencials.

1.3.1.2 Producció de N_2O per desnitrificació

Les espècies nitrogenades produïdes en la desnitrificació i els enzims involucrats en cada pas han estat durant molt de temps objecte de controvèrsia donada la dificultat de demostrar la presència de NO com a intermediari obligatori. Actualment, però, està clarament identificada la NO-reductasa desnitrificant (Heiss *et al.*, 1989; Kroneck i Zumft, 1990). Malgrat això, en totes les vies proposades, sempre s'ha mostrat el N_2O com un intermediari obligatori antecedent al N_2 (Smith *et al.*, 1978; Firestone i Davidson, 1989) que en alguns casos, depenent de l'organisme responsable i de les condicions ambientals, pot convertir-se en el principal producte final del procés desnitrificant.

1.3.2 Nitrificació

La nitrificació es defineix com el procés biològic d'oxidació de l'amoni (nitrificació autotròfica) o de compostos orgànics nitrogenats (nitrificació heterotròfica) a nitrit o nitrat. Tot i que s'ha trobat que hi ha algunes semblances en els enzims nitrificants d'autòtrofs i heteròtrofs, no està clar que realment sigui així (Robertson i Kuenen, 1990a). El procés autotròfic consta de dues etapes en les que hi intervenen microorganismes diferents: l'oxidació de NH_4^+ a NO_2^-, i la subseqüent oxidació del NO_2^- a NO_3^-. La transferència de 6 e- durant el primer pas suggereix l'existència de dos intermediaris; hidroxilamina (NH_2OH) i nitroxil (NOH) en són els principals candidats, tot i que aquest darrer no s'ha pogut demostrar. Per contra, sembla que el pas de nitrit a nitrat és directe.

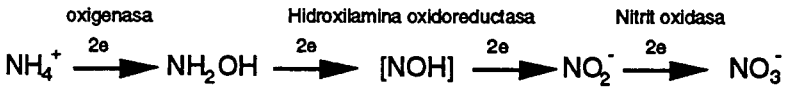

Figura 1.4 - Esquema proposat per al procés nitrificant autotròfic

Els electrons produïts durant la nitrificació autotròfica redueixen l'oxigen molecular després de ser transportats a través d'una cadena citocròmica, amb producció d'ATP, el qual és utilitzat per a la fixació de CO_2. En canvi, la nitrificació heterotròfica és un procés independent de la producció cel.lular que es defineix com una co-oxidació de l'amoni durant la mineralització de diferents substàncies orgàniques.

1.3.2.1 Microorganismes responsables

a. Nitrificació autotròfica

La nitrificació autotròfica la realitzen bacteris quimiautòtrofs gram-negatius que pertanyen a la família *Nitrobacteriaceae*. Es tracta de bacteris altament especialitzats que requereixen condicions ecològiques específiques. Mentre que *Nitrosomonas* és el principal organisme edàfic responsable de l'oxidació de l'amoni, l'oxidació del nitrit a nitrat està restringida al gènere *Nitrobacter*. A diferència de *Nitrosomonas*, pot ser un autòtrof facultatiu, ja que pot utilitzar piruvat, acetat i altres carbohidrats. Tanmateix, el pas a un tipus de metabolisme heteròtrof és molt lent i amb un baix nivell de creixement. En general, el rendiment obtingut durant el procés nitrificant és baix.

b. Nitrificació heterotròfica

A diferència de la nitrificació autotròfica, la nitrificació heterotròfica pot ser realitzada per una gran varietat d'organismes, procariotes i eucariotes (bacteris, fongs, actinomicets), alguns dels quals presenten capacitat desnitrificant com *Alcaligenes* sp. i diferents espècies de *Pseudomonas* (Castignetti i Hollocher, 1984; Papen *et al.*, 1989). Generalment es creu que la nitrificació heterotròfica contribueix pobrament a aquestes emissions si es compara amb les produïdes com a resultat de la nitrificació autotròfica (Tortoso i Hutchinson, 1990) donat que la seva activitat és de l'ordre de 10^2-10^3 vegades menor que la de la nitrificació autotròfica (Robertson i Kuenen, 1991). Tanmateix, donada aquesta enorme versatilitat ecològica i la gran quantitat de fonts de N que poden ser oxidades a través d'aquest procés, la baixa taxa pot ser compensada per una elevada biomassa. Segons Sorokin (1989), la seva contribució a la nitrificació total és del 64-90 % en sòls forestals àcids, on els fongs podrien ser una font important de N_2O (Robertson i Tiedje, 1987; Stroo *et al.*, 1986). Altres autors també mantenen que la nitrificació heterotròfica pot ser una font potencial de N_2O (Bender i Conrad, 1994; Papen *et al.*, 1989).

1.3.2.2 Producció de N_2O per nitrificació

Diversos estudis han indicat que el N_2O és un producte lateral de la primera etapa oxidativa del procés nitrificant, tot i que no estan del tot clares les vies de producció. Sembla que existeixen dues possibilitats:

a. *desnitrificació per microorganismes nitrificants*

Es caracteritza per ser un mecanisme similar al de la desnitrificació, produint-se el N_2O quan bacteris oxidadors de l'amoni utilitzen nitrit com a acceptor d'electrons degut a que l'oxigen és limitant (Bremner i Blackmer, 1978; Hynes i Knowles, 1984; Poth i Focht, 1985; Ritchie i Nicholas, 1972). Hynes i Knowles (1984) suggereixen que només en condicions de baixa disponibilitat d'O_2 o anaeròbies la producció de N_2O involucra una NO_2^--reductasa. Per contra, no es coneix cap bacteri responsable de l'oxidació del nitrit a nitrat capaç de produir N_2O. Segons alguns autors aquesta és la principal via de producció de N_2O pels nitrificants autotròfics (Poth i Focht, 1985; Ritchie i Nicholas, 1972; Tortoso i Hutchinson, 1990).

Sembla que la majoria de nitrificants heterotròfics són també desnitrificants aeròbics (Robertson i Kuenen, 1990a; 1990b; Robertson i Kuenen, 1991). En aquest sentit, s'ha vist que nitrificants heterotròfics tals com *Thiosphaera pantotropha* desnitrifiquen simultàniament el nitrit que ells mateixos produeixen. Aquesta combinació de nitrificació heterotròfica-desnitrificació aeròbica també s'ha observat en altres bacteris de gèneres diferents com poden ser *Pseudomonas denitrificans* i *Alcaligenes faecalis* (Robertson *et al.*, 1989a; Robertson i Kuenen, 1990a). Donat el petit nombre d'experiències en condicions controlades que s'han realitzat, és impossible generalitzar un patró de comportament. Tanmateix, el que sí s'accepta és que, malgrat les diferències observades entre ells, alguns -sinó tots- els nitrificants heterotròfics simultàniament redueixen almenys part del producte final de la seva nitrificació. Ja que normalment la nitrificació s'ha mesurat en funció del producte final, la significació ecològica d'aquests microorganismes segurament ha estat infravalorada (Robertson i Kuenen, 1990a; Van Niel *et al.*, 1992).

b. *quimiodesnitrificació*

Es coneix per quimiodesnitrificació el conjunt de reaccions químiques implicades en la pèrdua de formes gasoses de N i associades a la inestabilitat del NO_2^-. En aquesta segona via, la producció de N_2O té lloc en condicions aeròbiques (Hynes i Knowles, 1984) i resulta

de la combinació de l'oxidació de NH_4^+ a NO_2^- per bacteris nitrificants amb subseqüents reaccions abiològiques del HNO_2 -més que del NO_2^-- en el cas de què es doni una acumulació temporal de HNO_2 (Blackmer i Cerrato, 1986; Nelson, 1982). En la majoria de sòls, la conversió de NO_2^- a NO_3^- es dóna a una taxa molt més elevada que la conversió de NH_4^+ a NO_2^-, de manera que les quantitats de nitrit que es troben normalment en el sòl són molt baixes. La seva acumulació ha estat atribuïda en alguns casos a la inhibició de la seva oxidació a nitrat per el NH_3 o la presència de temperatures extremes, donada la major sensibilitat de *Nitrobacter* a aquestes condicions (Bouwman, 1990b). Tanmateix, el NO és la principal forma gasosa obtinguda a través d'aquestes reaccions (Stevenson, 1986).

La reacció de NH_2OH amb HNO_2 és un dels mecanismes suggerits per la formació de N_2O a través d'aquest procés (Bouwman, 1990b), així com la reacció del HNO_2 amb metalls de transició com ara el Cu i el Fe o amb matèria orgànica del sòl (Stevenson, 1986; Van Cleemput, 1984). També és possible la formació de N_2O a partir del radical nitroxil (HNO) el qual pot transformar-se espontàniament en aquell per dismutació química (Hynes i Knowles, 1984). La majoria d'aquestes reaccions han estat demostrades en sòls àcids sota condicions de laboratori. Sembla poc probable que les reaccions del NO_2^- expliquin pèrdues significatives en sòls neutres o bàsics, ja que és relativament poc reactiu a valors elevats de pH. En aquest sentit, s'ha observat que la taxa i grau de descomposició dels NO_2^- en els sòls estan inversament relacionats amb el pH del sòl (Nelson, 1982; Van Cleemput, 1984). Tanmateix, cal considerar també la possible participació d'aquests sòls ja que en mostres inalterades de sòl poden donar-se microzones amb condicions idònies perquè es donin els processos quimiodesnitrificants (acumulació de nitrits i baix pH).

1.3.3 Producció de N_2O per altres processos

a. *Reducció desassimilatòria del NO_3^- a NH_4^+ per bacteris no-desnitrificants*

S'ha vist que es poden formar petites quantitats de N_2O a través de la reducció anaeròbica de nitrat a amoni per bacteris no-desnitrificants. Es tracta, generalment, d'organismes fermentatius (Cole, 1990; Fazzolari i Germon, 1991; Smith i Zimmerman, 1981). Algunes espècies dels gèneres *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Campylobacer*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Serratia* i *Vibrio* són capaces de produir N_2O a través d'aquest procés (Anderson i Levine, 1986; Bleakley i Tiedje, 1982; Bonnefoy i Demoss, 1994; Fazzolari *et al.*, 1990a; 1990b; Smith, 1983; Smith i Zimmerman, 1981; Umarov, 1990).

En la majoria d'aquests microorganismes, la reducció de NO_3^- a NO_2^- està acoblada a cadena respiratòria (Smith i Zimmerman, 1981). Tanmateix, no està clar que la posterior reducció a NH_4^+ estigui relacionada amb creixement o producció d'ATP (Fazzolari *et al.*, 1990a; 1990b; Harris, 1982; Samuelsson *et al.*, 1988; Smith, 1983; Smith i Zimmerman, 1981). Més aviat sembla que el NO_2^- és exsudat o bé reduït a NH_4^+ a través de reaccions no lligades a producció d'energia. Segons Anderson i Levine (1986), la quimiodesnitrificació és el mecanisme principal de formació de N_2O ja que l'acumulació de NO_2^- és un pre-requisit necessari, tot i que com a mecanisme de detoxificació sembla més aviat ineficaç. Tanmateix, Smith i Zimmerman (1981) troben que la producció de N_2O a través d'aquest procés està afavorida per un elevat pH suggerint que no és deguda a la quimiodesnitrificació. Altres autors associen la producció de N_2O a través d'aquest procés amb la NO_3^--reductasa (Cole, 1990; Smith, 1983) ja que ambdós, reducció de NO_3^- i producció de N_2O, requereixen Mo.

Se sap que aquest procés no és inhibit per l'amoni (Bleakley i Tiedje, 1982; Buresh i Patrick, 1978; Fazzolari i Germon, 1991) i que requereix condicions similars a les de la desnitrificació; tanmateix, sembla que, mentre que els desnitrificants prefereixen sòls amb una elevada relació N:C, el nitrat és reduït a amoni principalment en microzones riques en C (Cole, 1990; Stanford *et al.*, 1975a).

Tot i que no es pot estimar el significat ecològic d'aquest procés degut al desconeixement de la seva fisiologia i bioquímica, el seu estudi pot ser de gran interès des del punt de vista agronòmic ja que, a diferència de la desnitrificació, la forma nitrogenada obtinguda com a producte final no suposa una pèrdua directa del nitrogen del sòl. Sembla, però, que aquest procés només representa entre el 2 i el 4 % del total de la reducció desassimilatòria del nitrat i que és força important en situacions d'anaerobiosi de llarga durada. D'altra banda, la reducció desassimilatòria de NO_3^- a NH_4^+ pot ser significativa en sòls amb condicions intensament reduïdes (Buresh i Patrick, 1978). Donat que el NO_3^- normalment no està en contacte amb zones molt reduïdes, *a priori* sembla difícil que es doni aquest procés.

b. Reducció assimilatòria del NO_3^- a NH_4^+

També s'ha observat la producció de N_2O durant la reducció assimilatòria de NO_3^- a NH_4^+ (Bleakley i Tiedje, 1982), procés present en aquells microorganismes que creixen amb nitrat com a font de N. Aquest procés, en el que NO_2^- i NH_2OH són productes intermediaris, es dóna en alguns fongs i llevats com ara espècies dels gèneres *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Hansenula* i *Rhodotorula* així com en alguns bacteris com ara *Azotobacter*

vinelandii (Bleakley i Tiedje, 1982) i *Paracoccus denitrificans* (Ferguson, 1994). Alguns microorganismes presenten simultàniament dos tipus de NO_3-reductases, l'assimilatòria i la desassimilatòria, essent completament independents quant a funció i regulació (Bonnefoy i Demoss, 1994). La NO_3- reductasa assimilatòria és insensible a la presència o absència d'O_2 però és inhibida pel NH_3 (Payne, 1973).

1.4 Factors que influeixen en les emissions de N_2O a través de la nitrificació i la desnitrificació

L'emissió del sòl a l'atmosfera de N_2O produït durant els processos de nitrificació i desnitrificació es caracteritza pels diferents nivells de regulació que presenta ja que depèn de la taxa dels processos, de la proporció de N canalitzada per cada procés cap a la producció de N_2O i del seu consum dins el mateix sòl, el qual està relacionat amb les dificultats en el transport cap a l'atmosfera (Figura 1.5).

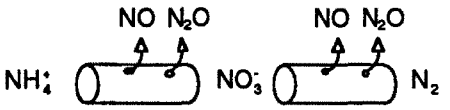

Figura 1.5 - Model conceptual dels dos nivells de regulació de la producció de N-gas traça via nitrificació i desnitrificació, anomenat "hole-in-the-pipe" (Firestone i Davidson, 1989).

1.4.1 Factors reguladors de la taxa dels processos

Els processos de nitrificació i desnitrificació estan primerament afectats per aquells paràmetres que exerceixen el seu control a nivell cel.lular i que reben el nom de factors proximals. Tanmateix, cadascun d'aquests està afectat per un nombre considerable de factors químics, físics i biològics, anomenats factors distals, els quals poden interaccionar. A mesura que l'escala d'investigació incrementa, aquests darrers factors esdevenen cada vegada més importants controlant la dinàmica dels factors proximals i, per tant, regulant les taxes d'aquests processos, de manera que poden arribar a tenir un paper regulador principal (Groffman *et al.*, 1988).

1.4.1.1 Factors proximals

a. que afecten a la desnitrificació

El principal factor regulador de la desnitrificació a nivell cel.lular és la disponibilitat d'oxigen (Kroeckel i Stolp, 1985; Smith *et al.*, 1978) donat que és un procés fonamentalment anaerobi: l'absència o disponibilitat reduïda d'O_2 és necessària tant per a la síntesi com per a l'activitat dels diferents enzims desnitrificants (Firestone, 1982). Tanmateix, la síntesi dels diferents enzims implicats no està uniformement regulada per l'O_2, essent el N_2O-reductasa i, sobretot, la NO_2-reductasa les més sensibles a la seva presència (Ferguson, 1994; Knowles, 1981; Körner i Zumft, 1989; Wu *et al.*, 1994). D'altra banda, sembla que l'O_2 no té un efecte directe sobre els propis enzims; s'ha suggerit que el lloc de control de l'O_2 podria ser a nivell de transport de nitrat des del medi extern cap al centre actiu de la nitrat reductasa lligada a membrana, la qual està ubicada sobre la cara citoplasmàtica (Ferguson, 1994; Wu *et al.*, 1994). Altres autors postulen que la influència de l'O_2 es dóna a nivell de quinona de manera que en condicions de baixa disponibilitat d'O_2 podria desviar el transport electrònic des del citocrom tipus *b* cap a diferents òxids de N (NO_3^-, NO_2^-) els quals actuarien com a acceptors terminals d'e^- (Wu *et al.*, 1994).

La presència d'òxids de N com a substrat dels enzims desnitrificants és també un important factor controlador a nivell cel.lular (Davidson i Swank, 1986). Tanmateix, els bacteris desnitrificants són coneguts per presentar un sistema enzimàtic amb una elevada afinitat per a la utilització del nitrat la qual cosa els permet utilitzar el nitrat fins i tot quan aquest hi és present en concentracions molt baixes (Murray *et al.*, 1989; Parsons *et al.*, 1991). Tot i que s'ha observat que en *Pseudomonas stutzeri* l'expressió de les quatre reductases depèn de la presència de nitrat, nitrit i N_2O en el medi de cultiu (Körner i Zumft, 1989), diversos estudis realitzats amb altres microorganismes no confirmen aquests resultats.

D'altra banda, i donat que els organismes desnitrificants són fonamentalment heterotròfics, la disponibilitat de C orgànic com a font de C i de poder reductor és un altre factor controlador de la desnitrificació a aquest nivell (Firestone, 1982; Flessa i Beese, 1995; Jacobson i Alexander, 1980; Myrold i Tiedje, 1985; Parsons *et al.*, 1991; Robertson i Tiedje, 1984; Rolston *et al.*, 1984).

b. que afecten a la nitrificació

En el cas de la nitrificació, la disponibilitat de NH_4^+ és el factor més important que regula les taxes de nitrificació a nivell cel.lular, ja que l'única font d'energia per als organismes

nitrificants és l'oxidació del NH_4^+ o del NO_2^-. Tot i això, les espècies nitrificants, especialment *Nitrobacter*, són sensibles a concentracions elevades d'ió amoni. Sembla que en aquesta inhibició hi estan involucrats tant efectes específics de l'ió com els efectes sobre la pressió osmòtica deguts a una elevada concentració de soluts (Darrah *et al.*, 1987). D'altra banda, la presència d'oxigen és també un requisit obligatori donat que es requereix per a l'oxidació de l'amoni. Alguns autors han suggerit que l'activitat nitrificant també està afectada per inhibidors al.lelopàtics de tipus fenòlic produïts per una vegetació clímax. Tanmateix, no hi ha evidències clares (Bremner i McCarty, 1993).

1.4.1.2 Factors distals

a. Reguladors de la disponibilitat d'oxigen

El nivell d'O_2 present en un moment donat en el sòl depèn de les taxes de subministrament i de demanda, les quals estan afectades fonamentalment per les característiques texturals i estructurals del sòl, pel seu contingut d'aigua, i per l'activitat biològica que suporta. Al mateix temps, cadascun d'aquests pot estar regulat per altres paràmetres:

Textura i drenatge

L'entrada d'oxigen en el sòl i la seva difusió a través de la matriu edàfica depenen molt del manteniment d'un sistema continu de porus (Smith, 1990). En aquest sentit, textura i estructura són factors claus que controlen l'estat d'aeració del sòl (Arah *et al.*, 1991; Groffman i Tiedje, 1989b; Sexstone *et al.*, 1985). A més, les característiques de la fase sòlida del sòl afecten el moviment dels gasos a través del perfil edàfic; la seva taxa de difusió serà més lenta a mesura que augmenti el contingut d'argila i, per tant, la proporció de porus més fins i la seva tortuositat (Horn, 1990). De la mateixa manera, el coeficient de difusió és menor dins que entre agregats.

Contingut d'aigua del sòl

El principal mecanisme a través del qual l'oxigen entra en el sòl és la difusió. En aquest sentit, el contingut d'aigua és un paràmetre molt important que regula el moviment de l'oxigen a través de la matriu del sòl ja que la seva velocitat de difusió és de l'ordre de 10^4 vegades menor a través de l'aigua que de l'aire (Firestone, 1982; Hutchison *et al.*, 1993).

En la majoria de sòls en els què l'espai porós ple d'aigua es troba per sota del 60-75 % de la porositat total la taxa de desnitrificació és negligible (Aulakh *et al.*, 1991; Davidson *et al.*, 1986; Flessa i Beese, 1995; Linn i Doran, 1984; Parsons *et al.*, 1991; Sextone *et al.*, 1985). Tanmateix, cal tenir present que la resposta de la desnitrificació en variar el contingut d'aigua del sòl depèn molt de la direcció del canvi en l'estat hídric del sòl (Groffman i Tiedje, 1988).

En el cas de la nitrificació, la influència del contingut d'aigua del sòl es manifesta a través de la seva relació amb el potencial redox (E_h) ja que la conversió d'amoni a nitrat no es dóna a valors d'E_h per sota de 200 mV (Harris, 1982). Tot i això, Killham (1990) troba que, en el sòl, els nitrificants autotròfics tenen una capacitat relativament limitada per ajustar-se a condicions de baix potencial hídric essent uns dels microorganismes més sensibles a l'estrés hídric. En tot cas, sembla que continguts d'aigua relativament elevats estimulen la nitrificació sempre i quan l'aeració sigui adequada. S'ha observat que la màxima activitat nitrificant es dóna al voltant del 60-80 % de la capacitat de retenció d'aigua.

El contingut d'aigua del sòl depèn de la seva aportació a través de la precipitació -i/o reg en sòls de conreu- i de les seves pèrdues ja sigui per evapotranspiració o bé a través del drenatge. Per tant, els factors que controlen el moviment de l'aigua a través del sòl juguen un paper important en la regulació de les taxes dels principals processos implicats en les emissions de N_2O. En aquest sentit, la textura del sòl és un factor important ja que la grandària de les partícules del sòl afecta l'adhesió de les molècules d'aigua a aquestes partícules i, per tant, el flux d'aigua a través de la matriu del sòl. L'existència d'agregats estructurals i porus de diferents mesures i formes, complica enormement les interrelacions en el sòl entre aigua/aire. En sòls estructurats, els porus inter-agregats esdevenen més importants des del punt de vista de mobilitat d'aigua que els porus intra-agregats, on el transport d'aigua és quasi negligible (Horn, 1990). De fet, el temps requerit per a la implantació de les condicions anaeròbiques pot estar afectat per la taxa d'infiltració a través del perfil edàfic; una taxa d'infiltració més lenta pot requerir un temps més llarg per establir les condicions d'anaerobiosi, però l'increment en la retenció d'aigua en l'espai porós intra-agregats pot explicar la durada més llarga de taxes de desnitrificació elevades (Sexstone *et al.*, 1985).

La vegetació també afecta el contingut d'aigua del sòl a través de l'evapotranspiració. La transpiració crea una zona més seca al voltant de les arrels cosa que comporta un increment de la taxa de difusió de l'O_2. Tanmateix, el paper del sistema radicular és complicat ja que també suposa una aportació de C fàcilment descomponible degut als

exudats radiculars i a les exfoliacions de les arrels de manera que s'afavoreix l'activitat microbiana i, per tant, s'estimula la desnitrificació (Klemedtsson *et al.*, 1987).

Activitat biològica

La respiració dels microorganismes aerobics i de les arrels de les plantes són els principals processos consumidors d'oxigen en el sòl (Bailey, 1976). Normalment, un increment en la taxa desnitrificant va precedit d'un augment en la respiració (Christensen *et al.*, 1990b; Davidson, 1992b; Kroeckel i Stolp, 1985; Parsons *et al.*, 1991). En aquest cas, les taxes d'emissió de N-gas poden arribar a ser 1000 vegades més elevades que les taxes que precedeixen i segueixen el pic d'emissió (Hutchinson *et al.*, 1993). La creació d'aquestes microzones anòxiques com a conseqüència d'una descomposició ràpida del material vegetal va acompanyada d'una disminució d'E_h (Flessa i Beese, 1995); es considera que el valor d'E_h crític per a la producció de N_2O es troba entre 200 i 250 mV (Letey *et al.*, 1981). De fet, la desnitrificació en sòls ben drenats també es pot explicar per l'existència de microzones anaeròbiques dins dels agregats del sòl, els quals poden ser promoguts per la presència d'acumulacions puntuals de matèria orgànica (Flessa i Beese, 1995; Sexstone *et al.*, 1985).

El contingut d'aigua del sòl també afecta la respiració ja que controla l'activitat dels microorganismes descomponedors i de les arrels de les plantes. En aquest sentit, el potencial matricial del sòl, entès com l'energia amb la qual les molècules d'aigua són retingudes per les partícules del sòl, és un dels principals factors que governa ambdós, la supervivència i activitat dels microorganismes, i la competència entre ells. Per a la majoria de sòls, la taxa màxima de respiració, nitrificació i mineralització es dóna al voltant del 60 % de la capacitat de retenció d'aigua, el qual correspon als continguts més elevats d'aigua en els quals no es donen problemes d'aeració (Robert i Chenu, 1992).

b. Reguladors de la disponibilitat de matèria orgànica

La desnitrificació pot estar controlada per la taxa a la qual la matèria orgànica és mineralitzada, fent-la realment disponible als desnitrificants (Reddy *et al.*, 1982). Aulakh *et al.* (1991) observen una relació inversa entre la relació C/N i la taxa desnitrificant. La influència de la qualitat de la matèria orgànica sobre la seva taxa de descomposició està ben documentada (Christensen, 1986; Reinertsen *et al.*, 1984).

D'altra banda, la textura és un fort controlador de la taxa de mineralització de la matèria orgànica del sòl; diferents estudis suggereixen que les diferents fraccions granulomètriques del sòl tenen un paper diferent en l'estabilització de la matèria orgànica i la seva renovació (Amato i Ladd, 1992; Christensen i Sørensen, 1985; Ladd *et al.*, 1992). Christensen (1987) observa una taxa de descomposició més elevada associada amb partícules de grandària més gran. Canvis en el contingut d'aigua del sòl i altres alteracions físiques també poden incrementar la disponibilitat de C. Tanmateix, sota condicions anaeròbiques la desnitrificació pot estar limitada per la quantitat de C susceptible a la mineralització (Bijay-Singh *et al.*, 1988).

c. Reguladors de la disponibilitat de NH_4^+ i NO_3^-

La disponibilitat de substrat per a cadascun dels dos processos (NH_4^+ i NO_3^-) depèn de les taxes relatives de mineralització del N i d'assimilació per part de les plantes i els microorganismes, i de les característiques de difusió afectades pel contingut d'aigua del sòl el qual també controla les pèrdues de NO_3^- per lixiviació. En sòls secs es considera que la dificultat de difusió dels substrats és un controlador principal de l'activitat microbiana en general i d'aquests processos en particular.

En sòls naturals, on la competència pel N mineral entre plantes i microorganismes pot controlar fortament la disponibilitat de NO_3^-, el control distal de la desnitrificació sovint es centra en la nitrificació de manera que el subministrament d'amoni esdevé, indirectament, un factor de regulació important; en sòls naturals la nitrificació potencial pot ser un dels predictors més forts (Robertson i Tiedje, 1984; Robertson *et al.*, 1987).

La capacitat d'intercanvi catiònic del sòl juga un paper important controlant les pèrdues del NH_4^+. S'ha observat que sòls amb una elevada capacitat esmorteïdora poden presentar taxes molt altes de nitrificació i que sòls rics en argiles i matèria orgànica presenten menys problemes d'acumulació de NO_2^- en cas de concentracions elevades de NH_4^+ donada la seva major capacitat d'intercanvi catiònic (Harris, 1982).

1.4.1.3 Reguladors distals últims

La climatologia (a través de la temperatura i la precipitació), les característiques del material originari del sòl, i el tipus de comunitat vegetal són els factors reguladors distals últims dels processos nitrificant i desnitrificant en el sòl:

Climatologia

El clima té una acció directa sobre la humitat i la temperatura dels sòls. Aspectes tals com meteorització, classe textural, estat d'aeració, contingut de matèria orgànica i lixiviació estan fortament influenciats per les característiques climatològiques. Així, la fracció argila augmenta amb la temperatura i la humitat, en incrementar el grau de meteorització. A més, el clima és el factor més important determinant el tipus de vegetació, la quantitat de matèria vegetal produïda i la intensitat de l'activitat microbiana. En aquest sentit, la temperatura afecta la taxa d'emissió de N_2O pels seus efectes sobre l'activitat microbiana, la qual incrementa exponencialment amb la temperatura segons l'equació d'Arrhenius, afectant l'estat d'aeració del sòl: elevades temperatures incrementen la demanda d'O_2 per part d'organismes heterotròfics i, per tant, afavoreixen la creació de zones anaeròbies.

Pel que fa als efectes de la temperatura sobre els processos responsables de les emissions de N_2O pròpiament dits, s'han determinat diferents valors de temperatura mínima per a la desnitrificació: 2 °C (Parsons *et al.*, 1991), 5 °C (Smid i Beauchamp, 1976), >5 °C (Bailey, 1976). Tanmateix, sembla que el llindar de temperatura per a la desnitrificació disminueix a en augmentar l'aportació de C orgànic (Dorland i Beauchamp, 1991). La temperatura màxima es dóna entre 60-65 °C (Bouwman, 1990b). En general, sembla que pot haver-hi una adaptació dels microorganismes desnitrificants a les condicions climàtiques locals (Batjes, 1992; Dorland i Beauchamp, 1991; Malhi *et al.*, 1990). Hi ha qui suggereix que diferents poblacions desnitrificants esdevenen actives en funció de la temperatura (Kaplan *et al.*, 1977; King i Nedwell, 1984). Per a la desnitrificació, la seva taxa pràcticament es duplica a l'incrementar 10 °C la temperatura dins del rang entre 11 - 35 °C (Jacobson i Alexander, 1980; Standford *et al.*, 1975b). Per contra, no es donen diferències en la taxa de desnitrificació entre 35 i 45 °C, i disminueix abruptament entre 5-10 °C. D'altra banda, sembla que l'absorció de NO_3^- per part de les plantes és funció de la temperatura (Bailey, 1976).

Quant a la nitrificació, és un procés lent per sota dels 5 °C -malgrat que també es dóna a 0 °C - i per sobre de 40 °C, amb una temperatura òptima al voltants dels 30-35 °C , tot i que aquest valor varia molt entre sòls (Batjes, 1992). A més, s'ha observat que hi ha un efecte diferencial de la temperatura sobre els nitrificants, essent *Nitrobacter* sp. molt més sensible a baixes temperatures que *Nitrosomonas* sp. Sembla, però, que hi ha una adaptació per part dels microorganismes nitrificants als règims de temperatura del seu hàbitat (Bouwman, 1990b).

Tanmateix, una temperatura adequada per a què es donin els processos microbians responsables de les emissions de N_2O no és una condició suficient per estimular-les però si que és necessària per permetre que la població microbiana respongui a altres canvis tals com

l'increment de N mineral en el sòl o del seu contingut d'aigua, o ambdós a l'hora (Batjes, 1992). D'aquí que alguns autors no trobin una correlació positiva entre temperatura i taxa de desnitrificació (Myrold, 1988; Parsons *et al.*, 1991). A més, sembla que, a baixes temperatures, l'efecte inhibitori de l'O_2 sobre la desnitrificació és més fort (Firestone, 1982). A part dels efectes directes sobre els processos microbians en general i sobre nitrificació i desnitrificació en particular, la temperatura també regula la taxa d'emissió de N_2O a través dels seus efectes sobre la solubilitat i difusió dels gasos; elevades temperatures disminueixen la solubilitat de l'O_2.

Òbviament, la precipitació afecta la nitrificació i la desnitrificació a través de la seva influència sobre el contingut d'aigua del sòl. A més, té un efecte sobre el contingut de matèria orgànica degut a que promou el creixement vegetal i la producció de matèria per a la síntesis d'humus; generalment, el contingut de matèria orgànica del sòl està directament relacionat amb la quantitat de residus vegetals aportats anualment al sòl. A més, un increment del contingut d'aigua del sòl també pot estimular la desnitrificació estimulant la utilització d'O_2 per part dels organismes aerobis.

Material originari

La influència del material originari sobre les taxes de nitrificació i desnitrificació es dóna fonamentalment a través dels seus efectes sobre les característiques texturals del sòl i del pH. S'ha observat que hi ha una relació directa entre desnitrificació i pH. La majoria de microorganismes desnitrificants creixen millor a prop de la neutralitat (pH aprox. 6-8); a pH <5 és lenta i a pH <4 és pràcticament inexistent.

Pel què fa a la nitrificació, no hi ha una relació massa clara amb el pH. Tanmateix, s'ha observat que el potencial per a la nitrificació disminueix a mesura que el pH del sòl és més àcid. Sembla que el límit inferior per a què es doni el procés nitrificant és el de pH 4.0 (Schmidt, 1982). L'efecte de l'acidesa sobre la nitrificació pot ser una expressió de la toxicitat d'Al. Tanmateix, sembla que el NH_3 més que el NH_4^+ és el substrat de l'enzim amoni-oxigenasa (Schmidt, 1982). Per tant, la capacitat dels nitrificants autotròfics en aquests sòls pot estar limitada pel substrat. Tot i això, la nitrificació també es dóna en sòls àcids. Es creu que en aquests sòls, la nitrificació depèn de microzones de pH elevat. Cada vegada hi ha més evidències de l'existència de bacteris quimiolitòtrofs capaços d'oxidar amoni i nitrit acidofílics (De Boer *et al.*, 1989; Hankinson i Schmidt, 1988). Sembla que aquests bacteris només són capaços de nitrificar si formen agregats, particularment els bacteris oxidadors de l'amoni, protegint-se d'aquesta manera de la toxicitat de l'àcid nitrós (De Boer *et al.*, 1991).

A partir d'assajos amb inhibidors de la nitrificació autotròfica o amb l'aplicació de fungicides i bactericides, sembla que en sòls àcids els microorganismes heterotròfics poden contribuir a la producció de NO_3^- tot i que prefereixen medis neutres o lleugeramet àcids (Schimel *et al.*, 1984; Stroo *et al.*, 1986).

Comunitat vegetal

El tipus de vegetació que suporta un sòl determinat ve condicionat pel clima i el material originari. Alhora, però, el tipus de vegetació condiciona el procés edafogenètic fonamentalment a través de la seva influència sobre la quantitat i el patró de distribució de la matèria orgànica en el perfil edàfic ja que la matèria orgànica dels sòls prové fonamentalment de les restes vegetals. El contingut de matèria orgànica en els sòls de prat és substancialment més elevat que en els sòls forestals amb un descens més gradual del contingut en profunditat (Stevenson, 1982; Volk i Loeppert, 1982). Això és important degut a que la matèria orgànica té una elevada capacitat de retenció d'aigua i juga un paper molt important en l'estructuració del sòl.

En general, s'ha observat que durant el creixement actiu de les plantes disminueix la taxa de desnitrificació, fins i tot si el contingut de nitrats es manté suficientment elevat (Haider *et al.*, 1985; 1987). D'altra banda, tot i que no està del tot ben quantificat, sembla que en els primers i els darrers estadis successionals d'ecosistemes forestals la taxa de desnitrificació és més elevada que en estadis intermitjos. Segons Virzo de Santo (comunicació escrita), la competició pel nitrat podria ser un factor principal mantenint una baixa desnitrificació en aquests estadis. De fet, l'estadi successional està relacionat amb la disponibilitat de nutrients. Diferents autors han observat que també afecta el procés nitrificant. En els estadis més pioners, el contingut de N-amoniacal és baix augmentant progressivament en estadis evolutius posteriors; per contra, el N-nítric és molt alt al principi i disminueix a mesura que s'acosta a la vegetació clímax (Arcara i Sparvoli, 1982).

El paper indirecte de la vegetació deriva de la seva acció pantalla enfront la radiació solar i l'aigua de la pluja, cosa que afecta el règim d'humitat del sòl i les fluctuacions diürnes i estacionals de la temperatura. El seu efecte depèn del gruix i l'alçada de la cobertura vegetal.

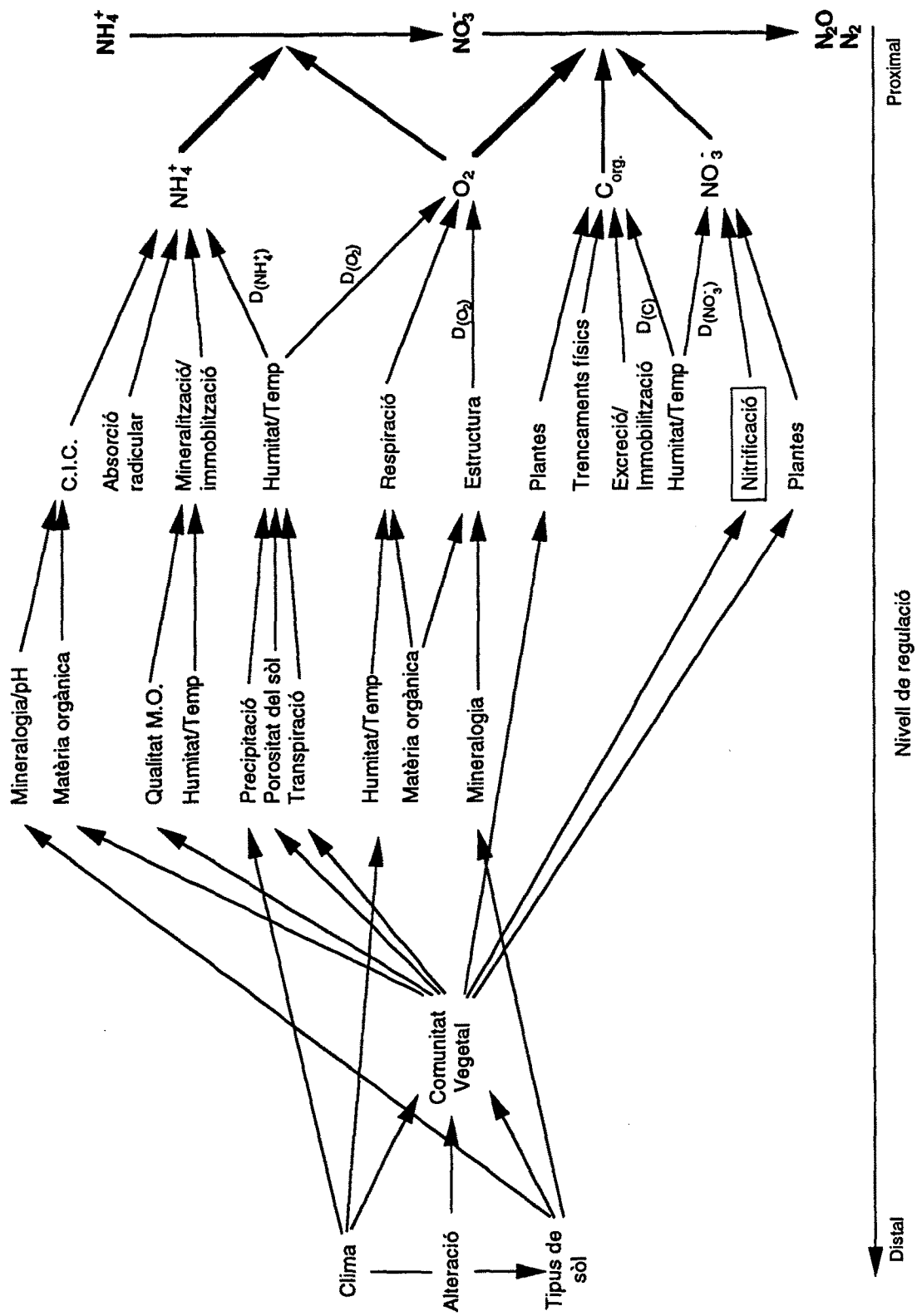

Figura 1.6 - Diagrama esquemàtic dels principals factors reguladors de la nitrificació i la desnitrificació en el sòl (Font: Firestone i Davidson, 1989)

1.4.2 Factors que regulen la proporció de N_2O produït

Tant en la desnitrificació com en la nitrificació, la producció de N_2O es dóna en presència de baixes concentracions d'O_2. En el cas dels microorganismes nitrificants, la relació N_2O:NO_3^- produïts augmenta a mesura que disminueix la pressió parcial d'O_2 (Anderson i Levine, 1986; Goodroad i Keeney, 1984; Hynes i Knowles, 1984; Lipschultz *et al.*, 1981). La producció de N_2O via nitrificació es dóna dins el rang del 30 al 70 % de l'espai porós ple d'aigua, amb la màxima producció de N_2O donant-se al voltant del 50 % (Davidson, 1991). Per contra, la proporció de N_2O en relació a N_2 produïts durant la desnitrificació s'incrementa a mesura que augmenta la concentració d'O_2 en el sòl (Firestone *et al.*, 1980; Firestone i Tiedje, 1979; Vinther, 1984; Weier *et al.*, 1993); en sòls fortament anaeròbics, el N_2O és utilitzat com a acceptor terminal d'electrons per part dels microorganismes desnitrificants (Rosswall *et al.*, 1989). Tanmateix, dins d'un rang determinat, el N_2O total produït i la producció de N_2O via desnitrificació augmenten a l'incrementar el contingut d'aigua del sòl (Mummey *et al.*, 1994), no només per afectar directament la taxa de producció de N_2O pels microorganismes del sòl, sinó també a través dels seus efectes indirectes sobre la difusió de l'oxigen, C orgànic, i nitrat i amoni.

Un increment en la concentració de nitrat comporta un augment en la relació N_2O:N_2 per desnitrificació ja que elevades concentracions de nitrats també inhibeixen la reducció del N_2O a N_2 (Blackmer i Bremner, 1978; Firestone *et al.*, 1979; Luo *et al.*, 1996; Vinther, 1984; Weier *et al.*, 1993). Tanmateix, l'efecte del nitrat és molt petit en comparació al del nitrit: baixes concentracions de nitrit -0.5 ppm o inferiors- ja tenen una forta influència sobre l'acumulació de N_2O (Firestone *et al.*, 1979). De fet, les reaccions del procés desnitrificant s'han definit com a cinètiques enzimàtiques tipus Michaelis-Menten on els productes dels diferents passos es comporten com a inhibidors competitius de manera que la taxa de reducció de cada òxid de N disminueix en presència d'un altre compost nitrogenat oxidat (Arah i Smith, 1990; Betlach i Tiedje, 1981; Cho i Mills, 1979; Van Cleemput *et al.*, 1988). A més, la concentració de substrat i l'afinitat pel substrat relatives de cadascun dels òxids de N juguen un paper important en la proporció de productes finals (Betlach i Tiedje, 1981; Cho i Mills, 1979). En aquest sentit, la baixa afinitat pel N_2O comparada amb l'elevada afinitat pel NO_2^- és un factor clau determinant la relació N_2O:N_2 (Dendooven *et al.*, 1994b).

La relació N_2O:N_2 via desnitrificació augmenta quan la disponibilitat d'òxids de N supera amplament la disponibilitat de C orgànic. Firestone (1982) observa que una disminució de la matèria orgànica oxidable tendeix a augmentar la fracció molar de N_2O. L'efecte de la matèria

orgànica és important sobretot quan el contingut d'aigua del sòl és elevat (Weier *et al.*, 1993). D'altra banda, la matèria orgànica dèbilment humificada redueix fortament l'alliberació de N_2O ja que promou la seva reducció a N_2.

La fracció de N_2O emès respecte a les emissions totals s'incrementa a mesura que disminueix el pH, tot i que la taxa de desnitrificació disminueix (Blackmer i Bremner, 1978; Christensen *et al.*, 1990a). Freqüentment, el N_2O constitueix més del 50 % dels gasos nitrogenats emesos en sòls àcids (Bouwman, 1990b). L'efecte dels nitrats sobre la producció de N_2O per desnitrificació està fortament relacionat amb el pH del sòl. En absència de quantitats mesurables de NO_3^-, el pH té poca influència sobre la relació N_2O:N_2 però s'ha observat que en presència de 10 ppm de N-NO_3^- es produeix una quantitat molt més elevada de N_2O a pH 4.9 que a pH 6.5 (Firestone *et al.*, 1980). La relació N_2O:NO_3^- en la nitrificació també augmenta en disminuir el pH (Conrad, 1990). En general, però, s'ha de considerar que una acidificació de la solució del sòl , també retarda les taxes de nitrificació i desnitrificació de manera que és difícil predir l'efecte net sobre la producció de N_2O (Firestone i Davidson, 1989).

La fracció molar de N_2O produït per desnitrificació està inversament correlacionada amb la temperatura (Bailey, 1976; Yoshinari, 1990). En el rang de temperatures comprès entre 10-30 °C, la quantitat de N_2O produït s'incrementa lleugerament en disminuir la temperatura (Bailey, 1976). Segons Bailey i Beauchamp (1973), a 15 °C es dóna una inhibició parcial de la N_2O-reductasa; aquesta inhibició no afecta la reducció de NO_3^- a NO_2^-, la qual cosa resulta en una acumulació de N_2O. Malgrat que la taxa desnitrificant és inferior a 15 °C que a 25 °C, la quantitat de N_2O emesa és equivalent (Bouwman, 1990b). Tanmateix, la quantitat de N_2O produït es redueix fortament al disminuir la temperatura de 10 °C a 6-8 °C. L'efecte de la temperatura sobre la taxa de producció de N_2O per nitrificació és desconegut.

Finalment, també s'ha de considerar que cada microorganisme presenta un màxim d'emissió de N_2O a un pressió concreta d'O_2, típica de cadascun d'ells (Abou Seada i Ottow, 1984) i que no tots els microorganismes desnitrificants presenten el complex enzimàtic sencer: un dels enzims que més manca és el N_2O-reductasa com és el cas de *Corynebacterium nephridii*, *Pseudomonas aurefaciens*, *Pseudomonas clororaphis* (Firestone, 1982).

1.4.3 Factors que controlen l'emissió de N_2O

No tot el N_2O format és alliberat a l'atmosfera sinó que pot seguir diferents destins: difondre a través dels porus del sòl, ser atrapat en els agregats del sòl, trobar-se dissolt en la solució del

sòl, adsorbit sobre les argiles o les substàncies orgàniques o desaparèixer per reducció microbiana a N_2 (Benckiser, 1994).

En general, el consum del N_2O dins del sòl s'incrementa a mesura que augmenten els impediments per difondre a través de l'espai porós. En aquest sentit, contingut d'aigua, textura i estructura del sòl juguen un paper important regulant les taxes d'emissió de N_2O (Arah i Smith, 1990; Arah *et al.*, 1991). Drury *et al.* (1992) troben que la taxa d'emissió de N_2O en un sòl franc-sorrenc i un sòl franc-argilós augmenta amb el contingut d'aigua del sòl fins que aquest assoleix un valor del 20 % sense diferir en el patró d'emissió; per a continguts superiors, el sòl franc-arenós presenta una disminució de la taxa mentre que en el sòl franc-argilós continua augmentant almenys fins a un contingut d'aigua >35 %. Aquest diferent comportament pot ser degut a la diferent àrea superficial de les partícules de cadascun dels sòls; sembla raonable que es requereixi una major quantitat d'aigua per limitar la difusió del N_2O en sòls de textura fina.

Donat que el N_2O és bastant soluble en aigua (1.0 mL de gas per mL d'aigua a 5 °C), les aigües subterrànies també han estat identificades com un reservori considerable dins el balanç global de N_2O (Ronen *et al.*, 1988). Alguns autors troben que les pèrdues de N_2O amb les aigües de drenatge durant l'hivern són comparables a les emissions durant el mateix període (Colbourn i Dowdell, 1984). La quantitat de N_2O dissolt en l'aigua del sòl també està afectada pel pH; generalment s'accepta que la solubilitat del N_2O és més elevada en sòls àcids que en sòls alcalins. Minami i Ohsawa (1990) observen un augment de la quantitat de N_2O dissolt en més de 120 $ng.mL^{-1}$ quan el pH del sòl disminueix de 7 a 6. La variabilitat en l'emissió de N_2O pot ser deguda en part a una variació en la quantitat de N_2O dissolta en la solució del sòl degut a canvis locals de pH causats per l'activitat microbiana. Tanmateix, hi ha qui considera que la pèrdua de N_2O dissolt en la solució del sòl és insignificant dins el còmput atmosfèric global (Batjes, 1992). Finalment, la temperatura, pels seus efectes sobre la difusió i solubilitat dels gasos, també pot modificar la proporció de N_2O alliberat respecte al produït.

1.5 Importància relativa de la nitrificació i la desnitrificació en les emissions de N_2O

Malgrat ser coneguts els principals processos biològics implicats en les emissions de N_2O, no hi ha massa acord sobre la contribució relativa d'ambdues vies, oxidativa i reductiva. Sovint s'associen taxes elevades d'emissió de N_2O amb la desnitrificació (Davidson, 1992b; Smith i Patrick, 1983), procés en el que el N_2O és un producte intermediari; tanmateix, sembla que la

la nitrificació, en la que el N_2O és un producte lateral, podria ser la font dominant d'emissions de N_2O sobre una base anual sobretot si es considera que, a diferència de la desnitrificació, és un procés més constant en molts ecosistemes i en el que les emissions de N_2O són més prolongades (Byrnes *et al.*, 1990; Firestone i Davidson, 1989; Martikainen, 1985a). A més, el N_2O produït durant la nitrificació té una probabilitat més gran d'ésser emès a l'atmosfera que el generat pel procés desnitrificant.

A un contingut d'aigua del sòl equivalent aproximadament al 65 % de la capacitat de retenció d'aigua, nitrificació i desnitrificació contribueixen a les emissions de N_2O; la desnitrificació és el principal procés generador de N_2O quan el contingut d'aigua del sòl es troba per sobre de capacitat de camp d'aigua (Davidson, 1992b; Mummey *et al.*, 1994; Skiba *et al.*, 1993; Skiba *et al.*, 1994), tot i que quan l'espai porós ple d'aigua excedeix el 80 %, el N_2 esdevé el principal producte final (Davidson, 1991).

Globalment, sembla que el flux de N_2O des del sòl a l'atmosfera tant per nitrificació com per desnitrificació és important sota determinades condicions: continguts d'aigua en el sòl mitjos-elevats de manera que es dificulti el subministrament d'O_2; disponibilitat elevada de N-mineral, durant els períodes en què el consum per part de la planta és absent o reduït o durant un pic de mineralització immediatament després de la humectació del sòl; o bé, en condicions d'un augment esporàdic del contingut de matèria orgànica (Rosswall *et al.*, 1989).

1.6 Estudi de les emissions de N-gas: Tècnica de la inhibició amb acetilè

Si bé les taxa d'emissió de N_2O és relativament senzilla de determinar des d'un punt de vista analític, durant molt de temps la metodologia ha estat una limitació en l'estudi de la desnitrificació donat que la mesura del seu producte final (N_2) no es pot emprar com a mètode d'assaig per l'elevada concentració atmosfèrica d'aquest compost. Els primers científics que es varen dedicar al seu estudi utilitzaven el mètode de marcatge isotòpic. Aquest, però, és un mètode relativament car que requereix una infrastructura no disponible per a la majoria dels investigadors. En aquest sentit, es fa una contribució molt important quan, en un estudi sobre detecció de vida extra-terrestre, es mostra que l'acetilè (C_2H_2) inhibeix la reducció del N_2O a N_2. Posteriorment, Yoshinari i Knowles (1976), treballant amb *Pseudomonas perfectomarinus*, *P. aeruginosa* i *Micrococcus denitrificans*, tres espècies bacterianes desnitrificants, confirmen que el C_2H_2 a una concentració de 10 kPa inhibeix aquest pas sense afectar significativament

altres estadis del procés i que converteixen ambdós, nitrat i nitrit, a N_2O amb una estequiometria tal que suggeria que el N_2O era un intermediari obligatori en la reducció del nitrat a N_2. Independentment, Balderston *et al.* (1976) també mostren la inhibició de la N_2O-reductasa per l'acetilè treballant amb cultius purs de *Pseudomonas perfectomarinus*. Segons aquests autors, el bloqueig és total quan els microorganismes creixen en presència de 1 kPa de C_2H_2, a més d'immediat i reversible.

Aquesta tècnica acoblada a un sistema de cromatografia de gasos amb detector de captura d'electrons ha suposat un pas molt important en els estudis de desnitrificació degut a la gran sensibilitat del mètode. A més, a diferència dels mètodes amb marcatge isotòpic, utilitza el reservori natural de nitrat del sòl.

1.6.1 Utilització de la tècnica d'inhibició amb acetilè per a l'estudi de la font principal d'emissió de N_2O

La tècnica d'inhibició amb acetilè no només permet quantificar les pèrdues de N a través del procés desnitrificant sinó que també ofereix altres avantatges ja que s'ha observat que l'acetilè inhibeix la nitrificació a concentracions molt més baixes que la requerida per inhibir l'activitat de la N_2O-reductasa i sense afectar la mineralització del N-orgànic del sòl (Berg *et al.*, 1982; Mosier, 1980; Ryden, 1982). Segons Hynes i Knowles (1978), en cultius de *Nitrosomonas europaea* l'oxidació de l'amoni és inhibida a una pressió parcial d'C_2H_2 d'1 Pa o més, però no del tot a 0.1 Pa, mentre que Berg *et al.* (1982) troben que la nitrificació està totalment inhibida a una pressió parcial de C_2H_2 de 10 Pa, mentre que a 0.1 Pa està parcialment inhibida a partir del tercer dia d'incubació i a 0.01 Pa no té cap efecte. Concretament, l'acetilè inhibeix l'amoni-oxigenasa el qual funciona com un inhibidor no-competitiu (Hynes i Knowles, 1982; 1984). L'efecte de l'acetilè sobre la nitrificació persisteix durant diversos dies després d'eliminar-lo.

1.6.2 Inconvenients de la tècnica d'inhibició amb acetilè

Terry i Duxbury (1985) mantenen que en sòls exposats a l'acetilè i amb una baixa disponibilitat de C orgànic pot haver-hi una adaptació metabòlica de manera que aquell serveixi com a substrat per als microorganismes desnitrificants. De fet, Germon (1980) ja havia demostrat que la desaparició de nitrats sota condicions anaeròbies era més gran en presència que en absència

d'acetilè. Tot i que el metabolisme de l'acetilè pot, d'una banda, incrementar les emissions de N_2O al suposar una font d'energia per als organismes desnitrificants, de l'altra pot reduir-les ja que comporta una disminució de la pressió parcial d'acetilè que pot assolir nivells per sota dels requerits.

Sembla que a baixes concentracions de nitrats pot passar que no hi hagi inhibició del procés, almenys dins del rang de concentracions d'acetilè d'1 a 5 kPa (Knowles, 1990). Benckiser (1994) observa que quan un baix subministrament de nitrats coincideix amb taxes elevades de mineralització, el bloqueig de la N_2O-reductasa per l'acetilè és massa efímer. Aquestes condicions d'excés de donador d'electrons i manca d'acceptors es pot donar després de l'aplicació de palla, compost, etc. La inhibició de la nitrificació per l'acetilè pot estimular la reducció de N_2O a N_2.

En el cas de mostres amb un contingut suficientment baix de nitrats com per actuar com a factor limitant, la presència d'acetilè pot suposar un inconvenient ja que indirectament afectarà l'estimació de les pèrdues per desnitrificació (Ryden, 1982). A més, la inhibició de la nitrificació també pot conduir a un menor consum d'oxigen i, per tant, a una disminució de la taxa de desnitrificació.

En sòls de textura pesada o saturats d'aigua aquest mètode pot no ser massa satisfactori ja que aquestes condicions dificulten la difusió de l'acetilè als microhàbitats d'activitat desnitrificant. D'altra banda, observat que la desnitrificació pot estar subestimada quan s'utilitza la tècnica d'inhibició amb acetilè ja que aquest compost disminueix la producció de NO. Bollmann i Conrad (1997) arriben a conclusions similars i proposen determinar $NO + N_2O + N_2$.

1.7 Objectius generals del treball

El desconeixement dels nivells d'emissió de N_2O i de la importància de la desnitrificació així com la seva regulació tant en sòls agrícoles com naturals de les nostres contrades és el principal punt de partida dels objectius d'aquest treball.

La major part dels estudis en sòls agrícoles s'han realitzat en zones on la climatologia és molt diferent a la de la nostra àrea. En aquest sentit, treballar amb sòls sotmesos a un clima típicament mediterrani comporta anar aprofundint en les complicades interrelacions entre els processos implicats en les emissions de N-gas i els seus principals factors reguladors. Els sòls de conreu

de l'àrea mediterrània es caracteritzen per presentar baixos nivells de matèria orgànica deguts a una intensa activitat mineralitzadora i per estar sotmesos amb més o menys grau a una sequera estival.

La climatologia de la zona comporta unes pràctiques de conreu particulars donat que l'economia de l'aigua és un aspecte molt important a considerar. En aquest sentit, en plantacions de fruiters l'aplicació d'aigua al sòl es realitza cada vegada més a través d'un sistema de reg localitzat d'elevada freqüència. L'aplicació conjunta d'aigua i adobs nitrogenats és també una pràctica comú quan s'utilitza aquest sistema de reg, fet que pot modificar els patrons d'emissió de N-gas. Donat que Catalunya és la comunitat autònoma dins l'Estat Espanyol amb una major importància dins el camp de la fruticultura, on les plantacions de fruita dolça ocupen el quart lloc en extensió i producció per darrera dels conreus d'ametller, olivera i vinya, va semblar interessant aprofundir en el coneixement de la influència d'algunes pràctiques de conreu sobre l'emissió de N_2O i desnitrificació en dues plantacions de pomera 'Golden' ubicades a l'Estació Experimental de la Fundació "Mas Badia".

Malgrat que els sòls agrícoles ocupen una part considerable del nostre territori, els ecosistemes naturals també tenen la seva importància sobretot si es considera la riquesa paisatgística conseqüència del considerable nombre de climes diferents deguts a la geomorfologia de la zona. Això va comportar l'oportunitat d'aprofundir en la regulació de les emissions de N_2O i de la desnitrificació a una escala més global; comunitat vegetal, material originari del sòl i la climatologia varen ser aspectes considerats a l'hora d'escollir les zones de mostreig.

El treball que aquí es presenta s'ha estructurat en dues parts ben diferenciades: aquella realitzada en **sòls agrícoles** (Capítol 3) i la corresponent a **sòls d'ecosistemes naturals** (Capítol 4). Alhora, cadascuna d'elles està dividida en dos subcapítols en funció dels objectius proposats.

En l'apartat de **sòls agrícoles**, els objectius principals es centraven en:

a. estudiar l'efecte de l'aplicació de diferents quantitats d'aigua al sòl a través d'un sistema de reg localitzat d'elevada freqüència sobre l'activitat desnitrificant; les quantitats afegides es determinaven en base a l'aigua evapo-transpirada pel conreu (ETc).

b. estudiar l'efecte de l'aplicació de diferents tipus i dosis d'adobs nitrogenats sobre les emissions de N_2O; els adobs escollits varen ser els més freqüentment utilitzats en la nostra àrea d'estudi: nitrat amònic, urea i N32.

En el cas dels **sòls d'ecosistemes naturals** els dos subcapítols es poden diferenciar bàsicament en funció de l'escala de treball essent els objectius principals els següents:

a. aprofundir en l'estudi de la regulació de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació a una escala global determinant les zones de mostreig en funció del material originari del sòl, la vegetació i la climatologia;

b. determinar les emissions de N_2O i la taxa de desnitrificació en sòls d'ecosistemes forestals caducifolis, concretament en sòls de fageda. Analitzar la variabilitat espacial d'aquestes taxes i relacionar-la amb la variació d'alguns dels principals factors reguladors.

CAPÍTOL 2

Material i Mètodes

2.1 Material

2.1.1 Sòls mostrejats

En funció dels objectius proposats en aquest treball es varen mostrejar diferents sòls, els quals es poden separar bàsicament en dos grups: a. sòls agrícoles
b. sòls naturals

2.1.1.1 Sòls agrícoles

Es varen escollir dues plantacions de pomera de la Finca de l'Estació Experimental de la Fundació "Mas Badia" (Mas Badia), ubicada a Canet de la Tallada, terme municipal de Verges. Les seves coordenades geogràfiques són 42° 03' N i 3° 04' E , i està situada a 14 m sobre el nivell del mar.

a. Característiques climàtiques de la zona

El clima de la zona és típicament mediterrani (Figura 2.1), amb una temperatura mitjana de 14.6 °C i una precipitació anual de 605 mm. El vent que ve del nord és un tret característic de la climatologia d'aquesta zona.

Altres dades meteorològiques d'interès són:

Temperatura màxima absoluta	38.0 °C
Temperatura màxima mitjana del mes més càlid	29.2 °C
Temperatura mínima mitjana del mes més fred	0.8 °C
Temperatura mínima absoluta	-13.0 °C

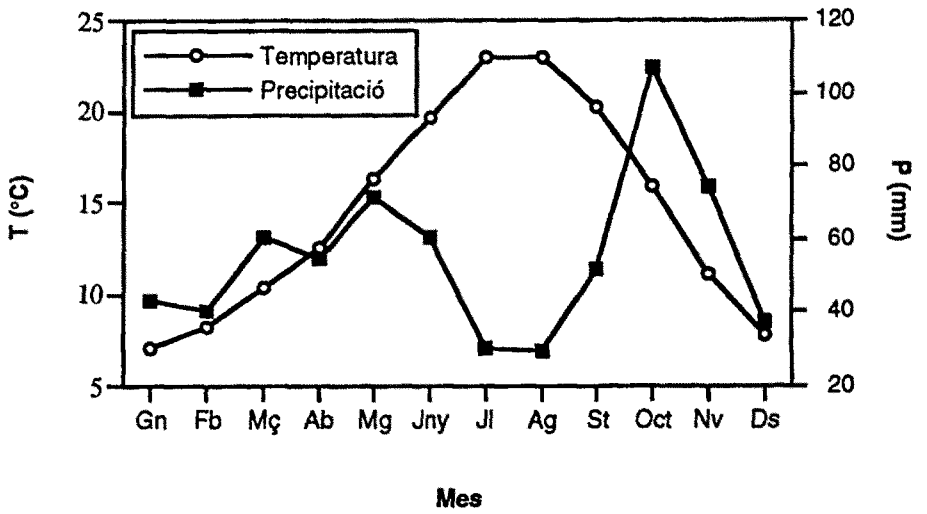

Figura 2.1 - Diagrama ombrotèrmic obtingut a partir de les dades climatològiques recollides a l'estació meteorològica de la Finca Experimental "Mas Badia" durant el període comprès entre 1984-93.

b. Característiques de les plantacions de pomera de la Finca Experimental "Mas Badia"

Les principals característiques de cadascuna de les plantacions de pomera mostrejades es poden observar a la Taula 2.1. El principal tret diferencial entre ambdues és l'edat de la plantació. Aquesta diferència és important donat que la dinàmica de l'aigua del sòl està fortament afectada per la cobertura vegetal.

Les varietats principals utilitzades, 'Golden smoothee' i 'G. delicious', són molt similars. Ambdues són de grandària mitjana i només parcialment autofèrtils, requerint pol.linització creuada per tal d'assegurar una bona producció. Tot i que 'G. delicious' és la més estesa a Europa, en la nostra zona d'estudi és preferible 'G. smoothee' degut a la seva menor sensibilitat al Russeting, el qual constitueix la causa principal de depreciació comercial de 'G. delicious' ja que presenta una cutícula especialment delicada a aquesta fisiopatia. Les varietats pol.linitzadores utilitzades són poc vigoroses i molt productives; actualment wellspur està superada. Els portaempelts emprats són poc sensibles a l'asfíxia radicular i amb bon arrelament. En el camp de pomeres adultes, tant el marc de plantació, excessivament petit en relació al gran vigor que té el portaempelt EM-7, com l'orientació E-O de les fileres comporten una floració incorrecta degut a problemes de manca d'il.luminació. En general, EM-7 és menys sensible a l'atac de paràsits, sobretot *Phytophtora cactorum* (mal de coll); tanmateix, el seu principal defecte rau en la tendència a emetre rebrots. Actualment es tendeix a la utilització de peus

menys vigorosos per tal d'augmentar el nombre d'arbres per plantació. Totes les varietats s'han format en eix central tipus "fussetto".

Taula 2.1 - Característiques de les plantacions de pomera de la Finca Experimental "Mas Badia"

Característiques	**Plantació JOVE**	**Plantació ADULTA**
Espècie	*Pyrus malus*	*Pyrus malus*
Varietat	Golden smoothee	Golden delicious
Any de Plantació	1988	1981
Portaempelt varietat	MM-106	EM-7
Pol.linitzador	Oregon spur	Wellspur
Portaempelt pol.linitzador	MM-106	MM-106
Pol.linitzador (%)	25	2.5
Marc de plantació	3.75*1.35 m	3.5*1 m
Orientació	N-S	E-O
Sistema de formació	"fussetto"	"fussetto"
Àrea del camp	1 ha	0.9 ha
Sistema de reg	Degoteig	Microaspersió
Sistema de fertilització	Fertirrigació	Fertirrigació

En els dos camps, el sistema de reg era localitzat i amb fertirrigació, tot i que diferien en el sistema d'aplicació. En la plantació de pomeres joves l'aigua de reg s'aplicava amb degoters autocompensants de 24 $L.h^{-1}$, variant el temps de reg per a cada tractament; en la plantació adulta es varen utilitzar microaspersors de diferent cabal. Es va regar amb una freqüència diària en la major part del període de reg; l'aplicació es feia al capvespre, quan les pèrdues per evaporació són mínimes. Les dosis assajades varen ser 75, 100 i 150 % de l'ETc (evapotranspiració del conreu), és a dir, un nivell per sota i un per sobre de les necessitats teòricament correctes per al creixement òptim del cultiu (100 % de l'ETc). Aquestes eren calculades en base al concepte de balanç hídric (ct. Camps i Bonany, 1993), estimant l'ETc a partir de l'ETo (evapotranspiració de referència) corregida per un coeficient específic de cultiu (Kc) i per un d'ombreig (a), de la següent manera:

$$ETc = ETo \cdot Kc \cdot a$$

L'ETo es defineix com el nivell d'evapotranspiració d'una superfície considerable de gespa d'una alçada uniforme (8-15 cm) en creixement actiu, que recobreix enterament el sòl, i ben proveïda d'aigua. L'elecció de la gramínia es fa en funció de la seva temperatura biològica òptima i de les condicions ambientals. Els valors d'ETo es varen calcular a partir de l'equació de Penman horària modificada, la qual considera els següents paràmetres meteorològics: velocitat i direcció del vent, humitat relativa i temperatura de l'aire, radiació neta i radiació solar. En el nostre cas, els valors utilitzats varen ser els històrics per a l'Empordà (Camps *et al.*, 1993) corregits setmanalment amb els de l'any en qüestió si la diferència era superior al 20 %.

El coeficient d'ombreig del cultiu (a) depèn del període vegetatiu de les plantes i del seu estat fenològic. La densitat de població, l'orientació i l'alçada de la plantació també poden afectar l'evapotranspiració. La FAO recomana dividir el cicle en 4 fases principals: inicial (10 % d'ombreig), de desenvolupament (70 - 80 % d'ombreig), de ple desenvolupament (màxim ombreig), i de maduració.

c. Característiques del sòl de cada plantació

Ambdues plantacions de pomera es troben situades en una zona al.luvial plana. Els sòls, desenvolupats sobre gresos del Quaternari, són molt profunds, sense pedregositat superficial ni afloraments rocosos i ambdós classificats segons la Soil Taxonomy (1992) com a *Typic xerofluvent* (Font: "Mas Badia"). El règim d'humitat del sòl és xèric i el de temperatures mèsic.

A la Taula 2.2 es poden observar les principals característiques físico-químiques de l'horitzó A_p per a cadascun dels dos camps. En ambdós casos es tracta d'un horitzó de pH bàsic amb un contingut mig de carbonats i un nivell de calç activa tal que no comporta problemes de clorosi fèrrica. El contingut de matèria orgànica és baix, sobretot en la plantació de pomeres joves, tot i que propi de sòls de clima mediterrani. Els valors de la relació C/N indiquen un considerable grau de descomposició de la matèria orgànica. Es tracta d'horitzons amb una proporció molt baixa d'elements grollers. La textura de l'horitzó Ap és franc-arenosa en la plantació jove i franc-argilosa en la plantació de pomeres adultes segons el Sistema de Classificació Internacional. Aquestes diferències texturals confereixen característiques particulars al sòl de cada plantació sobretot pel que fa a la capacitat de retenció d'aigua. Ambdós casos es caracteritzen per presentar una baixa capacitat d'intercanvi catiònic i presenten el complex de canvi saturat degut

als elevats continguts d'ions Ca^{2+} intercanviables. Per contra, els continguts de Mg^{2+}, K^+ i Na^+ són, en general, baixos. Cap dels dos horitzons presenta problemes de salinitat. L'horitzó A_p del camp de pomeres adultes mostrava una activitat biològica relativament intensa deguda als cucs de terra.

Taula 2.2 - Caracterització físico-química de l'horitzó A_p d'ambdós camps de pomeres, joves i adultes, situats a la Finca Experimental "Mas Badia"

Paràmetre edàfic	Plantació JOVE	Plantació ADULTA
Profunditat (cm)	0-20	0-20
Elements grollers (%)	0.7	0.5
Densitat aparent ($g.cm^3$)	1.4	1.3
pH (actual) 1:2.5	7.5	8.0
pH (potencial) 1:2.5	7.1	7.4
Carbonats (%)	11.5	19.2
Calç activa (%)	4.4	5.2
Matèria orgànica (%)	1.8	2.5
Nitrogen total (%)	0.13	0.16
Relació C/N	8.1	9.1
Na ($meq.100\ g^{-1}$)	0.7	0.8
K ($meq.100\ g^{-1}$)	0.2	0.2
Mg ($meq.100\ g^{-1}$)	1.1	1.0
Ca ($meq.\ 100g^{-1}$)	34.2	36.9
Σ Cations ($meq.100\ g^{-1}$)	36.3	38.9
CIC ($meq.100\ g^{-1}$)	8.0	8.2
Saturació (%)	Saturat	Saturat
Salinitat 1:5 ($dS.m^{-1}$)	0.16	0.16
Sorres grolleres (%)	20.8	3.4
Sorres fines (%)	52.1	52.7
Llims (%)	20.1	27.8
Argiles (%)	7.0	16.1
Classe Textural (S.I.)	Franc-arenosa	Franc-argilosa

En la plantació de pomeres adultes es donen importants desequilibris hídrics degut a la presència de rodals, amb una capa subsuperficial de llim i sorra molt fina bastant impermeable; això comporta una taxa baixa d'infiltració, tot i que una vegada infiltrada, l'aigua percola ràpidament degut a l'elevat contingut de sorra que hi ha a sota. La plantació jove es caracteritza

per la presència de cremadors; això comporta una elevada heterogeneïtat textural fortament reflexada per les diferències en el vigor de les pomeres.

d. Fertilitzants nitrogenats assajats

El nitrat amònic (NO_3NH_4), la urea [$CO(NH_2)_2$] i el N32 (comercial i sintètic) -una barreja de nitrat, amoni i urea- varen ser els adobs nitrogenats escollits per estudiar l'efecte de cadascun d'ells sobre les emissions de N_2O ja que són els habitualment aplicats a les plantacions de pomera de les quals es varen extreure les mostres de sòl. Mentre que els dos primers són fertilitzants sòlids dels quals s'ha de preparar una solució mare per a la seva aplicació per fertirrigació, el N32 es troba en forma de solució nitrogenada. Tanmateix, tant el nitrat amònic com la urea presenten una elevada solubilitat en aigua; això és molt important de cares a la seva aplicació per fertirrigació.

Taula 2.3 - Característiques dels adobs nitrogenats assajats (Domínguez Vivancos, 1993)

Fertilitzants	Solubilitat 20 °C $g.L^{-1}$	Nitrogen (%)	Índex de sal
Nitrat amònic	1920	33.5 - 34.0	104.7
Urea	1033	34 - 46	75.4
N32	–	32	70.1

Nitrat amònic (NO_3NH_4)

Conté una riquesa del 33.5 - 34 % de N, la meitat del qual es troba en forma d'ió nitrat i l'altra meitat en forma d'ió amoni. Els ions nitrat, molt solubles en aigua i pràcticament no retinguts pel complex d'intercanvi iònic, són fàcilment lixiviats. Els ions amoni també són solubles en aigua però, a diferència dels nitrats, són susceptibles de ser retinguts pel complex de canvi. En medi bàsic, els ions amoni es volatilitzen fàcilment. Tanmateix, el nitrat amònic acidifica el pH de l'aigua.

Urea

És la diamida de l'àcid carbònic, la qual s'obté per condensació de l'amoníac amb CO_2. Presenta una riquesa del 46% en nitrogen ureic. Es tracta d'un compost no polar que té

menys efecte depressiu sobre la solubilitat dels electròlits i produeix una menor pressió osmòtica en solució. A l'hora de l'elecció cal tenir en compte el seu contingut en biuret, ja que és un producte altament tòxic per a la planta, el qual prové de la condensació de dues molècules d'urea amb una d'amoníac. Sembla que el contingut màxim en biuret no hauria de sobrepassar el 0.3 %. No acidifica l'aigua. Aplicada al sòl, la urea pateix la hidròlisi enzimàtica per acció de la ureasa, que la transforma primer en carbonat amònic i finalment en amoníac i àcid carbònic segons la reacció:

$$CO(NH_2)_2 + 2\,H_2O \longrightarrow CO_3(NH_4)_2 \longleftrightarrow CO_3^{2-} + 2\,NH_4^+$$

Aquesta transformació es produeix en pocs dies i, per això, la urea es considera com un fertilitzant amoniacal.

N32

És una solució nitrogenada amb una riquesa del 32 % en N, la qual es reparteix amb un 8% de nitrogen nítric, un 8% de nitrogen amoniacal i un 16% de nitrogen ureic. Té reacció neutra o lleugerament alcalina, i la seva densitat és de 1.36 $g.cm^{-3}$. El N32 comercial utilitzat és del fabricant CROS, S.A., mentre que el sintètic s'ha obtingut al laboratori a partir d'una dissolució aquosa de nitrat càlcic, sulfat amònic i urea, tots tres amb una puresa del 100 %, de tal manera que les formes nítrica, amoniacal i ureica estiguin en les mateixes proporcions que en el N32 comercial.

2.1.1.2 Sòls naturals

Dins aquest grup queden englobats sòls corresponents a dues zones geogràfiques molt distants: a. de la meitat nord d'Itàlia

b. del N-E de la Península Ibèrica, en concret de la província de Girona.

En ambdós casos l'elecció dels sòls es va fer en funció del material originari i el tipus de vegetació (Taula 2.4).

Taula 2.4 - Característiques descriptives de les zones mostrejades (sòls naturals)

Sòl	Zona	Coordenades	Altitud (m)	Precipitació (mm)	Material Originari	Geomorfologia	Vegetació
A	Pania Secca (Alps Apuans - Lucca)	44° 02' N 10° 22' E	1100	1800	Material calcari (***)	Pendent: 5% Orientació: N	Fageda
B	Monte Amiata (Siena - Grosseto)	42° 54' N 11° 37' E	1100	1800	Traquites i basalts (**)	Pendent: 5% Orientació: N	Fageda
1	Puig-Neulós (Albera)	42° 29' N 02° 57' E	1260	900-1000	Sil.limanita - feldspat potàssic, anatexites (*)	Pendent: 15% Orientació: N-O	Fageda amb sotabosc de gramínies
2	Estanys de La Jonquera	42° 23' N 02° 55' E	100	900-1000	Tonalites biotítiques i bioticohorblèndiques (*)	Pla	Vegetació lacustre, envoltada de sureres, ginesta, estepa,...
3	Aiguamolls de Vilaüt	42° 18' N 03° 05' E	<20	500-600	Lutites del Quaternari (***) (Depòsits al.luvials)	Pla	Erm
4	Crosa de St. Dalmai	41° 55' N 02° 44' E	60	700-800	Piroclastes (**) (Material volcànic)	Pendent: 10% Orientació: N-O	Alzinar típic
5	St. Hilari Sacalm	41° 53' N 02° 31' E	780	700-800	Granodiorites biotítiques (*)	Pendent: 5% Orientació: S-O	Sureda esclerissada amb ginestó, estepa, cirer d'arboç, garrig,...
6	Massanet de la Selva	41° 47' N 02° 44' E	100	600-700	Basalts (**) (Material volcànic)	Pla (Pendent: 1%)	Bosc mixt amb sotabosc d'alzinar

(continua)

Sòl	Zona	Coordenades	Altitud (m)	Precipitació (mm)	Material Originari	Geomorfologia	Vegetació
7	St. Grau d'Ardenyà	41° 47' N 03° 04' E	410	600-700	Granits leucocràtics (*)	Pendent: 5% Orientació: N-O	Sureda
8	Ctra. d'Oix a Beget (a prop del Coll de la Guilla)	42° 18' N 02° 30' E	600	1100-1200	Margues i guixos amb intercal.lacions calcàries (***)	Pla (Pendent: 1%)	Prat de muntanya
9	La Pastuïra	42° 25' N 02° 16' E	1800	1100-1200	Gneis moscovític-biotític (*)	Pendent: 5% Orientació: O	Prat d'alta muntanya
10	Ctra. Setcases a Vallter	42° 24' N 02° 16' E	1400	1200-1300	Esquits (*)	Pendent: 5% Orientació: S	Prat d'alta muntanya
11	Coll de Merolla	42° 15' N 02° 02' E	1000	800-900	Margues, margocalcàries i bretxes (***)	Pla (Pendent: 1%)	Prat de muntanya
12	Adri	42° 03' N 02° 44' E	240	700-800	Basanites (**) (Material volcànic)	Pla (Pendent: 1%)	Alzinar esclerissat
13	St. Martí del Corb	42° 08' N 02° 32' E	650	800-900	Basanites (**) (Material volcànic)	Pla	Fageda amb Helleborum
14	Fageda d'en Jordà	42° 11' N 02° 35' E	560	800-900	Basalts (**) (Material volcànic)	Pla	Fageda amb sotabosc molt pobre

(*): silícic àcid; (**): silícic bàsic; (***): material calcari

2.2 Mètodes

2.2.1 Determinació de la taxa d'emissió de N_2O i de desnitrificació

Els diferents mètodes utilitzats per a la determinació tant de la taxa d'emissió de N_2O com de desnitrificació constaven, en qualsevol cas, de dues parts ben diferenciades:

a. la incubació de la mostra de sòl pròpiament dita;
b. la determinació del N_2O emès per cromatografia de gasos amb detector de captura d'electrons (ECD).

En la major part dels assajos, la determinació cromatogràfica dels nivells d'emissió de N_2O es va fer directament a partir d'una mostra de gas de l'atmosfera interna del recipient d'incubació. Tanmateix, en alguns casos es va requerir d'un pas intermig ja que el N_2O es retenia en una trampa amb sedàs molecular de 5Å de diàmetre de porus; prèviament a la lectura cromatogràfica era necessari el desplaçament de tot el N_2O retingut en el sedàs. D'altra banda, la diferència entre la determinació de la taxa de desnitrificació i d'emissió de N_2O era l'addició o no d'acetilè (Carburos Metálicos, C-26) a l'inici de la incubació.

2.2.1.1 Mètodes d'incubació

Els mètodes d'incubació utilitzats en aquest estudi es diferencien, d'una banda, en el tipus de mostra emprada (alterada-intacta); de l'altra, en el lloc d'incubació (*in situ*-laboratori). Aquesta es realitzava en condicions estàtiques o bé dinàmiques.

2.2.1.1.1 Incubacions amb mostra intacta

a. Incubacions *in situ* amb cambres inserides en el sòl

El mètode utilitzat va ser el proposat per Ryden *et al.* (1979) modificat per a adaptar-lo a les nostres condicions de treball. En el nostre cas, es varen inserir en el sòl abans del començament de l'assaig cilindres de PVC de 15 cm d'alçada per 25 cm de diàmetre i provistos d'uns conductes laterals que permetien la circulació de l'aire. A l'inici de cada

incubació els cilindres es tapaven totalment per sobre la superfície del sòl. Aleshores, es connectaven a una de les sortides laterals dues trampes de $CaCl_2$ per a la retenció de la humitat i dues de NaOH per a l'adsorció de CO_2 col.locades alternativament; l'eliminació del CO_2 és necessària per evitar la sobreposició del seu pic cromatogràfic amb el del N_2O (Arcara, 1988). A continuació, s'inseria una trampa amb 20 g de sedàs molecular d'aproximadament 2 mm de diàmetre i amb una grandària de porus de 5 Å (Merck) per a l'adsorció del N_2O. Amb un fluxímetre es regulava el flux de l'aire generat per una bomba de succió a 35 $mL.min^{-1}$ (Figura 2.2). Les incubacions duraven de 2 a 3 hores.

En el cas d'addició d'acetilè, prèviament a l'inici de la incubació es col.locava a l'interior del cilindre i sobre la superfície del sòl una càpsula de porcellana amb CaC_2 de manera que, al reaccionar amb aigua, s'alliberava C_2H_2. Per tal de permetre la difusió del C_2H_2, abans de connectar el sistema de trampes, el conjunt es deixava totalment tancat aproximadament uns 30 minuts; tot i que és un temps relativament curt, cal tenir en compte que el tipus de textura d'aquests sòls, sobretot el de la plantació jove, afavoreix el moviment dels gasos a través del perfil edàfic. Abans d'iniciar la incubació pròpiament dita, es destapava el cilindre durant uns minuts per eliminar l'excés d'acetilè en el seu volum lliure. Una vegada finalitzada la incubació, les trampes de sedàs molecular es tapaven i es guardaven a 4 °C fins al seu desenvolupament.

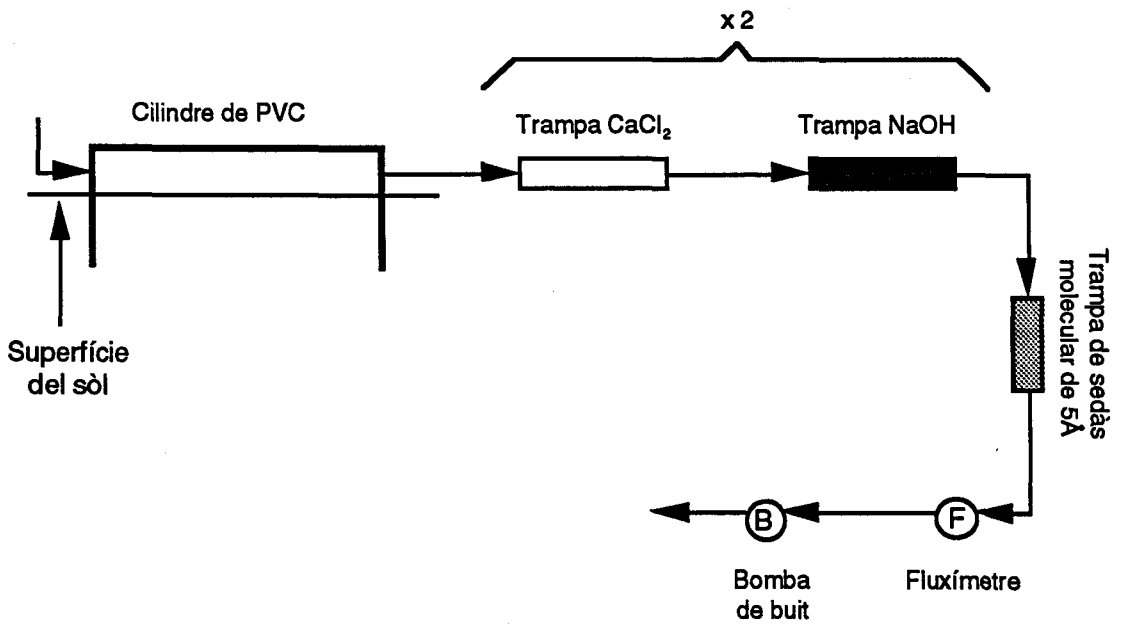

Figura 2.2 - Esquema del muntatge per a la realització d'incubacions *in situ*

Les hores del dia en les que es realitzaven les incubacions estaven compreses entre les 10 h i les 17 h. Durant la incubació es feia un seguiment de la variació de la temperatura i de la humitat del sòl a una profunditat aproximada de 5 cm amb l'ajuda d'un Datalogger Campbell CR10x dotat amb les sondes corresponents; les mesures es prenien cada 10 min.

b. Incubació de nuclis intactes de sòl

L'extracció de nuclis intactes de sòl es va fer amb l'ajuda d'una sonda ja que la distorsió del sistema edàfic pot afectar significativament les taxes d'emissió de gasos. Una vegada extrets, els nuclis es transportaven des del lloc de mostreig en neveres de camp fins al laboratori, on s'incubaven en les condicions desitjades, estàtiques o bé dinàmiques.

b1. Estàtica

Els cilindres d'acer inoxidable utilitzats per a l'extracció dels nuclis mesuraven 12 cm de llargada i 6 cm de diàmetre intern. Una vegada extrets els nuclis intactes de sòl amb aquests cilindres i portats al laboratori, cadascun d'ells es col.locava a l'interior d'un recipient de vidre hermètic provist d'un sèptum a la part superior i s'incubava durant 24 h a 20 °C o bé a la temperatura mitjana del mes de mostreig, en funció de l'assaig, sense i amb acetilè (2% v:v). Passat aquest temps, s'extreia una al.líquota de 7 mL de l'atmosfera interna per a la determinació analítica dels nivells de N_2O emesos, i es guardava en vacutainers de 5 mL. Prèviament a l'extracció de la mostra de gas, s'homogeneïtzava l'atmosfera interna bombejant diverses vegades amb una xeringa de 50 mL.

b2. Amb recirculació (dinàmica)

En aquest cas les dimensions dels cilindres d'acer inoxidable eren de 15 cm de llarg per 6 cm de diàmetre. Per a la incubació dels nuclis intactes de sòl per aquest mètode es col.locava, tant a la part superior del cilindre com a la inferior, una peça de PVC provista d'almenys dos sèptums i una junta d'estanquitat, de manera que el conjunt quedava hermèticament tancat. La peça inferior presentava una reixeta d'acer inoxidable per tal d'evitar que es desestructurés la mostra (Figura 2.3).

Posteriorment, s'incubaven al laboratori en una cambra de condicions controlades durant 24 h a la temperatura mitjana del mes de mostreig, amb i sense acetilè (2% v:v). En el primer cas, l'atmosfera interna a l'inici de la incubació s'homogeneïtzava una vegada afegit l'acetilè, fent recircular l'aire aproximadament durant 3 minuts amb l'ajuda d'un compressor, de tal manera que es creava un circuit tancat entre la part superior i la inferior del cilindre. Prèviament a l'extracció de la mostra de gas, també s'homogeneïtzava l'atmosfera interna seguint el mateix procediment.

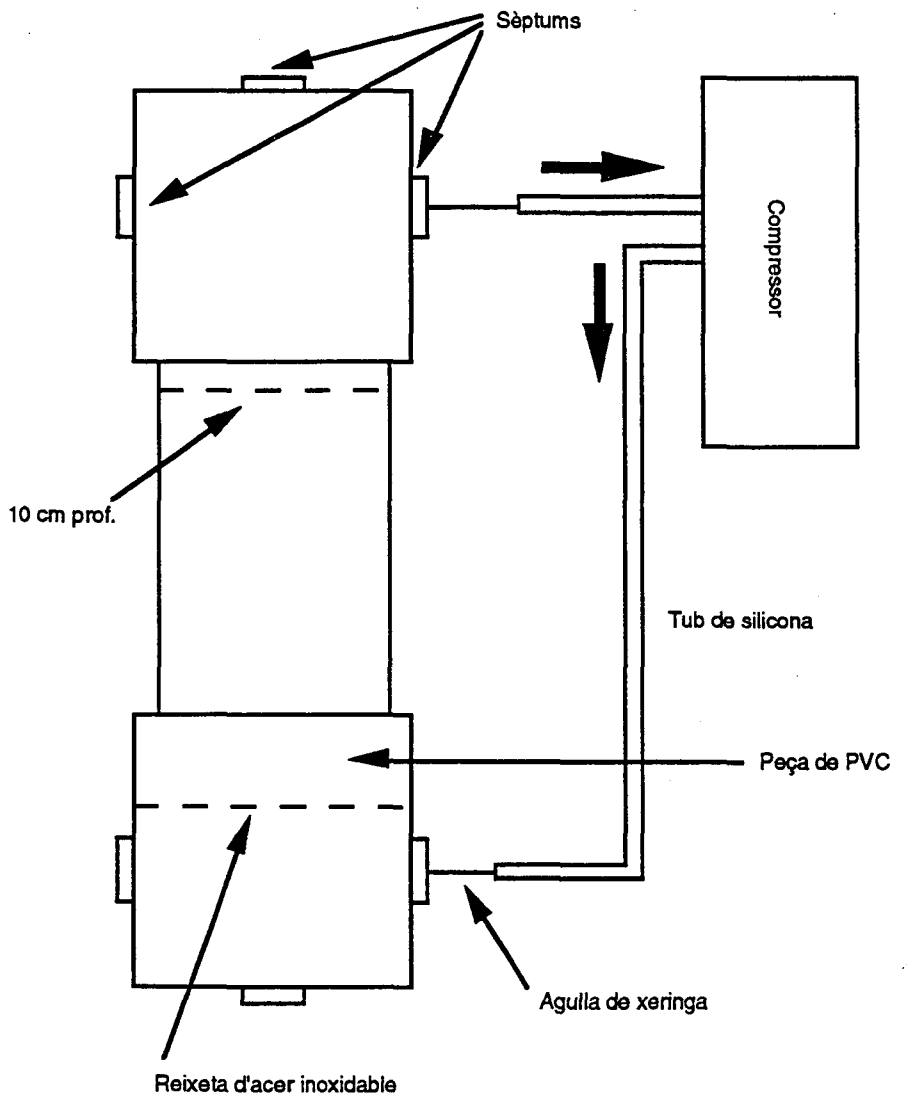

Figura 2.3 - Esquema del sistema d'incubació de nuclis intactes de sòl amb recirculació

2.2.1.1.2 Amb mostra alterada

a. Determinació dels nivells d'emissió de N_2O a partir d'una incubació dinàmica

Es col.locava l'equivalent en mostra fresca a 500 g de pes sec en una ampolla especial d'un volum d'1 L que tenia dos orificis, un d'entrada i l'altre de sortida d'aire. Es portava la mostra de sòl a capacitat de camp amb una solució nitrogenada de concentració coneguda. A continuació es connectaven diverses trampes que contenien alternativament $CaCl_2$ i NaOH, per a la retenció d'aigua i CO_2, respectivament. Una trampa amb aproximadament 20 g de sedàs molecular de 5 Å de diàmetre de porus retenia, finalment, el N_2O produït per la mostra de sòl incubada.

Abans de començar la incubació s'ajustava el cabal d'aire de sortida a 30-35 $mL.min^{-1}$ amb un fluxímetre. La incubació es realitzava durant un període aproximat de 12 dies a temperatura i humitat relativa constants (20 °C i 60 %, respectivament). Aproximadament, cada 2 dies es canviava la trampa de sedàs molecular, la qual es guardava a 4 °C per a la posterior determinació analítica del N_2O retingut en el sedàs.

b. Determinació de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació a partir d'una incubació estàtica en condicions d'anaerobiosi

b1. A capacitat de camp

Es col.locava l'equivalent a 100 g de mostra seca en un erlenmeyer de 150 mL i s'hi afegia aigua destil.lada fins que el contingut d'aigua de la mostra incubada fos equivalent a la capacitat de camp. Posteriorment es sotmetia a 3 cicles consecutius de buit/atmosfera de N_2 en una cambra d'anaerobiosi. Es deixava estabilitzar l'atmosfera del sòl dins d'aquesta cambra durant dues hores. Passat aquest temps es tapava i 24 hores després es prenia una mostra de l'atmosfera interna, la qual es guardava en un vacutainer de 10 mL a sobre pressió i a 4 °C fins a la seva determinació cromatogràfica. En el cas d'addicionar acetilè, un volum determinat d'atmosfera interna era substituïda pel mateix volum d'acetilè, el qual representava un 10 % de l'atmosfera d'incubació.

b2. A saturació

En un flascó roscat d'aproximadament 135 mL es col.locava l'equivalent a 50 g de sòl sec i s'hi afegien 50 mL d'una solució nitrogenada que contenia l'equivalent a 100 µg $N.g^{-1}$ pes sec. Es sotmetia a 3 cicles consecutius de buit/atmosfera de N_2. S'incubaven durant 24 h a 20 °C i, posteriorment, s'extreia 1 mL de gas que s'analitzava directament per cromatografia de gasos per a la quantificació del N_2O emès en aquestes condicions. A continuació es substituïa l'atmosfera interna novament amb N_2 seguint el mateix procediment anterior. Aleshores es substituïa una part de l'atmosfera interna pel mateix volum d'acetilè de manera que aquest representés el 10 % del volum lliure. Es deixava incubar durant 24 h a 20 °C i, passat aquest temps, s'extreia 1 mL de l'atmosfera d'incubació per a la quantificació immediata del N_2O per cromatografia de gasos.

En ambdues condicions d'incubació, presència i absència d'acetilè, es quantificava també el N_2O dissolt aplicant la llei d'Henry (Moraghan i Buresh, 1977) degut a que el N_2O és molt soluble en aigua (0,24 % a 20 °C i 1 atm). Segons aquesta llei la massa d'un gas dissolt per una quantitat donada de líquid a una temperatura determinada és proporcional a la pressió parcial d'aquest gas. A partir d'aquí, el càlcul dels miligrams de N_2O dissolts (∂) en un sistema tancat es feia de la següent manera:

$$\partial = \beta \cdot x \cdot (V_{solució}/V_{atmosfera})$$

on β és la solubilitat del N_2O expressada en mL de N_2O dissolts per mL d'aigua, i x són els mg de N_2O en el volum lliure del flascó. Encara que la composició de la solució afecta la solubilitat del N_2O, utilitzar els coeficients de solubilitat de l'aigua no introdueix greus errors en la majoria d'investigacions relacionades amb sòls (Moraghan i Buresh, 1977).

c. Determinació de l'activitat potencial desnitrificant en el moment de prendre la mostra (APD)

Es col.locava en una flascó d'un volum aproximat de 135 mL una quantitat de mostra fresca i garbellada equivalent a 50 g de mostra seca . S'hi afegien 50 mL d'una solució 2 mM de glucosa i 1 mM de KNO_3 que contenia 1 $g.L^{-1}$ de cloramfenicol, un inhibidor de la síntesi proteica en bacteris. Es tapava el flascó hermèticament i es portava a condicions anaeròbiques evacuant l'atmosfera interna amb l'ajuda d'una bomba de buit i posteriorment restituint-la amb N_2, procés que es repetia tres vegades. Aquest procediment requeria un

temps total de 15 min. A continuació, s'extreia un volum determinat de l'atmosfera del flascó de manera que a l'afegir-hi un volum igual de C_2H_2 la pressió parcial d'aquest era aproximadament 0.1 atm (10 % del volum lliure). La incubació es realitzava amb agitació (250 rpm) i a una temperatura de 20 °C. Periòdicament s'extreia una al.líquota de l'atmosfera interna d'1 mL, la qual s'analitzava immediatament per cromatografia de gasos amb detector de captura d'electrons. Donada l'elevada variabilitat espacial del procés desnitrificant, aquesta prova es realitzava generalment per quintuplicat. Per a la determinació del N_2O total produït es considerava el N_2O dissolt aplicant la llei d'Henry.

2.2.1.2 Desenvolupament dels sedassos moleculars

Per al desplaçament del N_2O retingut en els sedassos moleculars, aquests es col.locaven en un flascó de 250 mL, el qual es portava a sotapressió, segons el mètode descrit per Duxbury i Voghel (1982). Posteriorment s'hi introduïen 50 mL d'aigua destil.lada i, donat que el desplaçament del gas per l'aigua és un procés exergònic, es deixava refredar fins a temperatura ambient. Es portava a pressió atmosfèrica amb N_2. La pressió del sistema es controlava mitjançant un manòmetre de doble columna graduada d'aigua a pressió atmosfèrica. A continuació, s'extreien 7 mL de l'atmosfera interna del flascó, els quals es col.locaven en un vacutainer de 5 mL i es guardaven a 4 °C fins al moment de la seva anàlisi per cromatografia de gasos. En aquest cas, per a la quantificació del N_2O retingut en el sedàs es considerava el que quedava dissolt en els 50 mL durant el seu desenvolupament.

La reactivació dels sedassos es realitzava escalfant-los a 305 °C durant 5 hores, com s'indica en la metodologia descrita per Duxbury i Voghel (1982).

2.2.1.3 Determinació quantitativa de N_2O per cromatografia de gasos amb detector de captura d'electrons (ECD)

La determinació del contingut de N_2O es va realitzar per cromatografia de gasos amb un detector de captura d'electrons. Les condicions de treball emprades en el nostre cas es mostren a la Taula 2.5.

La fase estacionària utilitzada (Chromosorb 102) és un copolímer d'estirè-divinil-benzè amb una estructura porosa de malla oberta i un diàmetre mig de porus de 0,0085 µm. Presenta caràcter hidrofòbic i dèbilment polar, i una elevada àrea superficial (300 a 400 $m^2.g^{-1}$).

Taula 2.5 - Especificació i condicions d'operació del cromatògraf de gasos utilitzat per a la determinació quantitativa del N_2O

Cromatògraf:	Konik - 2000 C
Columna:	2 m x 1/8 " (diàmetre intern); acer inoxidable
Fase estacionària:	Chromosorb 102 (80/100 mesh)
Detector:	Captura d'electrons (ECD)
Gas Portador:	Ar (95 %) + CH_4 (5 %)
$Flux_{columna}$:	40 $mL.min^{-1}$
$Flux_{detector}$:	60 $mL.min^{-1}$
$T_{injector}$:	Temperatura ambient
$T_{columna}$:	40 °C
$T_{detector}$:	350 °C

2.2.2 Determinació d'altres paràmetres edàfics

2.2.2.1 Determinació dels continguts de nitrat i amoni. Mètodes colorimètrics

El mètode utilitzat per a la determinació dels continguts de nitrat i amoni de mostres de sòl requeria un extracció prèviament a la determinació colorimètrica. En ambdós casos, aquesta es va realitzar amb un autoanalitzador Alpkem (OR, USA) el qual constava d'un mostrejador automàtic (mòdul 501), un diluïdor (mòdul 511), un sistema de bombes peristàltiques (mòdul 502A), un mòdul de vàlvules (512), el bloc de reacció (mòdul 503) i un detector (mòduls 504-505). L'aparell anava acoblat a un ordinador equipat amb el Software Softpac Plus versió 1.07.

a. Extracció

Es pesaven 10 g de sòl fresc i es col.locaven en una ampolla de 250 mL. S'hi afegien 100 mL de KCl 2M. Amb un agitador d'ampolles es remenava durant aproximadament 1 hora. Passat aquest temps, es filtrava la suspensió amb un filtre Whatman nº 42 i es guardava al congelador a -25 ºC per a la posterior determinació del contingut de nitrats i amoni.

b. Determinació colorimètrica

b1. Determinació colorimètrica del contingut de nitrats

La determinació colorimètrica dels nitrats es basava en la seva conversió en nitrits i la reacció d'aquests amb amines aromàtiques en solució àcida per produir sals dinitrogenades; posteriorment aquestes reaccionaven amb compostos aromàtics que contenien grups amino o hidroxil específics per formar compostos colorejats azo (-N=N-), detectables per espectrofotometria. La determinació colorimètrica del contingut de nitrats es realitzava pel sistema FIA (Flow Injection Analysis). En aquest cas, una quantitat precisa de mostra era injectada per una vàlvula d'injecció al corrent de líquid portador, el qual fluïa contínuament. La mostra arrossegada pel líquid portador passava a través d'una columna de cadmi on el nitrat era reduït quantitativament a nitrit. Al bloc de reacció, on els reactius i diluents hi arribaven en la proporció adequada gràcies a un sistema de bombeig, la mostra era tractada amb sulfanilamida en solució fosfòrica per convertir el nitrit en una sal dinitrogenada; aquesta es convertia immediatament en un compost colorejat azo gràcies a la N-(1-naftil)-etilendiamina. L'EDTA s'afegia per eliminar les interferències de Fe, Cu i altres metalls. La intensitat de color porpre-vermellós que es desenvolupava com a resultat d'aquests tractaments es determinava colorimètricament a una longitud d'ona de 540 nm. La determinació de la concentració de nitrats de la mostra es feia per comparació amb uns estàndards de calibració. En aquest cas, el rang de concentració emprat per a la realització de la corba patró anava de 0.1 a 10.0 mg $N\text{-}NO_3^-.L^{-1}$.

b2. Determinació colorimètrica del contingut d'amoni

La determinació colorimètrica dels ions amoni extrets amb una solució de KCl 2M es basava en la seva reacció amb salicilat en presència d'un agent oxidant tal com l'hipoclorit per formar un complex de color blau sota condicions alcalines (pH 12.8 - 13). Aquesta reacció era catalitzada pel nitroferrocianur sòdic. Per extractes de sòl es recomana afegir a la solució

EDTA-disòdica per tal d'eliminar les interferències que puguin provocar els cations di- i trivalents, ja que evita la seva precipitació. La intensitat del color blau produït era proporcional a la quantitat de NH_4^+; la qual es llegia a una longitud d'ona de 660 nm. En aquest cas, la determinació colorimètrica es realitzava pel sistema de SFA (Segmented Flow Analysis) en el qual la mostra que arribava al bloc de reacció, on també hi arribaven els reactants i diluents, era segmentada gràcies a la injecció de bombolles d'aire en el corrent de líquid portador. Es recomana utilitzar aquesta tècnica quan els temps de reacció són llargs. La quantificació de la concentració d'ions amoni de la mostra es feia per comparació amb uns estàndards de calibració i era aplicable a un rang de concentracions entre 0.1 i 20.0 mg N-$NH_4^+.L^{-1}$.

2.2.2.2 Determinació de l'activitat biològica del sòl (taxa respiratòria)

El mètode utilitzat es basa en la capacitat dels grànuls d'hidròxid càlcic i sòdic (*soda lime*) per retenir químicament el CO_2 (Edwards, 1982). Tot i que aquests grànuls també retenen la humitat, aquesta, a diferència del CO_2, pot eliminar-se assecant els grànuls a 105 °C. En aquest cas, els grànuls utilitzats eren d'una grandària d'entre 2-5 mm (Fluka P.A.).

Aleshores, 100 g de mostra fresca portats al 50 % de la capacitat de camp amb aigua destil.lada s'introduïen en un pot hermètic d'aproximadament 1/2 L juntament amb una càpsula de vidre amb 6-7 g de grànuls de *soda lime* prèviament assecats a l'estufa a 105 °C fins a pes constant. S'incubaven a la temperatura mitjana del mes de mostreig durant 5 dies. Passat aquest temps, es retiraven les càpsules, es col.locaven a l'estufa a 105 °C, i es pesaven quan els grànuls havien perdut tota la humitat. La diferència de pes representava la quantitat de CO_2 absorbit menys l'aigua alliberada durant la reacció química, a través de les següents reaccions:

$$2\,NaOH + CO_2 \longrightarrow Na_2CO_3 + H_2O$$

$$Ca(OH)_2 + CO_2 \longrightarrow CaCO_3 + H_2O$$

Per cada mol de CO_2 que s'uneix químicament a aquests grànuls s'allibera un mol d'aigua. Per tant, per obtenir el valor de CO_2 produït per la mostra incubada a través d'aquest mètode, cal aplicar un factor de correcció (1.41) tenint en compte els pesos moleculars del CO_2 i l'H_2O.

2.2.2.3 Caracterització físico-química del sòl

La caracterització físico-química del sòl (contingut d'aigua, pH, carbonats, calç activa, textura, carboni oxidable, nitrogen total, capacitat d'intercanvi catiònic -CIC- i bases de canvi) es va realitzar en base als mètodes d'anàlisi oficials descrits en el M.A.P.A.(1986): contingut hídric del sòl (gravimetria); pH (potenciometria); carbonats (calcímetre de Bernard); calç activa (mètode de Drouineau); salinitat (conductimetria, extracte 1:5); textura (mètode de la pipeta de Robinson, classificació segons el Sistema Internacional); $C_{fàcilment\ oxidable}$ (oxidació via humida); nitrogen total (mètode Kjeldahl); capacitat d'intercanvi catiònic (centrifugació); bases de canvi (Ca i Mg per absorció; Na i K per emissió).

2.3 Anàlisi estadística de les dades

La major part del tractament estadístic de les dades es va realitzar amb el paquet estadístic SAS (1990); només per a l'anàlisi de l'estructura espacial de la variabilitat de les dades es va utilitzar el paquet GEO-EAS (1988).

2.3.1 Anàlisi exploratòria de les dades

Per tal de conèixer el tipus de distribució de freqüències de cadascuna de les variables objecte d'estudi, es feia una anàlisi exploratòria de les dades a partir de l'estadística descriptiva (mitjana, mediana, desviació estàndard, coeficient de variació, i valors màxim i mínim). Es va utilitzar l'estadístic *W* de Shapiro-Wilks per saber si la funció de densitat de probabilitat de les dades originals s'ajustava a una distribució normal. En cas de distribucions esbiaixades, es calculava el mateix estadístic per a les dades transformades en el $\log_{10}$.

En alguns assajos es va calcular el nombre de valors extrems per a les dades d'emissió de N_2O i de desnitrificació, definits com els nuclis de sòl amb una taxa de desnitrificació més de 5 vegades la desviació estàndard per sobre de la mitjana (Parkin, 1987). Altres autors han utilitzat criteris diferents a l'hora de definir aquests nuclis (nuclis de sòl amb una activitat ≥ la mediana més 3 vegades el rang interquartil (Van Kessel *et al.*, 1993), aquells valors 1.5 vegades més grans que el rang interquartil de la mediana (Pennock *et al.*, 1992), almenys 5 vegades la

desviació típica per sobre de la mitjana de les altres taxes (Christensen *et al.*, 1990a); en qualsevol cas, es tracta d'una definició operacional.

2.3.2 Anàlisi de la variància i test de separació de mitjanes

L'anàlisi de la variància es va realitzar amb el Proc GLM disponible en el paquet estadístic SAS. Generalment es va determinar la suma de quadrats (*SQ*) tipus I; només en el cas de models no compensats s'utilitzava la suma de quadrats tipus III. Per evitar en la mesura que fos possible problemes d'heterocedasticitat, l'anàlisi es va efectuar sempre sobre les dades log-transformades. Per a la comparació múltiple de mitjanes es va emprar el test múltiple *F* de Ryan-Einot-Gabriel-Welch (*REGWF*).

2.3.3 Anàlisi de les relacions entre les diferents variables

Les tècniques estadístiques utilitzades per conèixer les relacions existents entre variables varen ser la correlació i la regressió. Per a l'estudi de les correlacions existents entre dues variables majoritàriament es va utilitzar el coeficient de correlació de Pearson; les dades prèviament es log-transformaven. En algun cas concret es va aplicar el test de correlació d'Spearman sobre les dades originals.

Pel què fa a l'anàlisi de regressió, normalment es varen utilitzar les dades log-transformades i, en la majoria de casos, es varen analitzar els residus per tal de contrastar *a posteriori* les hipòtesis del model lineal: normalitat, homocedasticitat, independència i linealitat. La hipòtesi de normalitat es va comprovar aplicant el test *W* de Shapiro-Wilks; l'heterocedasticitat es va detectar a partir del gràfic dels valors dels residus en funció dels valors predits, el qual també era útil per detectar desviacions de la hipòtesi de linealitat. En el cas de dades que seguien un ordre lògic (sèries temporals), la independència dels residus es va comprovar aplicant el test de Durbin-Watson (*DW*). D'altra banda, els punts d'elevada influència sobre la recta es detectaven a partir dels estadístics emprats amb aquesta finalitat: distància de Cook (D) > 4/n, Dffits > 2 $(p'/n)^{1/2}$, i leverage on p' és el nombre de paràmetres en el model (b_0=1 paràmetre, b_1=1 paràmetre,...) i n el nombre de parells de dades en la regressió. Per considerar-los realment influents almenys per dos dels estadístics havien de ser significatius. Es consideraven valors extrems aquells valors els residus estudentitzats dels quals eren >+2 o <-2. La detecció de punts extrems o d'elevada influència es sotmetia a una anàlisi més acurada per tal de decidir de rebutjar-los o no:

l'exclusió de punts que no són errors reals pot ser molt perillosa, ja que poden aportar informació molt important sobre les dades.

Per comparar diferents rectes de regressió es va realitzar una anàlisi de covariància modificada per tal de provar la igualtat de pendents.

En el cas de regressió múltiple, l'elecció de les variables independents òptimes es va fer pel procediment d'eliminació progressiva de variables (*backward*). Es va evitar incloure en el model variables altament colineals, les quals es detectaven a partir de l'anàlisi de components principals. Quan l'índex de condició, definit com el quocient entre el valor propi més gran i el més petit, era superior a 1000 indicava una elevada multicolinealitat. Per conèixer el nombre de variables colineals es calculaven els diferents nombres de condició dividint el valor propi de la primera component per cadascun dels altres valors propis i procedint de la manera anterior. Els pesos factorials elevats en l'últim vector propi indicaven quines variables eren colineals.

2.3.4 Anàlisi de Components Principals

L'anàlisi de components principals no només es va utilitzar per detectar multicolinealitat entre les variables per a les anàlisis de regressió múltiple sinó també per tal reduir la dimensió d'una matriu de dades amb la menor pèrdua d'informació possible. Les components principals es varen determinar a partir de la matriu de correlacions. Per a l'obtenció de les càrregues factorials de cadascuna de les variables originals dins de cada component principal es va utilitzar el mètode de rotació varimax. En qualsevol cas es varen utilitzar les dades log-transformades.

2.3.5 Anàlisi de l'autocorrelació espacial

Per a l'estudi de l'estructura espacial de la variabilitat de les dades d'emissió de N_2O i desnitrificació del sòl es varen utilitzat mètodes geoestadístics, a través del càlcul de semivariàncies. La semivariància [$\gamma_{(h)}$] dóna informació sobre la independència estadística de parells de dades els punts de mostreig dels quals estan separats per un interval representat pel vector *h*. Els semivariogrames s'han obtingut representant gràficament la semivariància per a diferents valors d'*h*.

$$\gamma_{(h)} = \frac{1}{2\,N(h)} \sum_{i=1}^{N(h)} [z(x_i) - z(x_i + h)]^2$$

on $N(h)$ és el nombre de parells de dades $z(x_i)$, $z(x_i+h)$ separats pel vector de distància h (lag h). S'ha treballat amb els valors de semivariància normalitzada, la qual s'obté dividint la semivariància per la variància de la mostra (S^2):

$$\gamma^*_{(h)} = \frac{\gamma_{(h)}}{S^2}$$

Si les dades s'ajustaven a una distribució de freqüències log-normal, el càlcul de la semivariància es realitzava utilitzant les dades log-transformades.

CAPÍTOL 3

Efecte de Diferents Pràctiques de Conreu sobre les Emissions de N_2O i la Desnitrificació en Sòls de Clima Mediterrani

Els objectius principals d'aquest capítol es centraven en l'estudi de les taxes d'emissió de N-gas (N_2O, N_2) a través dels processos de nitrificació i/o desnitrificació en sòls de conreu, tant *in situ* com al laboratori, amb la finalitat d'aportar informació sobre possibles estratègies de fertilització nitrogenada i altres pràctiques de conreu per tal de reduir aquestes emissions. Aquesta part del treball s'emmarcava dins del projecte Europeu STEP-NEMIS (Denitrification and N-emission from Different European Cultivation Systems and Different Soil Types) dut a terme durant els anys 1991-1994 en col.laboració amb altres països europeus (Alemanya, Anglaterra, Bèlgica, Dinamarca i França). Paral.lelament, es pretenia elaborar una base de dades que, a més, considerés aquells paràmetres tant climàtics com edàfics que poguessin actuar com a factors reguladors -directes o indirectes- dels processos implicats. La participació d'un conjunt de països amb característiques climatològiques i edàfiques diferencials va donar la possibilitat d'anar acotant de manera més global les condicions que estimulen les pèrdues de N-gas del sòl a l'atmosfera (Kaiser *et al.*, 1996).

La presència d'un grup de recerca ubicat en una zona de clima mediterrani era molt interessant donat que una de les principals característiques dels sòls de conreu d'aquesta àrea climàtica és el seu relativament baix contingut de matèria orgànica. A més, en aquesta zona l'aigua sol actuar com un dels factors limitants de major trascendència per al conreu durant un període en què l'estrés hídric pot tenir conseqüències molt negatives, de manera que el reg esdevé una pràctica freqüent. Des del punt de vista de l'activitat desnitrificant, aquesta necessitat d'aportació d'aigua en un període en què es donen temperatures favorables per a l'activitat microbiana els fa objecte d'estudi degut no només a l'increment del contingut hídric sinó també a l'elevat nombre de cicles humitejat-assecat que comporta la irrigació. L'increment en la disponibilitat de la matèria orgànica del sòl que pot implicar podria, d'alguna manera, compensar el seu baix contingut. A més, és freqüent que durant aquesta època el contingut de nitrats en el sòl sigui elevat degut a l'aplicació simultània d'adobs nitrogenats.

A partir d'aquí es varen definir com a objectius globals d'aquest capítol sobre emissions de N-gas en sòls de conreu de clima mediterrani:

a) estudiar l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg, i

b) estudiar l'efecte de diferents tipus i dosis d'adobs nitrogenats.

3.1 Efecte de la Dosi de Reg sobre les Emissions de N_2O i la Desnitrificació

En un ecosistema terrestre les pèrdues d'aigua del sòl a l'atmosfera a través dels processos de transpiració foliar i d'evaporació des de la superfície edàfica són considerables i inevitables. L'objectiu principal de la irrigació en camps de conreu és compensar aquestes pèrdues intentant mantenir el sòl o una fracció d'aquest en un estat d'humitat suficient perquè, amb un consum mínim d'energia, les arrels puguin proporcionar a l'arbre l'aigua i els nutrients necessaris per al correcte desenvolupament vegetatiu i de la collita en quantitat i qualitat, assegurant al mateix temps la longevitat de la plantació. En el cas del reg localitzat, l'ideal és mantenir aproximadament un 50 % del bulb d'humectació en unes condicions de percentatge hídric òptim (pressió d'absorció = 0.33 atm) de manera més o menys permanent.

Diferents autors han observat que el flux de formes gasoses de N del sòl cap a l'atmosfera s'incrementa després de l'aplicació d'aigua de reg als cultius (Hallmark i Terry, 1985; Mosier *et al.*, 1986; Rolston *et al.*, 1982; Ryden i Lund, 1980; Ryden *et al.*, 1979; Sextone *et al.*, 1985). Aquests pics d'emissió estan estimulats no només per l'increment del contingut hídric del sòl que comporta la irrigació sinó també per l'augment en el nombre de cicles humitejat-assecat del sòl els quals fonamentalment afavoreixen el trencament físic de les interaccions entre la matèria orgànica i la matriu mineral i incrementen la disponibilitat de C orgànic per als microorganismes heterotròfics (Bottner, 1985; Davidson, 1991; Groffman i Tiedje, 1989b; Smith i Patrick, 1983).

En la majoria de treballs científics en els què s'ha estudiat l'efecte de la irrigació sobre les taxes d'emissió de N_2O i/o desnitrificació s'han utilitzat tècniques de reg convencionals -reg a manta o per aspersió- i s'ha observat que el sistema emprat pot afectar amplament les pèrdues de N-gas (Hallmark i Terry, 1985; Mosier *et al.*, 1986; Nelson i Terry, 1996; Rolston *et al.*, 1982; Ryden i Lund, 1980; Ryden *et al.*, 1979; Sexstone *et al.*, 1985; Terry *et al.*, 1986). Tanmateix, no es té coneixement de cap estudi sobre l'efecte del reg localitzat d'alta freqüència sobre aquestes taxes. Les implicacions pel què fa a superfície regada que comporta aquest sistema de reg juntament amb l'objectiu de mantenir una part del sòl permanentment en condicions de potencial hídric òptim fan pensar que la taxa d'emissió de formes gasoses de N pot estar fortament modificada sobretot tenint en compte que normalment l'addició d'aigua va acompanyada d'una aportació d'adob nitrogenat i que amb aquest sistema de reg les pèrdues per drenatge són mínimes. A més, és probable que l'alternança dels cicles humitejat-assecat

amb aquest sistema de reg no tingui pràcticament efecte sobre la disponibilitat de matèria orgànica en el sòl degut a la poca variació en el contingut hídric que en principi s'ha de donar.

A partir d'aquí es va definir com a objectiu principal d'aquest estudi determinar l'efecte de l'aplicació d'aigua al sòl a través d'un sistema de reg localitzat sobre les pèrdues de N-gas en dues plantacions de pomera que diferien en l'edat de plantació. Tanmateix, i donat el desconeixement de la importància d'aquestes pèrdues en els sòls de conreu de la nostra àrea d'estudi, va semblar necessari prèviament determinar, d'una banda, la metodologia més adequada per assolir l'objectiu proposat; de l'altra, estudiar la variació temporal de les emissions de N-gas utilitzant la mateixa metodologia.

Per tant, els objectius d'aquesta part del treball es poden concretar en:

a) establir la metodologia més idònia per estudiar l'efecte de l'aplicació de diferents quantitats d'aigua al sòl a través d'un sistema de reg localitzat sobre les pèrdues de N-gas del sòl a l'atmosfera;

b) establir la dinàmica anual de l'activitat potencial desnitrificant en ambdós camps de pomera així com dels seus principals factors reguladors edàfics;

c) estudiar l'efecte de l'aplicació de diferents dosis d'aigua a través de reg localitzat sobre l'activitat potencial desnitrificant i sobre algunes de les característiques del medi edàfic directament o indirecta afectades per l'aplicació de reg.

Disseny experimental

L'estudi de l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg es va realitzar en dues plantacions de pomera que diferien en l'edat de plantació (adulta i jove) i, en les quals, l'addició d'aigua es feia per reg localitzat. En ambdues plantacions les tesis assajades varen ser: 75, 100 i 150 % de l'evapo-transpiració del conreu (ETc), amb un disseny experimental en blocs a l'atzar i amb tres repeticions per tractament. Cada parcel.la experimental constava de 3 fileres amb 8 arbres per filera en la plantació adulta i 6 en el camp de pomeres joves. Per a qualsevol assaig es varen mostrejar els 10 cm superficials dels bulbs d'humectació dels dos arbres centrals de la filera del mig. Per assolir els objectius proposats es va procedir de la següent manera:

a) Per a **la determinació de la metodologia més adequada** per estudiar l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre les emissions de N-gas es varen testar durant el període d'irrigació diferents mètodes d'incubació en ambdues plantacions:

   a. incubació dinàmica amb cambres inserides en el sòl (apartat 2.2.1.1.1.a)
   b. incubació de nuclis intactes de sòl al laboratori, en condicions estàtiques i dinàmiques (apartat 2.2.1.1.1.b)
   c. incubació de mostra alterada de sòl en condicions potencials (apartat 2.2.1.1.2.c)

   En les proves *in situ* i amb nuclis intactes de sòl les incubacions es varen realitzar amb i sense addició d'acetilè a l'atmosfera d'incubació.

b) Per a **l'estudi de la dinàmica anual de l'activitat potencial desnitrificant** es va extreure mensualment durant un any mostra alterada de sòl de cadascuna de les parcel.les experimentals corresponents a la dosi del 100 % de l'ETc en ambdues plantacions i es va determinar l'activitat potencial desnitrificant. Paral.lelament es va analitzar la variació temporal dels principals factors reguladors proximals de la desnitrificació: contingut hídric, de matèria orgànica i de N-mineral. Altres paràmetres edàfics tals com pH, nitrogen total i activitat biològica també es varen considerar per a una anàlisi més global.

c) Per a l'assaig de **l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant** es va recollir mostra de sòl de cadascuna de les diferents parcel.les experimentals d'ambdós camps en tres ocasions durant el període d'irrigació: juny, agost i setembre. Al mateix temps es va estudiar l'efecte del reg sobre els seus principals factors reguladors proximals: contingut hídric, de matèria orgànica i de nitrats. Altres paràmetres edàfics es varen considerar també per a una anàlisi més global: pH, contingut de nitrogen total, relació C/N i contingut d'amoni.

Per entendre millor el procés seguit durant la realització del treball, els resultats obtinguts dins de cada objectiu aniran seguits de la seva discussió.

3.1.1 Metodologia per a l'Estudi d'Emissions de N_2O i de la Taxa de Desnitrificació en Sòls de Conreu de Clima Mediterrani

3.1.1.1 Resultats

Per estudiar l'efecte de la dosi de reg sobre el flux d'emissió de N-gas del sòl a l'atmosfera es varen provar aquells mètodes d'incubació més freqüentment emprats per altres autors en sòls de conreu.

a. Incubació dinàmica amb cambres inserides en el sòl

Inicialment es va realitzar un assaig *in situ* durant un període d'irrigació utilitzant el mètode d'incubació amb cambres inserides en el sòl en condicions dinàmiques. Es varen col.locar dos cilindres de PVC amb antelació a l'aplicació d'aigua de reg a la zona del bulb d'humectació dels dos arbres centrals de la filera del mig de cadascuna de les parcel.les experimentals i es varen realitzar incubacions sense i amb acetilè cada mes durant el període d'irrigació. Els resultats obtinguts mostraven, d'una banda, uns baixos nivells d'emissió de N_2O els quals varen ser sempre inferiors al límit de detecció del mètode (25 g $N.ha^{-1}.d^{-1}$); de l'altra, una elevada variabilitat de les pèrdues per desnitrificació (N_2O+N_2) entre les repeticions d'un mateix tractament (Figura 3.1).

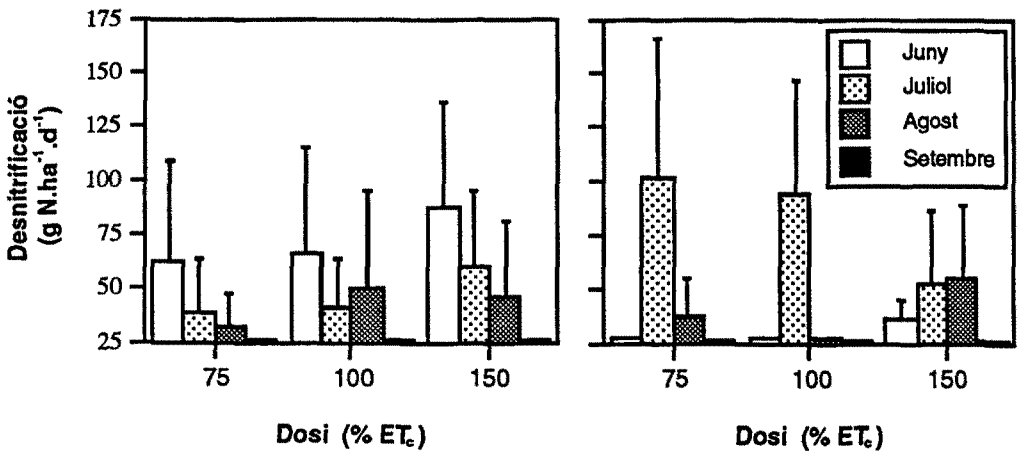

Figura 3.1 - Efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre la taxa desnitrificant durant el període de reg en dos camps de pomera. Esquerra: plantació adulta; dreta: plantació de pomeres joves. Les barres representen l'error estàndard (α=0.05).

L'anàlisi estadística de les dades d'emissions de N per desnitrificació (Taula 3.1) indicava que no hi havia un efecte significatiu ni de la dosi d'aigua aplicada ni de les característiques de cada plantació (factor camp) sobre les pèrdues de N-gas totals per desnitrificació. Per contra, es donava una variació significativa d'aquestes emissions durant el període d'irrigació (factor mes). La significació de la interacció entre els factors camp i mes indicava que la variació en la taxa de desnitrificació durant el període de reg era particular per a cadascuna de les plantacions. Els resultats obtinguts aplicant el test de separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) sobre les dades log-transformades per a cada plantació per separat mostrava que en el camp de pomeres adultes les taxes desnitrificants determinades al mes de juny eren significativament més elevades que les dels altres mesos mostrejats; les corresponents al juliol i a l'agost no diferien entre elles, mentre que les del mes de setembre eren les significativament inferiors. Per tant, en aquesta plantació sembla que es donava un disminució de la taxa durant el període de reg.

En la plantació jove es detectava una interacció significativa entre mes i dosi de reg ja que si bé en les dues tesis de reg inferiors (75 % i 100 % de l'ETc) les taxes de desnitrificació del mes de juliol eren significativament més elevades que les de la resta de mesos -entre els quals no es donaven diferències significatives- en la dosi del 150 % de l'ETc la taxa desnitrificant no variava durant el període d'irrigació.

Taula 3.1 - Efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg (factor dosi) sobre la taxa de desnitrificació durant el període d'irrigació (factor mes) en dues plantacions de pomera que difereixen en l'edat de plantació (factor camp). Resultats de l'ANOVA aplicada sobre les dades log-transformades.

Font de variació	*gl*	*F*	*P>F*
Model	23	6.26	0.0001
Error	120		
C total	143		

Font de variació	*gl*	*F*	*P>F*
Camp	1	0.96	0.3302
Mes	3	13.51	0.0001
Dosi	2	1.69	0.1880
Camp*Mes	3	14.74	0.0001
Camp*Dosi	2	1.75	0.1789
Mes*Dosi	6	1.28	0.2716
Camp*Mes*Dosi	6	2.27	0.0415

D'altra banda, i malgrat la manca de significació des del punt de vista estadístic, es va observar que en la plantació adulta el valor mig de la taxa desnitrificant tenia una tendència a anar

incrementant amb la dosi aplicada en els diferents mesos; per contra, en la plantació jove no s'observava cap relació clara entre ambdues variables.

b. Incubació de nuclis intactes de sòl al laboratori

En vistes dels resultats que s'anaven obtenint i donada la dificultat de controlar algunes variables en el camp, paral.lelament es varen incubar al laboratori nuclis intactes de sòl corresponents a les diferents parcel.les experimentals de les dosis de reg assajades en ambdues plantacions de pomera. La incubació es realitzava en condicions estàtiques i a la temperatura mitjana del mes de mostreig durant 24 h, en absència i presència d'acetilè. Utilitzant aquesta tècnica es produeix una alteració mínima de l'estructura, i permetia realitzar totes les incubacions en les mateixes condicions. Tot i que es varen recollir mostres en diferents moments durant el període d'irrigació, els nivells d'emissió tant sense com amb acetilè varen ser sempre inferiors al límit de detecció del mètode (85 ng $N.g^{-1}.d^{-1}$).

Per contra, algunes proves realitzades en condicions de recirculació indicaven que els nivells d'emissió de N-gas eren detectables tant en presència com absència d'acetilè. Amb aquest mètode el límit de detecció es trobava al voltant dels 30 ng $N.g^{-1}.d^{-1}$. En una de les proves en què es varen incubar 9 nuclis de mostra intacta recollits a les parcel.les experimentals de la plantació jove corresponents a l'aplicació del 100 % de l'ETc es va obtenir una taxa mitjana d'emissió de N_2O de 52 ng $N.g^{-1}.d^{-1}$ i de desnitrificació de 221 ng $N.g^{-1}.d^{-1}$, amb un coeficient de variació del 55 % i del 211 %, respectivament. En altres mostrejos, el grau de variació obtingut va ser similar i, en qualsevol cas, era degut a la presència d'algun nucli amb una intensa activitat. Aquesta gran variabilitat era un *handicap* important donat que indicava que calia realitzar un mostreig més exhaustiu. Per diferents motius que es comenten a la discussió es va desestimar continuar fent proves amb aquest mètode.

c. Incubació de mostra alterada de sòl en condicions potencials

En aquest cas el mètode d'incubació es basava en l'optimització de les condicions per tal de permetre l'expressió de la totalitat dels enzims desnitrificants presents en la mostra de sòl incubada. Inicialment es va realitzar una prova amb mostres de sòl de les diferents tesis de reg

assajades en la plantació de pomeres joves. Cada mostra era una barreja de tres submostres corresponents a les tres parcel.les de repetició de cada tesi.

En aquesta prova, les mostres es varen incubar sota 3 diferents graus de potencialitat. En el tractament més senzill se li afegia a la mostra de sòl una solució que contenia únicament cloramfenicol (1 $g.L^{-1}$), un agent bacteriostàtic d'ample espectre que actua unint-se als ribosomes i evita la síntesi *de novo* d'enzims desnitrificants; en el segon, aquesta solució presentava, a més, una concentració determinada de nitrats (1 mM), mentre que en el darrer tractament se li afegia també glucosa (1 mM). L'activitat desnitrificant en les diferents condicions d'incubació es va determinar per triplicat i de cadascuna de les corbes d'incubació es va calcular el pendent màxim (Figura 3.2).

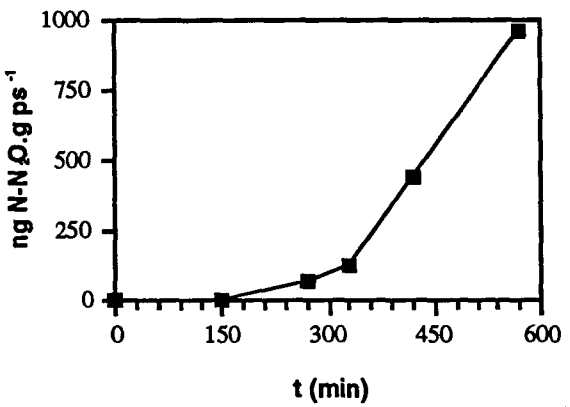

Figura 3.2 - Exemple de l'evolució en l'emissió de N_2O durant el període d'incubació

Tenint en compte que totes les incubacions es realitzaven en presència d'acetilè, en el cas dels dos primers tractaments (anaerobiosi, anaerobiosi + nitrats) el valor del pendent màxim corresponia al màxim grau d'expressió dels enzims presents en aquelles condicions d'incubació; en el tercer (anaerobiosi + nitrats + glucosa), el valor obtingut era una mesura indirecta de la concentració total d'enzims desnitrificants presents en el sòl en el moment de prendre la mostra. Aquest darrer valor es corresponia amb la taxa de la primera fase lineal (Fase I) observada una vegada s'han establert condicions anaeròbiques en sòls aerobis (Smith i Tiedje, 1979; Tiedje i Smith, 1989).

Els resultats obtinguts en aquestes condicions d'incubació mostraven que es donava una clara relació lineal entre la dosi de reg aplicada i l'activitat potencial desnitrificant (Figura 3.3).

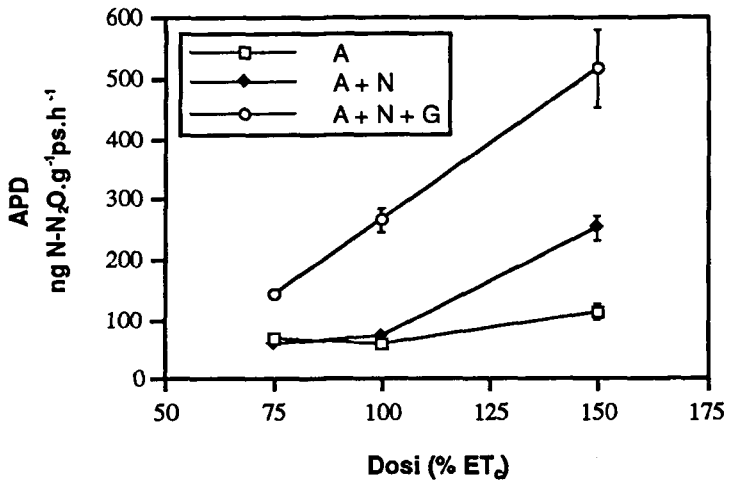

Figura 3.3 - Efecte de les diferents condicions d'incubació sobre l'expressió dels enzims desnitrificants en mostres de sòl corresponents a diferents tractaments de reg (A: anaerobiosi; N: nitrats; G: glucosa). Les barres indiquen la variabilitat entre rèpliques analítiques.

En vistes d'aquests resultats es va realitzar una segona prova determinant l'activitat potencial desnitrificant seguint el disseny en blocs a l'atzar dels diferents tractaments aplicats en els dos camps experimentals. En aquest cas, les incubacions es varen realitzar exclusivament en condicions de potencialitat màxima.

L'anàlisi estadística de les dades considerant els factors camp i dosi de reg indicava que les diferències entre ambdues plantacions eren molt significatives ($P<0.001$) i que el factor camp explicava el 57 % de la variabilitat de les dades. Els valors d'activitat potencial desnitrificant corresponents a la plantació de pomeres adultes eren aproximadament un ordre de magnitud superiors als de la plantació jove (Figura 3.4).

Per contra, no es va observar un efecte de la dosi aplicada sobre l'activitat potencial desnitrificant ($P>0.1$). Tanmateix, i malgrat que la interacció entre ambdós factors no era significativa ($P>0.1$), es va observar un comportament diferencial entre les dues plantacions; mentre que en el camp de pomeres joves la relació entre la dosi de reg aplicada i l'activitat potencial desnitrificant mitjana era més aviat lineal (Figura 3.4) amb un pendent molt similar a l'obtingut en la prova anterior i amb valors del mateix ordre, en la plantació adulta l'activitat potencial mitjana obtinguda per a les diferents tesis assajades no variava amb la dosi aplicada; en aquest cas la variabilitat entre repeticions era molt gran.

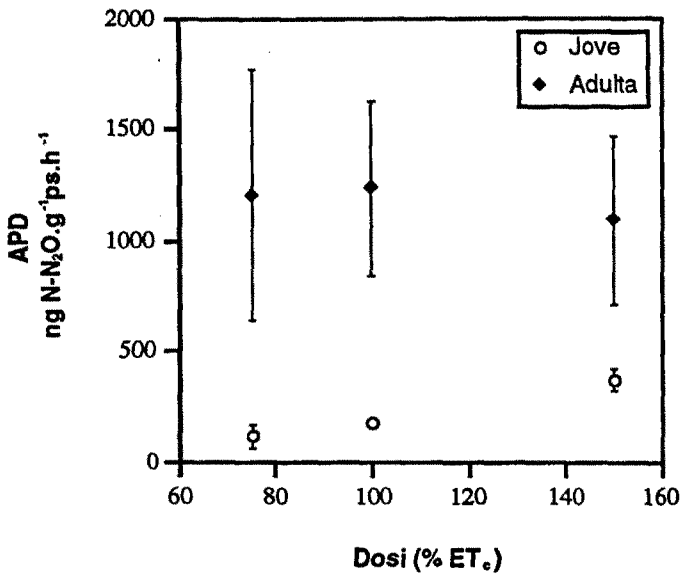

Figura 3.4 - Efecte de la dosi de reg aplicada sobre el valor mig d'activitat potencial desnitrificant en mostres de sòl recollides en les dues plantacions de pomeres. Les barres representen l'error estàndard.

3.1.1.2 Discussió

a. Incubació dinàmica amb cambres inserides en el sòl

En principi, els mètodes d'incubació *in situ* es consideren els més adequats ja que mantenen l'estructura del sòl, el trencament de la qual pot afectar considerablement les pèrdues de N-gas cap a l'atmosfera. Aquesta alteració de l'estructura tant pot estimular la desnitrificació degut a l'augment en la disponibilitat de C que comporta com disminuir-la degut a la major exposició a l'oxigen de microzones potencialment desnitrificants, sobretot en els sòls arenosos (Myrold i Tiedje, 1985; Parkin i Tiedje, 1984; Sexstone *et al.*, 1988). A més, permeten mesurar fluxos actuals de N-gas en les condicions de camp. Tanmateix, els resultats d'aquest estudi no varen ser massa satisfactoris.

D'una banda, els nivells d'emissió de N_2O eren indetectables. Cal dir, però, que la sensibilitat del mètode era baixa si es compara amb la d'altres autors (1 g $N.ha^{-1}.d^{-1}$) utilitzant un mètode d'incubació similar (Duxbury, 1986). En aquest primer assaig la quantificació de la taxa d'emissió de N_2O per cromatografia de gasos no es feia en unes condicions ben optimitzades. En aquest sentit, inicialment es va utilitzar N_2 com a gas portador amb un flux total a nivell de detector de 80 $mL.min^{-1}$. La utilització en posteriors assajos d'Ar (95 %) + CH_4 (5 %) i la disminució del flux de gas a nivell de detector a 60 $mL.min^{-1}$ va incrementar considerablement la seva sensibilitat essent del mateix ordre que la mencionada anteriorment.

Els resultats obtinguts en aquest estudi també posaven de manifest la dificultat real de treballar amb un sistema espacialment heterogeni. Tot i que la capa superficial dels sòls de conreu es considera que és relativament homogènia, per a la taxa de desnitrificació són freqüents coeficients de variació entre el 50 i el 100 % (Mosier i Hutchinson, 1981). Aquesta gran variabilitat espacial en les taxes d'emissió de N-gas és, sens dubte, el problema més gran quan s'utilitzen tècniques amb cambres *in situ* ja que dificulta enormement l'obtenció de resultats concloents.

Es va pensar que augmentant el nombre de repeticions per tractament no es resoldria el problema ja que una part de la variabilitat detectada dins de cadascun d'ells podia ser degut al fet de no poder realitzar totes les incubacions de manera simultània. Els dos condicionants principals eren, d'una banda, la variació diürna de la temperatura del sòl, la qual controla fortament la taxa desnitrificant així com la solubilitat i difusió dels gasos emesos. Diferents autors han observat una estreta correlació entre taxa d'emissió de N_2O i/o desnitrificació, i temperatura

del sòl (Blackmer *et al.*, 1982; De Klein i Van Logtestijn, 1996; Mosier, 1989). Duxbury *et al.* (1982) troben coeficients de variació diaris del flux de N_2O d'entre el 0 i el 224 %. Això suposava un impediment important a l'hora d'intentar obtenir condicions d'incubació comparables.

D'altra banda, la natura episòdica de les emissions de N-gas després de l'aplicació d'aigua de reg també era un *handicap* important. En el nostre estudi, les incubacions es realitzaven entre les 14-22 h després de l'addició d'aigua a través d'un sistema de reg localitzat, el qual s'efectuava al capvespre. La diferent granulometria d'ambdues plantacions de pomera dificultava encara més la comparació dels efectes del reg sobre les pèrdues de N-gas ja que el pic de màxima emissió després de l'aplicació d'aigua està fortament afectat per la textura del sòl, de manera que es requereixen temps molt més curts en sòls lleugers que en sòls de textura pesada (Nelson i Terry, 1996; Sexstone *et al.*, 1985; Terry *et al.*, 1986).

Finalment, en el nostre estudi les pèrdues de N-gas a través del procés desnitrificant segurament estaven subestimades; la forta olor d'acetilè que es desprenia durant el desenvolupament dels sedassos moleculars indicava que aquest compost podria haver interferit en la retenció del N_2O emès. A més, s'ha de tenir en compte que la difusió de l'acetilè fins als llocs potencialment desnitrificants està fortament afectada per la textura del sòl i el seu grau d'humitat (Ryden *et al.*, 1979). Donada la granulometria més fina del camp de pomeres adultes i el seu major contingut hídric és probable que la utilització dels mateixos temps per a la redistribució de l'acetilè dins del perfil edàfic comportés una subestimació en aquella plantació.

b. Incubació al laboratori de nuclis intactes de sòl

Els mètodes d'incubació amb nuclis intactes de sòl també preserven la seva estructura. Els seus principals avantatges respecte als mètodes amb cambres inserides *in situ* radiquen en el fet de què tots els nuclis es poden incubar en les mateixes condicions i durant períodes més llargs. En els nostre estudi, la no detecció d'emissions en forma de N_2O ni de pèrdues per desnitrificació en condicions estàtiques en cap de les proves realitzades podia parcialment ser degut a la limitació en la difusió de les formes de N-gas cap a l'atmosfera d'incubació i de l'acetilè fins als punts d'activitat desnitrificant en aquestes condicions d'incubació (Tiedje *et al.*, 1989). En aquest sentit, l'homogeneïtzació de l'atmosfera interna quan els nuclis intactes de sòl s'incubaven en condicions de recirculació (dinàmica) segurament contribuïa fortament a detectar les pèrdues de N-gas. Tanmateix, la diferent sensibilitat dels mètodes en funció del tipus d'incubació, estàtica i dinàmica, també era deguda a les diferències en el volum lliure de la cambra d'incubació. En el cas d'incubar estàticament els nuclis aquest era considerablement

superior (aproximadament 850 mL) si es compara al d'una incubació dinàmica (aproximadament 300 mL).

Tot i que amb el sistema d'incubació amb recirculació es podien determinar tant les emissions de N_2O com les pèrdues de N-gas per desnitrificació, l'elevada variabilitat detectada indicava que calia mostrejar un nombre considerable de nuclis. D'entrada, el requeriment d'una infrastructura considerable no disponible en aquell moment va fer desestimar la idea de realitzar l'assaig amb aquest mètode. Tanmateix, per ambdós tipus d'incubació la principal limitació era deguda a la relativament reduïda superfície mostrejable tenint en compte el sistema de reg utilitzat, la qual cosa feia inviable un mostreig més exhaustiu.

En general, però, assajos al laboratori amb nuclis intactes de sòl afegint aigua a l'inici de la incubació per simular el reg poden ser útils ja que és més fàcil controlar la dinàmica particular de cada sòl. En aquest sentit, Sexstone *et al.* (1985) havien observat que en incubar nuclis intactes de sòl en el laboratori el pic màxim de desnitrificació s'assolia durant les dues primeres hores després de l'addició d'aigua en un sòls de textura lleugera, retornat als valors inicials al cap de 12 h, mentre que en sòls més pesats es requerien 12 h per assolir el valor màxim i entre 48 i 60 h per recuperar els nivells inicials. Per tant, el diferent temps requerit per a què es doni el pic de màxima emissió després de l'addició d'aigua al sòl, juntament amb la diferent durada del període en què les taxes d'emissió es mantenen elevades, poden afectar fortament els resultats obtinguts. En qualsevol cas, però, s'ha de tenir present que els resultats obtinguts també s'han de saber interpretar, donat que no permeten considerar la variació en l'activitat natural de les plantes (p.e.: exsudació i absorció d'aigua pel sistema radicular, competència pels nitrats), la qual pot afectar considerablement les taxes d'emissió de N-gas. D'altra banda, només es mostreja una part del perfil edàfic i l'extracció dels nuclis pot comportar un augment de la disponibilitat de C orgànic si es produeixen trencament del sistema radicular.

c. Incubació de mostra alterada de sòl en condicions potencials

Tenint en compte que entendre la regulació en les emissions de N_2O comporta prèviament aprofundir en la regulació dels processos implicats i donada la persistència dels enzims desnitrificants en el sòl (Firestone i Davidson, 1989; Groffman, 1987; Peterjohn, 1991; Smith i Parsons, 1985), es va pensar en la possibilitat de determinar l'activitat potencial desnitrificant del sòl en el moment de la recollida de mostra (Smith i Tiedje, 1979). Tot i ser conscients de que es tractava d'una determinació totalment potencial, es va considerar que era un paràmetre important donat que, d'una banda, resumia la història mediambiental prèvia i, de l'altra, donava informació sobre la resposta del sòl en aquell moment en el cas d'una situació de potencialitat

màxima en la que l'únic factor limitant fos la presència d'enzims desnitrificants. En aquest sentit, diferents investigadors mantenen que l'activació-inactivació dels enzims desnitrificants pre-existents en el sòl per part de l'O_2 juga un paper rellevant en els esdeveniments de desnitrificació puntuals (Martin *et al.*, 1988; Parsons *et al.*, 1991; Smith i Parsons, 1985), de manera que la participació d'aquests enzims pot ser molt més important que el creixement microbià o la síntesi de nous enzims desnitrificants.

El patró d'emissió obtingut en les diferents incubacions realitzades diferia substancialment de l'observat per Smith i Tiedje (1979) seguint més aviat una cinètica de tipus exponencial i no lineal; el període que en el nostre assaig semblava ser necessari per a l'expressió de l'activitat de tots els enzims desnitrificants presents en la mostra en el moment de la seva recollida es corresponia més aviat amb el temps necessari per a la síntesi *de novo* de les NO_3 i NO_2-reductases determinat per aquells autors. Normalment es recomana un període d'incubació de 1h i, en tot cas, que no sigui superior a 2h, tot i que en la bibliografia estan descrites durades des de 1 fins a 8 h (Limmer i Steele, 1982; Martin *et al.*, 1988; Smith i Tiedje, 1979). En aquest sentit, diferents autors (Limmer i Steele, 1982; Smith i Tiedje, 1979) havien observat que l'efecte del cloramfenicol es mantenia encara 8 h després de l'inici de la incubació en sòls de textura més pesada i un major contingut de matèria orgànica que els utilitzats en aquest estudi. Per tant, la Fase I determinada per Smith i Tiedje (1979) es correspondria amb el pendent màxim de la nostra corba exponencial.

Aquest tipus de cinètica sorprenia ja que les mostres incubades estaven sotmeses a l'aplicació diària de reg de manera que era difícil pensar en una poca adaptació de la població microbiana a condicions d'anaerobiosi. A més, les condicions d'agitació en les què es determinava l'activitat potencial desnitrificant suprimien les dificultats de difusió dels substrats. En qualsevol cas, podia ser conseqüència del tipus de comportament enzimàtic definit per als enzims desnitrificants (Van Cleemput *et al.*, 1988). La relació inversa observada en el nostre estudi entre activitat potencial desnitrificant i temps requerit per a l'expressió dels enzims (no mostrada) concorda amb això. Dins aquest context, és important remarcar que actualment s'ha observat que el cloramfenicol és un producte actiu que pot inhibir l'activitat dels enzims desnitrificants i que el grau d'inhibició depèn tant de la concentració de cloramfenicol utilitzada com de la sensibilitat de les espècies desnitrificants a aquest compost (Brooks *et al.*, 1992; Dendooven i Anderson, 1994; Dendooven *et al.*, 1994a; Pell *et al.*, 1996; Wu i Knowles, 1995). Dendooven *et al.* (1994a) han observat que es forma nitrit com a producte de degradació del cloramfenicol i que la concentració de nitrit augmenta en incrementar la concentració de cloramfenicol. Una concentració de cloramfenicol de 150 $mg.kg^{-1}$ de sòl inhibeix la síntesi proteica sense una substancial acumulació de nitrits durant una incubació de 48 h a 25 °C (Dendooven *et al.*,

1994a). En el nostre estudi la concentració efectiva de cloramfenicol utilitzada era de 1000 $mg.kg^{-1}$ de sòl sec. Hi ha qui recomana treballar sense cloramfenicol durant un període tal que s'asseguri que no hi ha síntesi de nous enzims (Luo *et al.*, 1996).

D'altra banda, es va observar que l'addició de nitrats només mostrava un cert efecte respecte al control (anaerobiosi) en les mostres en les què s'aplicava una quantitat d'aigua de reg equivalent al 150 % de l'ETc; per contra, l'aplicació conjunta de nitrats i glucosa comportava un augment de les pèrdues de N-gas respecte al control per a qualsevol de les tesis de reg assajades. Això indicava que el contingut de matèria orgànica fàcilment oxidable del sòl era un factor més important que els nitrats controlant l'activitat dels enzims presents en el sòl en aquestes mostres. D'aquí que es modifiqués lleugerament la metodologia proposada per Smith i Tiedje (1979) i s'augmentés la concentració de glucosa afegida en assajos posteriors. Altres autors, especialment si treballen amb mostres de sòls que presenten continguts baixos de matèria orgànica, també incrementen l'aportació de C (Dendooven i Anderson, 1995; Smith i Parsons, 1985).

L'efecte limitant dels nitrats a la dosi de reg més gran (150 % de l'ETc) podia anar lligada al major potencial desnitrificant de les mostres corresponents a aquesta tesi.

La bona relació lineal obtinguda en les proves prèvies amb les mostres corresponents a la plantació de pomeres joves entre activitat potencial desnitrificant i dosi de reg aplicada, i tenint en compte que en la plantació adulta s'havia aplicat reg a manta durant els 15 anys precedents i que durant aquest primer període de mostreig tot just s'estaven posant a punt les instal.lacions per a l'aplicació de reg localitzat, permetien considerar l'activitat potencial desnitrificant com un paràmetre adequat per a estudiar els efectes de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre la taxa desnitrificant. Altres autors ja havien recomanat un assaig d'aquest tipus quan l'objectiu era estudiar l'efecte de diferents tractaments experimentals sobre la desnitrificació ja que, entre d'altres coses, es redueix considerablement la variabilitat entre repeticions en eliminar els factors limitants de l'expressió enzimàtica (Groffman, 1985; Sexstone *et al.*, 1988; Tiedje *et al.*, 1989).

3.1.2 Dinàmica Anual de l'Activitat Potencial Desnitrificant i dels seus Principals Factors Reguladors

3.1.2.1 Resultats

Per tal de poder relativitzar els possibles efectes de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant es va realitzar un seguiment de la fluctuació anual d'aquest procés microbiològic en les dues plantacions de pomera, jove i adulta, en les quals es duria a terme l'estudi de l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant. En aquest estudi, el disseny experimental era en blocs a l'atzar amb tres repeticions per dosi assajada. Tanmateix, per estudiar la dinàmica anual de l'activitat potencial desnitrificant només es varen mostrejar les parcel.les experimentals corresponents a la tesi del 100 % de l'ETc. Paral.lelament, es va determinar la variació temporal d'alguns dels seus principals factors reguladors (continguts d'aigua i de matèria orgànica, relació C/N, continguts de nitrats i amoni, i activitat biològica del sòl). El pH de la solució del sòl i el nitrogen total també varen ser considerats per a una anàlisi més global de les dades.

Taula 3.2 - Estadística descriptiva dels paràmetres edàfics mesurats mensualment durant un any: a) plantació de pomeres joves i b) plantació adulta. APD: activitat potencial desnitrificant; CHS: contingut hídric del sòl; MO: matèria orgànica; Nt: nitrogen total; C/N: relació C/N.

a)

Paràmetre	Unitats	$\bar{x}$	Desviació estàndard	CV (%)	Màx.	Mín.
APD	ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}ps.h^{-1}$	64.7	34.8	53.8	201.6	7.3
pH		7.9	0.17	2.1	8.3	7.5
CHS	%	11.0	5.53	50.2	22.7	2.7
MO	%	1.7	0.37	21.6	2.8	1.1
Nt	%	0.13	0.016	12.1	0.18	0.11
C/N		7.5	1.53	20.4	13.5	5.3
$N\text{-}NO_3^-$	ppm	15.1	13.95	92.3	58.6	0.5
$N\text{-}NH_4^+$	ppm	9.7	4.52	46.5	18.8	1.7
Activitat biològica	mg $CO_2.100\ g^{-1}.d^{-1}$	6.7	1.66	24.9	9.8	3.5

b)

Paràmetre	Unitats	$\bar{x}$	Desviació estàndard	CV (%)	Màx.	Mín.
APD	ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}ps.h^{-1}$	357.6	278.2	77.8	1180.5	37.8
pH		7.9	0.17	2.2	8.2	7.6
CHS	%	21.5	6.13	28.5	33.2	11.0
MO	%	2.5	0.59	23.4	4.2	1.5
Nt	%	0.17	0.024	14.2	0.23	0.13
C/N		8.5	1.46	17.1	11.7	6.0
$N\text{-}NO_3^-$	ppm	7.5	6.80	90.2	37.2	1.1
$N\text{-}NH_4^+$	ppm	11.0	5.85	53.3	23.4	3.7
Activitat biològica	mg $CO_2.100\ g^{-1}.d^{-1}$	8.8	2.49	28.2	13.6	3.9

A la Taula 3.2 es pot observar que la plantació jove es caracteritzava per presentar un valor mig de tots els paràmetres mesurats inferior al del camp de pomeres adultes, excepte pel contingut de nitrats i el pH. En general, els coeficients de variació de les diferents variables edàfiques determinades eren similars entre ambdós camps; només en el cas del contingut hídric el valor d'aquest estadístic era considerablement superior en la plantació jove.

3.1.2.1.1 Variabilitat temporal de l'activitat potencial desnitrificant

L'estudi de la dinàmica anual es va realitzar a partir d'un disseny bifactorial que considerava els factors camp i mes de mostreig. L'anàlisi estadística de les dades va mostrar que aquest paràmetre no variava significativament al llarg de l'any (P>0.05). Per contra, es donaven diferències molt significatives entre ambdues plantacions (P<0.001); el factor camp explicava el 52 % de la variabilitat de les dades. La significació de la interacció entre camp i mes de mostreig (P<0.05) indicava que l'activitat potencial desnitrificant presentava una dinàmica particular en cadascuna de les dues plantacions. Aquest comportament diferencial queda clarament reflexat en la Figura 3.5.

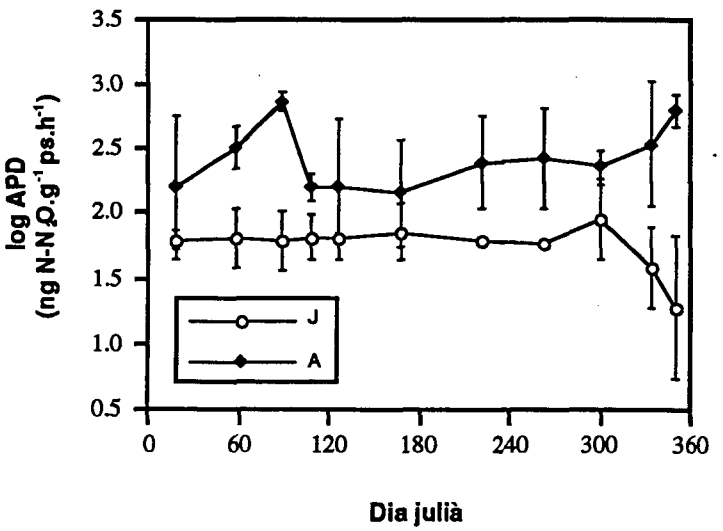

Figura 3.5 - Variació de l'activitat potencial desnitrificant (APD) al llarg de l'any en cadascuna de les dues plantacions de pomera. Les barres corresponen a la variació obtinguda entre les mesures de les diferents parcel.les de repetició.

En la plantació de pomeres joves l'activitat potencial desnitrificant es mantenia relativament constant al llarg de l'any i només a la tardor hi havia una tendència a disminuir. En el camp de

pomeres adultes s'intuïa una certa estacionalitat amb dos pics d'activitat màxima: un a finals d'hivern-principis de primavera, i l'altre a la tardor. Malgrat que l'anàlisi estadística de les dades de cada camp per separat tampoc va posar de manifest una variació significativa d'aquest procés al llarg de l'any en cap de les dues plantacions (P>0.05 en qualsevol d'elles), l'aplicació de tests de contrast d'hipòtesis va mostrar que hi havia diferències significatives entre mesures puntuals en ambdues plantacions. D'una banda, la disminució de l'activitat potencial desnitrificant mitjana de l'octubre (107 ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}.h^{-1}$) al desembre (32 ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}.h^{-1}$) observada en el camp de pomeres joves era significativa (P<0.01). De l'altra, en la plantació adulta l'activitat potencial desnitrificant mitjana del mes de març (739 ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}.h^{-1}$) era significativament (P<0.05) més gran que la dels mesos de gener (260 ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}.h^{-1}$) i abril (224 ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}.h^{-1}$); la diferència en el l'activitat dels enzims desnitrificants entre aquest darrer i el mes de desembre (629 ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}.h^{-1}$) també era significativa (P<0.05).

3.1.2.1.2 Variabilitat temporal d'alguns paràmetres edàfics relacionats amb la desnitrificació

Degut a les diferències en les característiques del sòl de les plantacions experimentals mostrejades, malgrat estar situats en una zona molt propera i haver-se desenvolupat sobre un mateix material originari i sota les mateixes condicions climàtiques (Taules 3.2), i a la diferent pauta de variació al llarg de l'any de l'activitat potencial desnitrificant que presentava cadascuna d'elles, es va analitzar la dinàmica anual dels principals factors reguladors edàfics de la desnitrificació per a cada plantació per separat. Els factors considerats varen ser: contingut hídric, de matèria orgànica, relació C/N i contingut de N-mineral del sòl (nitrats i amoni). També es va determinar la variació durant el període de mostreig de l'activitat biològica del sòl. Per a l'anàlisi estadística de les dades es va considerar l'efecte de la parcel.la de repetició, malgrat que no es mostri explícitament.

a. En la plantació de pomeres joves

Variabilitat temporal del contingut d'aigua del sòl

El contingut d'aigua del sòl en la plantació jove variava de manera significativa al llarg de l'any (P<0.001). Les mostres corresponents als mesos d'octubre, novembre i desembre eren significativament més humides que les de la resta de mesos mostrejats, a excepció de les corresponents al mostreig del mes de gener. Al mes de setembre es donaven els valors de

contingut hídric significativament més baixos de tot el període de recollida de mostres (Taula 3.3).

Taula 3.3 - Contingut hídric del sòl (CHS) de la plantació de pomeres joves en funció del mes de mostreig.

Mes	CHS (%)*
Octubre	21.1 a
Novembre	18.3 a
Desembre	16.6 a
Gener	14.0 ab
Maig	9.7 bc
Agost	8.9 c
Març	7.8 c
Febrer	7.2 c
Abril	7.0 c
Juny	7.0 c
Setembre	3.6 d

(*) Mitjanes seguides per la mateixa lletra no difereixen significativament segons el test de separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) utilitzant les dades log-transformades.

La representació gràfica de la fluctuació del contingut hídric del sòl en aquesta plantació juntament amb la variació de l'activitat potencial desnitrificant durant el mateix període (Figura 3.6) mostra que era precisament a la tardor quan es donaven no només els valors més baixos d'activitat potencial desnitrificant sinó també una major variabilitat entre repeticions. Per contra, a l'estiu quan els continguts d'aigua en el sòl eren inferiors malgrat l'aplicació de reg, la variabilitat entre repeticions anava disminuint.

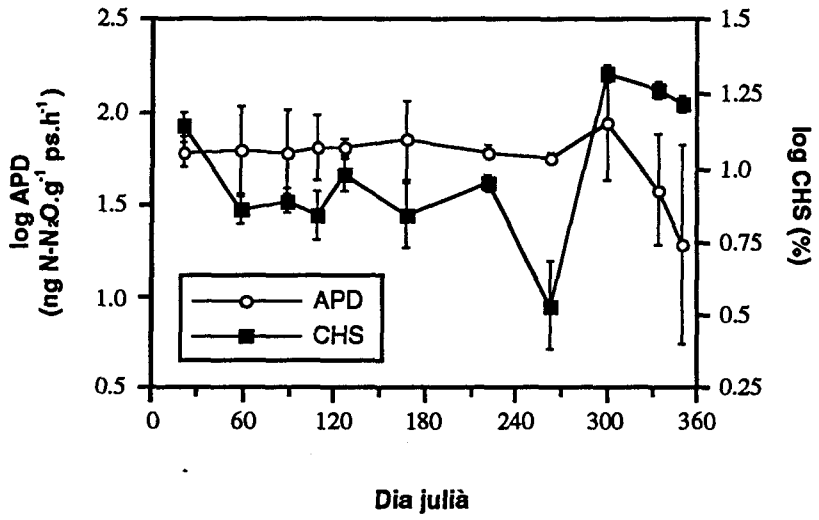

Figura 3.6 - Relació entre l'activitat potencial desnitrificant (APD) i el contingut hídric del sòl (CHS) en la plantació de pomeres joves. Les barres corresponen a la variació obtinguda entre les mesures de les diferents parcel.les de repetició.

Variabilitat temporal del contingut de matèria orgànica i de la relació C/N

Es va observar que en la plantació de pomeres joves el contingut de matèria orgànica del sòl variava significativament durant el període de mostreig ($P<0.05$). El contingut del mes d'octubre era significativament més elevat que el dels mesos d'abril i novembre. La resta de mesos no diferien significativament de cap dels dos grups anteriors (Taula 3.4).

Taula 3.4 - Contingut de matèria orgànica del sòl (MO) de la plantació de pomeres joves en funció del mes de mostreig.

Mes	MO (%)*
Octubre	2.2 a
Setembre	1.9 ab
Maig	1.9 ab
Gener	1.8 ab
Desembre	1.7 ab
Agost	1.7 ab
Març	1.6 ab
Febrer	1.5 ab
Juny	1.5 ab
Novembre	1.4 b
Abril	1.4 b

(*) Mitjanes seguides per la mateixa lletra no diferexen significativament segons el test de separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) utilitzant les dades log-transformades.

La davallada en el contingut de matèria orgànica del sòl a la tardor anava lligada a una disminució en l'activitat potencial desnitrificant (Figura 3.7).

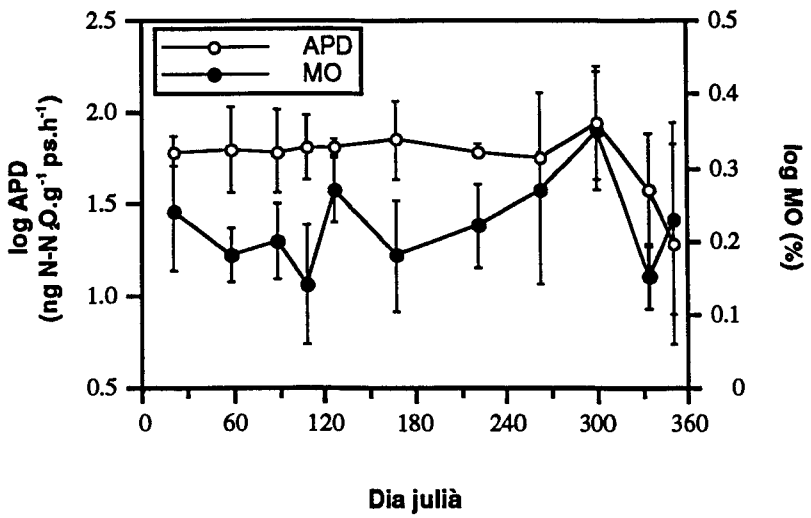

Figura 3.7 - Variació temporal del contingut de matèria orgànica (MO) en la plantació de pomeres joves. Relació amb l'activitat potencial desnitrificant del sòl en el moment de prendre la mostra (APD). Les barres corresponen a la variació obtinguda entre les mesures de les diferents parcel.les de repetició.

La relació C/N de la matèria orgànica del sòl variava significativament al llarg de l'any ($P<0.01$). Les mostres del mes d'octubre presentaven el valor d'aquesta relació significativament més elevat. Excepte el mes de setembre, la resta de mesos mostrejats formaven part del mateix grup estadístic (Taula 3.5).

Taula 3.5 - Valor de la relació C/N de la matèria orgànica del sòl de la plantació de pomeres joves en funció del mes de mostreig.

Mes	Relació C/N*	
Octubre	10.9	a
Setembre	8.3	ab
Maig	7.6	b
Febrer	7.4	b
Agost	7.2	b
Març	7.2	b
Desembre	7.0	b
Juny	7.0	b
Novembre	6.9	b
Gener	6.8	b
Abril	6.1	b

(*) Mitjanes seguides per la mateixa lletra no difereixen significativament segons el test de separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) utilitzant les dades log-transformades.

En aquesta plantació es donava un clar paral.lelisme entre la quantitat i la qualitat de la matèria orgànica (Figura 3.8). La relació C/N és un índex qualitatiu de la matèria orgànica del sòl.

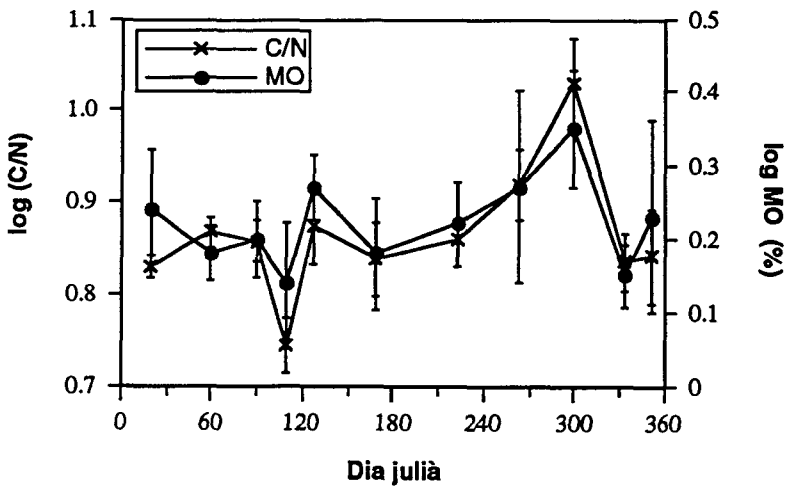

Figura 3.8 - Evolució del contingut de matèria orgànica i de la relació C/N al llarg de l'any en la plantació de pomeres joves. Les barres corresponen a la variació obtinguda entre les mesures de les diferents parcel.les de repetició.

Variabilitat temporal del contingut de nitrat i amoni

El contingut de nitrats de les mostres recollides en la plantació de pomeres joves variava significativament durant el període de mostreig ($P<0.001$). La variació en el contingut d'amoni durant aquest període també era significativa ($P<0.001$). Tanmateix, ambdós paràmetres seguien comportaments diferents al llarg de l'any (Figura 3.9). En cap cas s'establia un paral.lelisme amb l'activitat potencial desnitrificant del sòl.

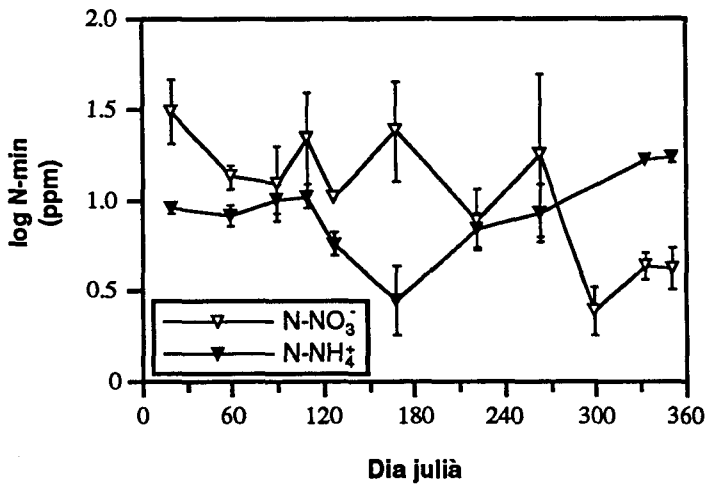

Figura 3.9 - Variació mensual del contingut de nitrats i amoni en la plantació de pomeres joves. Les barres corresponen a la variació obtinguda entre les mesures de les diferents parcel.les de repetició.

El contingut de nitrats no va seguir una pauta de variació massa clara durant el període de mostreig; en qualsevol cas, la presència de nitrats en el sòl al darrer trimestre de l'any era significativament més baixa que al mesos de gener, abril i juny. Els nivells més baixos es varen determinar al mes d'octubre. La significació de les variacions en el contingut de nitrats es pot observar a la Taula 3.6.

Per contra, el contingut d'amoni es va mantenir pràcticament constant des del mes de gener fins a l'abril però va disminuir considerablement durant els dos mesos següents, detectant-se un mínim al mes de juny. A partir d'aquest moment el seu valor va incrementar ràpidament fins a recuperar els nivells detectats a l'inici de l'estudi; els continguts màxims es varen determinar al mes de desembre. Igualment, la significació de les variacions en el contingut d'amoni es mostra a la Taula 3.6.

Taula 3.6 - Contingut de nitrats i d'amoni (ppm) en el sòl de la plantació de pomeres joves en funció del mes de mostreig.

Mes	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)*		Mes	$N\text{-}NH_4^+$ (ppm)*	
Gener	32.9	a	Desembre	17.3	a
Juny	27.2	a	Novembre	16.6	ab
Abril	24.4	a	Abril	10.5	abc
Setembre	26.0	ab	Març	10.4	bcd
Febrer	13.6	abc	Gener	9.2	cd
Març	13.0	abc	Setembre	8.9	cd
Maig	10.4	abc	Febrer	8.3	cd
Agost	8.2	abc	Agost	7.1	cd
Novembre	4.4	bcd	Maig	5.8	d
Desembre	4.3	cd	Juny	3.0	e
Octubre	1.9	d			

(*) Mitjanes seguides per la mateixa lletra no són significativament diferents d'acord amb el test de separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) utilitzant les dades log-transformades

Variabilitat temporal de l'activitat biològica del sòl

L'activitat biològica del sòl de la plantació de pomeres joves variava significativament al llarg de l'any (P<0.001).

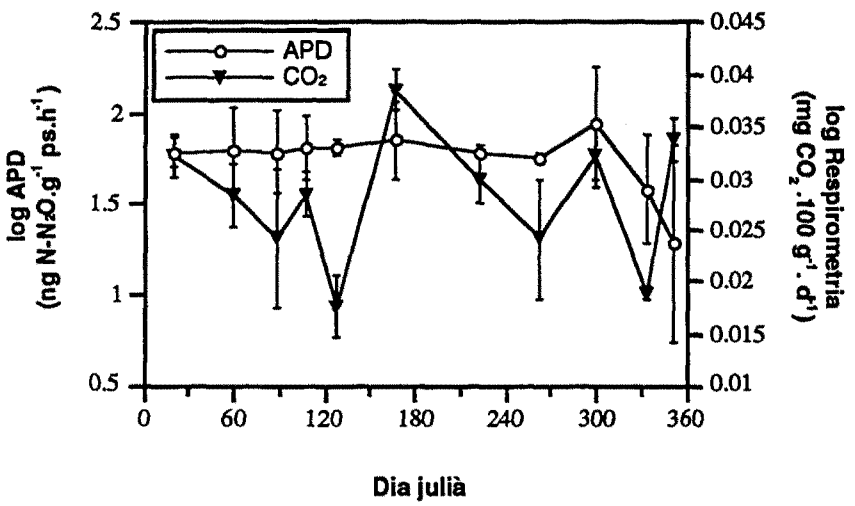

Figura 3.10 - Fluctuació al llarg de l'any de la taxa respiratòria del sòl en la plantació de pomeres joves. Les barres corresponen a la variació obtinguda entre les mesures de les diferents parcel.les de repetició.

La seva pauta de variació semblava estar especialment marcada per l'inici del reg i l'increment del contingut de matèria orgànica a començaments de tardor (Figura 3.10). En aquest sentit, la taxa respiratòria determinada al mes de juny era significativament més elevada que la del mes de maig, moment en què es donava un mínim. A partir del mes de juny, la tendència era a anar disminuint al llarg de l'estiu.

Taula 3.7- Taxa respiratòria del sòl (mg CO_2.100 $g^{-1}.d^{-1}$) de la plantació de pomeres joves en funció del mes de mostreig.

Mes	Taxa respiratòria*
Juny	9.3 a
Desembre	8.1 ab
Gener	7.7 ab
Octubre	7.7 ab
Agost	7.1 ab
Abril	6.8 ab
Febrer	6.8 abc
Setembre	5.7 bcd
Març	5.7 bcd
Novembre	4.4 cd
Maig	4.1 d

(*) Mitjanes seguides per la mateixa lletra no difereixen significativament segons el test de separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) utilitzant les dades log-transformades.

A l'octubre, coincidint amb un lleuger increment de l'activitat potencial desnitrificant, tendia a recuperar-se però al novembre disminuïa bruscament. Sorprenen els relativament elevats valors d'activitat biològica durant els mesos de desembre i gener, els quals no difereixen significativament dels valors determinats al juny. La significació de la variació en els valors d'activitat biològica del sòl entre els diferents mesos mostrejats es pot observar a la Taula 3.7.

b. En la plantació adulta

Variabilitat temporal del contingut hídric del sòl

La variació en l'estat hídric del sòl en la plantació de pomeres adultes durant el període de mostreig era significativa (P<0.001). Les mostres dels mesos de gener, febrer, març, abril, juny i setembre presentaven continguts hídrics significativament inferiors als del mes de novembre; els valors obtinguts al mes d'octubre eren significativament més alts que els del setembre (Taula 3.8). Als mesos de febrer i abril es donaven els continguts d'aigua en el sòl significativament més baixos de l'any. Al mes de març, el valor mig era superior al dels mesos anterior i posterior.

Taula 3.8 - Contingut hídric del sòl (CHS) de la plantació de pomeres adultes en funció del mes de mostreig.

Mes	CHS (%) *
Novembre	28.5 a
Octubre	27.5 ab
Desembre	26.1 abc
Maig	24.1 abc
Agost	24.0 abc
Juny	21.8 bc
Gener	21.8 bc
Setembre	20.9 cd
Març	16.7 d
Abril	12.8 e
Febrer	12.3 e

(*) *Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents d'acord amb el test de separació de mitjanes de REGWF* (α=0.05) *utilitzant les dades log-transformades.*

La representació conjunta dels valors d'aquesta variable juntament amb els d'activitat potencial desnitrificant (Figura 3.11) sembla posar de manifest que en cap moment aquest paràmetre va actuar com a factor limitant; en aquest sentit cal dir que el pic d'activitat potencial desnitrificant detectat entre finals d'hivern-principis de primavera coincidia amb les mesures de contingut hídric més baixos de tot el període de mostreig.

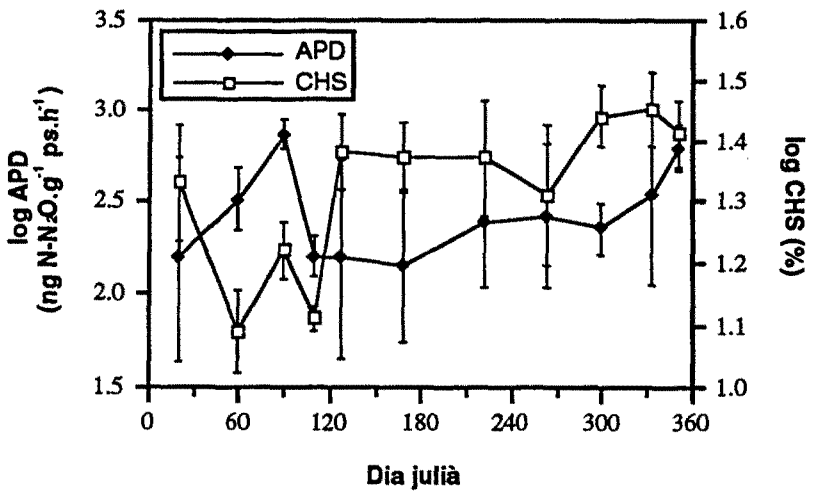

Figura 3.11 - Variació anual de l'activitat potencial desnitrificant (APD) i del contingut d'aigua del sòl (CHS) en la plantació de pomeres adultes. Les barres corresponen a la variació obtinguda entre les mesures de les diferents parcel.les de repetició.

Variabilitat temporal del contingut de matèria orgànica i de la relació C/N

El contingut de matèria orgànica del sòl del camp de pomeres adultes variava significativament entre els diferents mesos mostrejats ($P<0.01$). Els valors de contingut de matèria orgànica del mes de novembre eren significativament superiors als dels mesos de gener, febrer, maig, juny i agost (Taula 3.9). El contingut determinat al mes de març, tot i que superior al dels mesos anterior i posterior, no era significativament diferent d'aquells.

Taula 3.9 - Contingut de matèria orgànica (MO) del sòl de la plantació adulta en funció del mes de mostreig.

Mes	MO (%) *	
Novembre	3.4	a
Octubre	3.0	ab
Desembre	2.9	abc
Març	2.8	abcd
Setembre	2.6	abcd
Abril	2.3	abcd
Febrer	2.2	bcd
Gener	2.2	bcd
Maig	2.1	cd
Juny	2.1	cd
Agost	2.1	d

(*) Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents d'acord amb el test separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) aplicat sobre les dades log-transformades.

No es donava un total paral.lelisme amb la pauta de variació observada per a l'activitat potencial desnitrificant. Sembla que la coevolució entre ambdós paràmetres era més estreta durant el primer semestre de l'any (Figura 3.12).

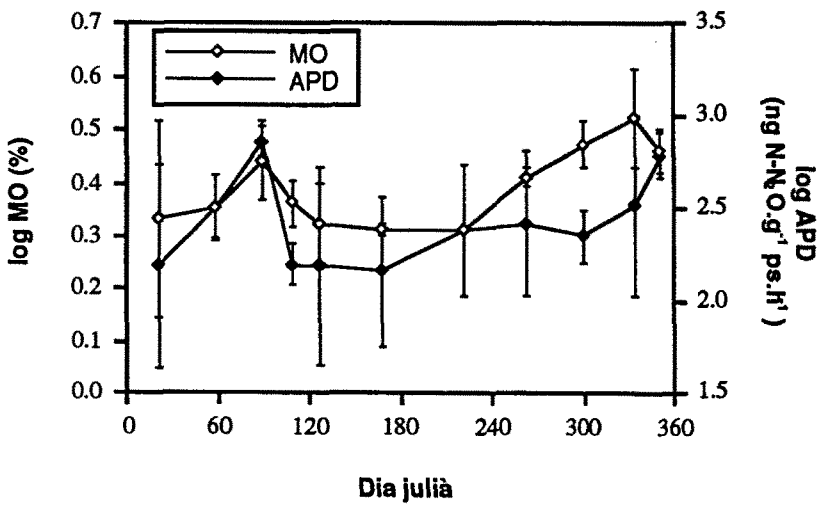

Figura 3.12 - Variació de l'activitat potencial desnitrificant (APD) i del contingut de matèria orgànica del sòl (MO) al llarg de l'any en la plantació de pomeres adultes. Les barres corresponen a la variació obtinguda entre les mesures de les diferents parcel.les de repetició.

En aquesta plantació, la relació C/N també variava significativament al llarg de l'any ($P<0.05$) amb les mostres recollides al mes de novembre presentant un valor d'aquesta relació significativament més elevat que la dels mesos de gener, abril, juny i agost. Per contra, la resta de mesos formava part d'un grup que no diferia significativament de cap dels dos anteriors (Taula 3.10).

Taula 3.10 - Valor mig de la relació C/N de la matèria orgànica del sòl de la plantació adulta en funció del mes de mostreig.

Mes	Relació C/N*	
Novembre	11.0	a
Octubre	10.1	ab
Setembre	9.2	ab
Desembre	9.1	ab
Febrer	8.3	ab
Març	7.9	ab
Maig	7.9	ab
Gener	8.2	b
Agost	7.5	b
Abril	7.5	b
Juny	7.2	b

(*) Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents d'acord amb el test separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) aplicat sobre les dades log-transformades.

En aquesta plantació, es va observar un clar paral.lelisme entre contingut de matèria orgànica i relació C/N durant el segon semestre de l'any (Figura 3.13).

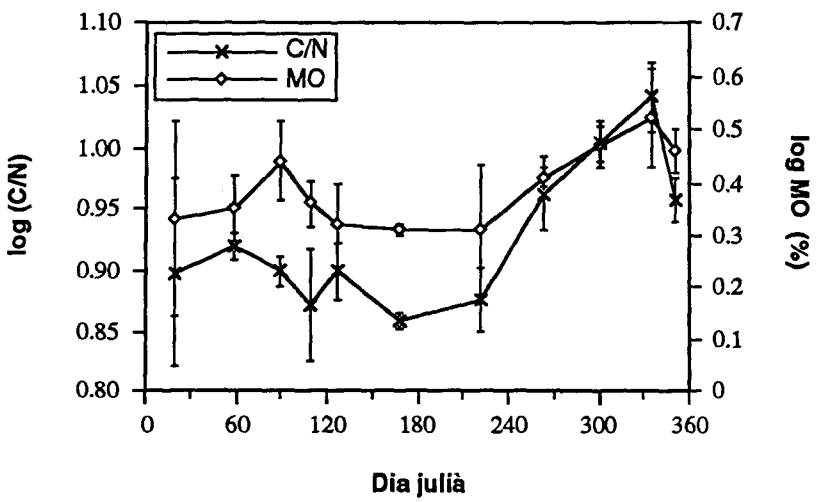

Figura 3.13 - Variació en el contingut de matèria orgànica del sòl i de les seves característiques al llarg de l'any.

Variabilitat temporal del contingut de nitrats i amoni

La variació dels continguts de nitrogen nítric i nitrogen amoniacal entre els diferents mostrejos realitzats en la plantació adulta era significativa per ambdues variables (P<0.001). La fluctuació al llarg de l'any d'ambdós paràmetres es pot observar a la Figura 3.14.

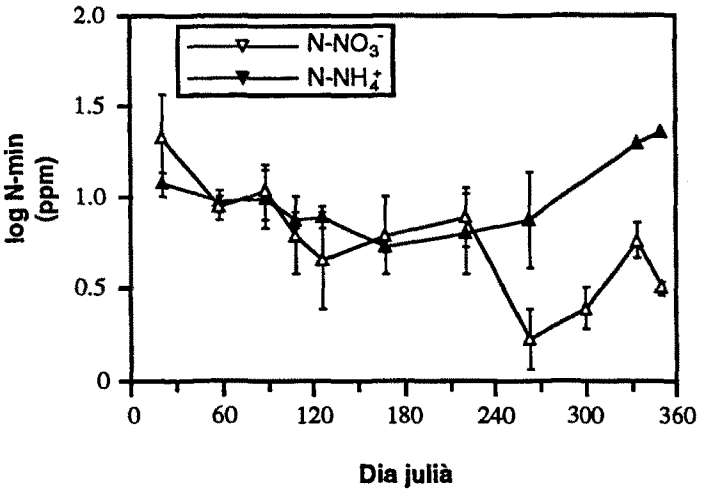

Figura 3.14 - Variació anual del contingut de N-NO_3 i de N-NH_4 del sòl en la plantació de pomeres adultes. N-min= N mineral. Les barres corresponen a la variació obtinguda entre les mesures de les diferents parcel.les de repetició.

El contingut de NO_3 tenia tendència a anar disminuint durant els primers mesos de l'any, amb els valors dels mesos d'abril i maig significativament diferents del contingut determinat al mes de gener (Taula 3.11). Durant els mesos de juny i agost els nivells d'ambdues formes de N-mineral mantenen la mateixa proporció, amb una lleugera tendència a anar augmentant el seu contingut, sense caràcter significatiu. El mes de setembre es caracteritzava per la davallada brusca en el contingut de nitrats, tot i que el contingut d'amoni seguia la mateixa pauta que els dos mesos anteriors. A partir d'aquest moment, sembla que la tendència era anar augmentant fortament el contingut d'amoni, així com també el de nitrats, tot i que en aquest cas els valors màxims assolits eren de l'ordre dels mínims obtinguts durant el període comprès entre els mesos de gener a agost.

És difícil interpretar les seves repercussions sobre l'activitat potencial desnitrificant. Potser la clau de la diferent pauta d'activitat potencial desnitrificant que seguien els dos períodes en relació al contingut de matèria orgànica del sòl tenia a veure amb la disponibilitat de nitrogen mineral.

Taula 3.11 - Contingut de N-mineral (ppm) en el sòl de la plantació adulta en funció del mes de mostreig.

Mes	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)*		Mes	$N\text{-}NH_4^+$ (ppm)*	
Gener	23.3	a	Desembre	22.6	a
Març	11.2	ab	Novembre	19.8	ab
Febrer	8.7	abc	Gener	11.8	abc
Agost	8.0	bc	Març	10.3	bc
Abril	6.8	bc	Febrer	9.3	bc
Juny	6.7	bcd	Maig	8.8	c
Novembre	5.8	bcd	Setembre	8.4	c
Maig	5.1	bcde	Abril	7.5	c
Desembre	3.2	cde	Agost	6.9	c
Octubre	2.5	de	Juny	5.3	c
Setembre	1.7	e			

(*) Mitjanes seguides per la mateixa lletra no són significativament diferents d'acord amb el test de separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) utilitzant les dades log-transformades.

Variabilitat temporal de l'activitat biològica del sòl

L'activitat biològica del sòl de la plantació adulta fluctuava significativament (P<0.001) al llarg de l'any. La seva variació entre els diferents mesos mostrejats es mostra a la Figura 3.15, en la què també es representa la variació en l'activitat potencial desnitrificant.

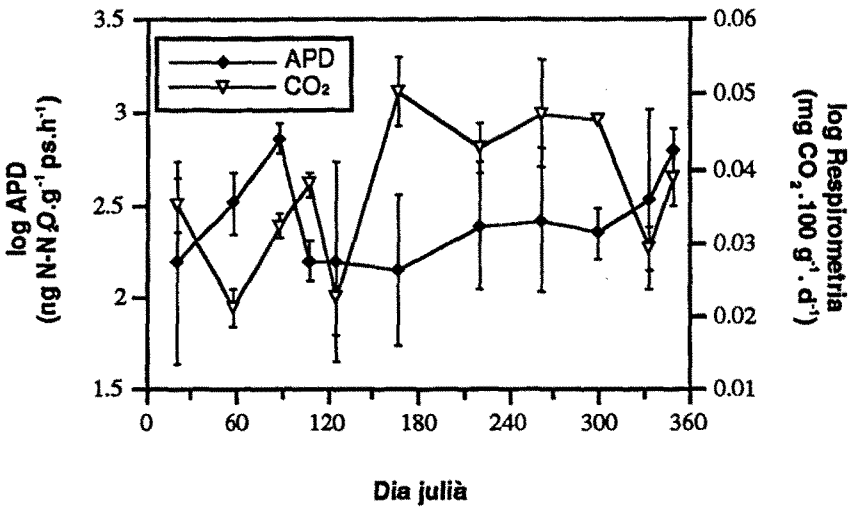

Figura 3.15 - Variació al llarg de l'any de la taxa respiratòria del sòl en la plantació de pomeres adultes. Les barres corresponen a la variació obtinguda entre les mesures de les diferents parcel.les de repetició.

En aquesta plantació, es donava un pic d'activitat microbiana a finals d'hivern-principis de primavera amb una caiguda significativa de la taxa respiratòria al maig respecte al mes anterior. Aquest pic d'activitat biològica es donava amb posterioritat al pic d'activitat potencial desnitrificant. A partir del juny i fins a l'octubre -mes inclòs- es donaven els valors més

elevats de taxa respiratòria. Igual que en la plantació jove es va detectar una disminució significativa de l'activitat biològica al novembre, tot i que posteriorment, es recuperava. La significació de les diferències entre els diferents mesos mostrejats es poden observar a la Taula 3.12.

Taula 3.12- Taxa respiratòria del sòl (mg CO_2.100 $g^{-1}.d^{-1}$) de la plantació de pomeres adultes en funció del mes de mostreig.

Mes	Taxa respiratòria*	
Juny	12.3	a
Setembre	11.5	ab
Octubre	11.3	abc
Agost	10.3	abcd
Desembre	9.3	abcd
Abril	9.1	bcde
Gener	8.4	cde
Març	7.7	de
Novembre	7.0	e
Maig	5.3	f
Febrer	5.0	f

(*) Mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents d'acord amb el test separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) aplicat sobre les dades log-transformades.

3.1.2.1.3 Relació entre activitat potencial desnitrificant i algunes característiques del medi edàfic

L'estudi sobre la dinàmica anual tant de l'activitat potencial desnitrificant com dels seus principals factors reguladors no va aportar una informació massa concloent en cap de les dues plantacions mostrejades donada l'elevada variabilitat entre repeticions detectada.

Per tal d'aprofundir en les relacions entre aquestes variables en cadascuna de les plantacions es varen analitzar les dades de manera més global, sense tenir en compte el moment del mostreig. Altres variables edàfiques tals com pH i nitrogen total també varen ser considerades en aquesta part del treball.

En el camp de pomeres joves l'anàlisi de correlacions utilitzant el coeficient de correlació de Pearson i amb les dades log-transformades, excepte en el cas del pH, va mostrar que, en general, s'establien poques associacions entre les diferents variables determinades (Taula

3.13). L'activitat potencial desnitrificant només estava directament correlacionada amb el contingut de matèria orgànica i la relació C/N. En ambdós casos, tot i que la correlació era significativa, el grau d'associació era relativament baix. També es va observar que l'activitat potencial desnitrificant estava negativament correlacionada amb el contingut d'amoni; la intensitat de la correlació i la seva significació era similar a la de les altres dues variables. Altres correlacions destacables eren aquella entre contingut de matèria orgànica i la relació C/N, i la que s'establia entre el contingut d'aigua i de nitrats del sòl.

Taula 3.13 - *Matriu de correlacions entre els diferents paràmetres edàfics mesurats* en la plantació jove amb les dades log-transformades, excepte per al pH. APD: activitat potencial desnitrificant; MO: contingut de matèria orgànica; Nt: nitrogen total; CHS: *contingut hídric*; CO_2: activitat biològica del sòl. *n.s.*: no significatiu, $P>0.1$; *: poc significatiu, $0.1>P>0.05$; **: significatiu, $0.05>P>0.01$; ***: molt significatiu, $0.01>P$.

	APD	pH	MO	Nt	C/N	CHS	CO_2	Nitrats	Amoni
APD	1	-0.1722 n.s.	0.4292 **	0.1379 n.s.	0.3936 **	-0.1452 n.s.	-0.1002 n.s.	0.2360 n.s.	-0.4091 **
pH		1	-0.2761 n.s.	-0.3378 *	-0.0521 n.s.	0.3959 **	0.2004 n.s.	-0.3396 *	0.1094 n.s.
MO			1	0.4885 ***	0.7899 ***	0.1480 n.s.	-0.1064 n.s.	-0.0812 n.s.	0.0054 n.s.
Nt				1	-0.1174 n.s.	0.0552 n.s.	0.0504 n.s.	0.3192 *	0.0951 n.s.
C/N					1	0.1357 n.s.	-0.0857 n.s.	-0.2964 *	-0.0537 n.s.
CHS						1	0.1061 n.s.	-0.6208 ***	0.4305 **
CO_2							1	-0.0187 n.s.	-0.2589 n.s.
Nitrats								1	-0.3939 **
Amoni									1

Una anàlisi de regressió lineal entre activitat potencial desnitrificant i contingut de matèria orgànica del sòl amb les dades log-transformades indicava que, malgrat la significació del model ($P<0.05$), aquest només explicava el 18 % de la variabilitat de les dades. Cap altra variable era considerada com a possible regressora sola o en combinació amb altres variables en una anàlisi de regressió múltiple pel sistema d'eliminació progressiva de variables.

En el camp de pomeres adultes l'anàlisi de correlacions va mostrar que l'activitat potencial desnitrificant estava fonamentalment correlacionada amb el contingut de matèria orgànica del sòl i, sobretot, de nitrogen total (Taula 3.14); en ambdós casos l'associació era directa. El pH de la solució del sòl, la relació C/N i el contingut d'amoni eren altres variables edàfiques

correlacionades amb l'activitat potencial desnitrificant, amb un grau d'associació i una significació inferiors. Només en el cas del pH s'establia una relació inversa la qual podia anar lligada a la disminució del pH per efecte de la matèria orgànica.

En aquesta plantació, el grau d'associació entre les diferents variables determinades era considerable. S'observava una correlació directa molt significativa entre contingut de matèria orgànica i nitrogen total, relació C/N i contingut hídric. El contingut d'amoni també podia anar lligat a la presència de matèria orgànica i a valors relativament elevats de la relació C/N.

Taula 3.14 - Matriu de correlacions entre els diferents paràmetres edàfics mesurats en la plantació adulta amb les dades log-transformades, excepte per al pH. APD: activitat potencial desnitrificant; MO: contingut de matèria orgànica; Nt: nitrogen total; CHS: contingut hídric; CO_2: activitat biològica del sòl. n.s.: no significatiu, $P>0.1$; *: poc significatiu, $0.1>P>0.05$; **: significatiu, $0.05>P>0.01$; ***: molt significatiu, $0.01>P$.

	APD	pH	MO	Nt	C/N	CHS	CO_2	Nitrats	Amoni
APD	1	-0.3680 **	0.6228 ***	0.7271 ***	0.3207 *	0.2693 n.s.	0.0970 n.s.	0.1175 n.s.	0.4074 **
pH		1	-0.6392 ***	-0.4746 ***	-0.4873 ***	-0.3502 **	0.0157 n.s.	0.2653 n.s.	-0.3966 **
MO			1	0.6958 ***	0.8006 ***	0.4798 ***	0.1385 n.s.	-0.1269 n.s.	0.4991 ***
Nt				1	0.1271 n.s.	0.2737 n.s.	0.2580 n.s.	0.0854 n.s.	0.2784 n.s.
C/N					1	0.4418 **	-0.0118 n.s.	-0.2485 n.s.	0.4678 ***
CHS						1	0.3394 *	-0.2360 n.s.	0.2770 n.s.
CO_2							1	-0.2358 n.s.	-0.2089 n.s.
Nitrats								1	-0.0219 n.s.
Amoni									1

El model de regressió lineal obtingut entre el contingut de matèria orgànica i l'activitat potencial desnitrificant en aquesta plantació era altament significatiu ($P<0.001$), igual que amb el contingut de nitrogen total. Tot i que en ambdós models els residus es distribuïen normalment, la seva independència no estava del tot clara en cap cas. La incorporació en el model de la relació C/N com a variable regressora el millorava considerablement quant es considerava conjuntament amb el contingut de matèria orgànica. Per aquest model (Equació 3.1), altament significatiu ($P<0.001$) i el qual explicava el 58 % de la variabilitat de les dades, els residus seguien una distribució normal i no presentaven autocorrelació temporal.

$$\log APD = 4.3 \log MO - 3.1 \log C/N + 3.6 \quad \text{(Equació 3.1)}$$

Malgrat la més intensa associació detectada entre activitat potencial desnitrificant i nitrogen total en l'anàlisi de correlacions, el model de regressió lineal considerant nitrogen total i relació C/N no corregia la dependència temporal dels residus. D'altra banda, cal remarcar que una anàlisi de regressió múltiple pel sistema d'eliminació progressiva de variables considerant totes les variables independents determinades, sempre evitant la inclusió de variables altament colineals, mantenia l'equació proposada anteriorment com a millor model per explicar la variació en l'activitat potencial desnitrificant en la plantació de pomeres adultes.

Prèviament s'havia utilitzat l'anàlisi de components principals considerant només les variables independents per detectar la presència de multicolinealitat entre aquestes per a cada plantació per separat. L'índex de condició -quocient entre el valor propi més gran i el més petit- prenia en qualsevol d'elles una valor comprés entre 100-1000, indicant que probablement algunes de les variables estiguessin estretament relacionades. La resta de nombres de condició -quocient entre el valor propi més gran i cadascun dels altres valors propis- eren inferiors a 10; per tant, només dues variables estaven estretament relacionades. Els pesos factorials de les diferents variables originals en l'última component principal indicaven que aquestes variables eren el contingut de matèria orgànica i el nitrogen total.

3.1.2.2 Discussió

3.1.2.2.1 Característiques del medi edàfic

Globalment, els continguts de matèria orgànica determinats en les dues plantacions de pomera mostrejades, jove i adulta, eren els propis de sòls de conreu de clima mediterrani. Els valors més baixos del sòl del camp de pomeres joves eren en bona part conseqüència d'un efecte combinat del menor estadi evolutiu de la plantació juntament amb un sòl de textura més grollera. Alhora ambdós, poca presència de matèria orgànica i granulometria de la fracció mineral, determinaven una pobra capacitat de retenció d'aigua en aquest sòl; d'aquí els baixos continguts hídrics determinats en aquesta plantació. A més, les característiques pròpies de la plantació (edat, marc de plantació,...) feien que els fenòmens d'evaporació d'aigua del sòl segurament fossin molt importants almenys durant un període de l'any. D'altra banda, en aquesta plantació els continguts de nitrats eren relativament elevats; això podia indicar una fertilització nitrogenada excessiva en relació a la demanda per part de la planta.

En la plantació adulta una aportació més elevada de matèria orgànica, degut a la major grandària de les plantes juntament amb una textura més fina i un mal drenatge, feien que tant el contingut d'aigua com de matèria orgànica en el sòl fossin més elevats. A més, durant el període actiu de les plantes la superfície edàfica quedava protegida d'una evaporació intensa degut no només a la grandària de la copa sinó també a la presència d'una important capa herbàcia. El mal drenatge d'aquest camp podia parcialment ser conseqüència de l'aplicació de reg a manta durant els quinze anys precedents.

Globalment, els valors mitjos d'activitat microbiana eren baixos. Els nivells més baixos determinats en la plantació jove estarien relacionats amb uns menors continguts d'aigua i de matèria orgànica. D'altra banda, la textura del sòl podia influir lleugerament en les característiques qualitatives d'aquesta.

Els valors d'activitat potencial desnitrificant determinats a la plantació jove són aproximadament un ordre de magnitud inferiors als del camp de pomeres adultes. Cal destacar els valors mínims observats en el camp de pomeres joves i els màxims de la plantació adulta. En general, però, els valors mitjos d'activitat potencial desnitrificant determinats en cada plantació són similars als trobats per altres autors (Dendooven i Anderson, 1994; Groffman, 1987; Parkin i Robinson, 1989; Parkin *et al.*, 1987; Parsons *et al.*, 1991; Peterjohn, 1991).

3.1.2.2.2 Variabilitat temporal de l'activitat potencial desnitrificant

L'estudi de la dinàmica anual de l'activitat potencial desnitrificant del sòl en dues plantacions de pomera ubicades en una zona de clima típicament mediterrani indicava que les característiques del medi edàfic, les quals poden estar afectades per les de la plantació pròpiament dita, eren un factor molt important regulant tant la capactitat desnitrificant del sòl com la seva pauta de variació temporal.

D'una banda, els significativament inferiors valors d'activitat potencial desnitrificants determinats en el sòl de la plantació de pomeres joves concorden amb els més baixos valors de matèria orgànica i d'aigua en sòl. A més, la seva textura franc-arenosa, la qual podia facilitar el moviment d'aigua a través dels macroporus del sòl, segurament només actuava com a barrera per a la difusió de l'O_2 durant períodes molt breus després de l'addició d'aigua al sòl. Per contra, en la plantació de pomeres adultes un més elevat contingut de matèria orgànica en el sòl, juntament amb un textura més fina i a la dificultat de drenatge per la presència d'una capa semi-impermeable, poden potenciar l'activitat desnitrificant. En aquesta plantació es va observar que es donava una estreta relació lineal entre activitat potencial mitjana anual i cadascuna de les diferents fraccions granulomètriques per a cadascuna de les parcel.les experimentals (dades no publicades). Malgrat que nosaltres no hàgim determinat taxes actuals d'emissió de N-gas, i tenint en compte les diferències determinades pel què fa a activitat potencial desnitrificant entre ambdues plantacions, és important remarcar que Ryden i Lund (1980) observen taxes d'emissió de N-gas per desnitrificació un ordre de magnitud superiors en un sòl de textura més fina que en un sòl franc-arenós després de l'aplicació d'aigua de reg. Sexstone *et al.* (1985) també determinen pèrdues de N per desnitrificació molt més elevades en un sòl franc-argilós respecte a un franc-arenós.

També es va posar de manifest una elevada variabilitat espacial en els valors d'activitat potencial desnitrificant. Per a la plantació de pomeres joves el coeficient de variació dins de cada mostreig variava entre el 7 i el 122 %; en la plantació adulta oscil.lava de 17 a 116 %. Això no sembla estar d'acord amb aquells autors que mantenen que la distribució espacial dels microorganismes desnitrificants en el sòl és relativament uniforme amb coeficients de variació sovint inferiors al 20 % (Groffman, 1985; Parkin i Robinson, 1989; Peterjohn i Schlesinger, 1991; Tiedje *et al.*, 1989). Tanmateix, Murray *et al.* (1995) també observen una heterogeneïtat espacial en la distribució de l'activitat potencial desnitrificant en sòls agrícoles. És interessant remarcar, però, que almenys en la plantació adulta hi ha una tendència a disminuir la variabilitat quan els canvis en el medi edàfic es donen en tota la superfície edàfica; per contra, durant el període d'irrigació

la variabilitat era molt gran. Això pot evidenciar en certa manera la major heterogeneïtat en el medi edàfic en la zona del bulb d'humectació que comporta l'aplicació localitzada d'aigua.

Globalment, aquesta elevada variabilitat juntament amb l'estabilitat dels enzims desnitrificants en el sòl va dificultar enormement la determinació del patró de variació temporal de l'activitat potencial desnitrificant. Cal tenir present que si bé canvis dràstics poden comportar un descens significatiu en el nombre de desnitrificants en la població del sòl, una reducció gradual de les condicions del medi edàfic favorables per a l'activitat dels microorganismes desnitrificants permet la seva persistència en forma inactiva en el sòl (Groffman, 1987).

L'aplicació de tests de contrast d'hipòtesis va ser una eina útil a l'hora de determinar una dinàmica més global per cada camp per separat. En la plantació adulta, es va detectar un comportament estacional de l'activitat potencial desnitrificant, amb pics de màxima activitat a la primavera i finals de tardor. Aquests resultats no estarien massa d'acord amb aquells autors que, tot i observar un patró temporal similar en les taxes d'emissió de N-gas determinades a partir de nuclis intactes de sòl, mantenen que el pic primaveral d'emissió no va lligat a un increment de l'activitat potencial desnitrificant (Groffman, 1987; Parsons *et al.*, 1991; Smith i Parsons, 1985). L'augment al mes de desembre respecte als mesos anteriors també ha estat observat per altres autors (Groffman, 1987; Haider i Schneider, 1992). Sembla que el patró de variació de l'activitat potencial desnitrificant determinat en aquesta plantació aniria lligat a l'activitat dels arbres, ja que els pics de màxima activitat es donaven en períodes de demanda pràcticament nul.la per part de la planta, mentre que quan l'activitat radicular era important, la competència pel N-mineral segurament tindria repercussions negatives sobre l'activitat i/o presència de microorganismes desnitrificants.

En la plantació jove no es pot parlar d'una dinàmica temporal. Els nivells detectats són pràcticament idèntics al llarg de l'any amb una certa disminució a finals de tardor-principis d'hivern la qual contrasta amb el què succeeix en la plantació de pomeres adultes.

3.1.2.2.3 Variabilitat temporal d'alguns paràmetres edàfics relacionats amb la desnitrificació

Per a una major interpretabilitat dels resultats obtinguts en l'estudi de la variabilitat temporal dels diferents paràmetres edàfics relacionats amb la desnitrificació (contingut d'aigua, de matèria orgànica, relació C/N, de N-mineral en el sòl, i activitat biològica) es varen tractar les dades de

cada camp per separat donat que per a la majoria de les variables la pauta de variació era particular per a cada camp. Globalment, es va observar que tant en la plantació jove com en el camp de pomeres adultes, els diferents paràmetres edàfics determinats fluctuaven al llarg de l'any.

Pel què fa al contingut hídric del sòl, durant l'hivern-principis de primavera i a la tardor es donava un cert paral.lelisme en la variació del contingut hídric del sòl entre ambdues plantacions, tot i que els valors sempre eren clarament superiors en la plantació adulta i les variacions més marcades. Tanmateix, mentre que en el camp de pomeres adultes l'estat hídric del sòl es mantenia a un nivell relativament elevat durant l'estiu com a conseqüència de l'aplicació d'aigua de reg, en la plantació jove no es detectava el seu efecte. Com ja s'ha comentat anteriorment, el sòl d'aquesta plantació estava fortament afectat per fenòmens d'evaporació d'aigua del sòl a l'atmosfera com a conseqüència de la pobra cobertura vegetal. En ambdues plantacions, es donava una disminució del contingut hídric al setembre, especialment evident en la plantació jove. Els continguts més elevats es donaven a la tardor i principis d'hivern, coincidint amb un augment de les precipitacions (Font: Fundació "Mas Badia").

Pel què fa a la pauta de variació temporal del contingut de matèria orgànica, ambdues plantacions diferien lleugerament. A principis de primavera s'observava un increment, encara que no significatiu, només en el sòl de la plantació de pomeres adultes i que es podria explicar com un efecte de les gelades típiques de finals d'hivern-principis de primavera sobre la matèria orgànica no descomposada present en aquesta plantació. L'increment gradual del contingut de matèria orgànica des de finals d'estiu observat en ambdues plantacions segurament aniria lligat a la purga i a la caiguda de fruita durant el procés de maduració. La incorporació de matèria orgànica al sòl culmina amb la caiguda de la fulla. Durant aquest període la relació C/N va augmentant paral.lelament al contingut de matèria orgànica del sòl. En el camp de pomeres joves, la davallada en el contingut de matèria orgànica observat a la tardor, després d'assolir els nivells màxims, pot ser deguda a una intensa activitat mineralitzadora. En aquest sentit, el contingut d'aigua relativament elevat en el sòl juntament amb unes temperatures encara acceptables poden afavorir l'activitat microbiana, sobretot en un sòl de textura grollera on la matèria orgànica resta poc protegida a l'atac dels microorganismes. Els nivells relativament elevats de nitrogen amoniacal determinats durant aquest període reforçarien aquesta hipòtesi.

En ambdues plantacions, els relativament més baixos valors de nitrats es donaven a la tardor els quals poden ser conseqüència de l'aturada de la fertirrigació ja que la davallada brusca va acompanyada d'una lleugera remuntada i un augment del contingut de nitrogen amoniacal. En aquest cas, segurament hi jugaria un paper important la descomposició del material vegetal.

L'augment de les precipitacions durant aquest període afavoriria la lixiviació dels nitrats, sobretot en la plantació de pomeres joves degut a les seves característiques de textura i drenatge. Al mes de gener es donen nivells relativament elevats de nitrats; això sorprèn donat que d'entrada s'esperaria que les baixes temperatures limitessin la nitrificació.

Pel què fa a la taxa respiratòria del sòl es va observar que la pauta de variació temporal era particular per a cada plantació. A diferència del camp de pomeres joves, en la plantació adulta s'observava un pic primaveral d'activitat biològica el qual es donava amb posterioritat al pic d'activitat potencial desnitrificant. Per tant, sembla que aquest aniria més aviat lligat a un increment del contingut de matèria orgànica fàcilment disponible i no a un augment del grau d'anòxia del sòl com a conseqüència d'una intensa activitat microbiana com han suggerit altres autors (Christensen *et al.*, 1990b; Davidson, 1992a; Kroeckel i Stolp, 1985; Parsons *et al.*, 1991). En ambdues plantacions es donava un mínim al mes de maig seguit per un màxim al juny; segurament això aniria lligat a l'inici del període de reg el qual podria afectar la població microbiana del sòl. Durant l'estiu, els valors d'activitat microbiana del sòl es mantenien relativament elevats en el sòl de la plantació adulta, segurament afavorida per un major contingut hídric i de matèria orgànica respecte al sòl del camp de pomeres joves. Al novembre també es donava una caiguda brusca de la taxa respiratòria en ambdues plantacions; canvis en el medi edàfic, lligats a l'aturada de l'activitat dels arbres, podien comportar una reestructuració de la comunitat microbiana.

3.1.2.2.4 Relació entre activitat potencial desnitrificant i alguns paràmetres edàfics

En la plantació jove, la poca capacitat desnitrificant lligada als baixos continguts hídrics i de matèria orgànica del sòl seria el principal factor limitant de les pèrdues de N-gas per desnitrificació. Puntualment, a finals de tardor la disminució en el contingut de matèria orgànica podria ser el principal responsable de la reducció en els nivells d'activitat potencial desnitrificant detectats ja que durant aquest període es donaven continguts d'aigua significativament superiors a la de la resta de mesos i segurament no actuava com a principal factor limitant. La poca competència pel nitrogen mineral amb les plantes en aquesta època de l'any i l'elevada afinitat per a la utilització del nitrat del sistema enzimàtic dels microorganismes desnitrificants també serien aspectes a considerar (Limmer i Steele, 1982; Yoshinari *et al.*, 1977).

L'anàlisi de correlacions entre els diferents paràmetres determinats corroborava que el contingut de matèria orgànica del sòl era el principal factor regulador de la capacitat desnitrificant del sòl de la plantació de pomeres joves sobre una escala anual tot i els seus efectes eren molt petits. Els baixos continguts de matèria orgànica detectats al més de novembre podrien anar lligats a una intensa activitat mineralitzadora comportant un increment en el contingut d'amoni. D'aquí que la correlació inversa entre activitat potencial desnitrificant i contingut d'amoni es considerés circumstancial.

En la plantació adulta, la dinàmica de l'activitat potencial desnitrificant també anava molt lligada a la variació en el contingut de matèria orgànica del sòl, almenys durant el primer semestre de l'any. El pic d'activitat desnitrificant detectat al mes de març coincidia amb un lleuger increment del contingut de matèria orgànica del sòl. A finals d'estiu-principis de tardor ni el contingut de matèria orgànica del sòl ni la seva humitat actuaven com a factors limitants en la plantació de pomeres adultes. Durant aquest període pot ser més aviat es pot pensar en una competència pels nitrats amb les plantes. En aquest sentit, cal recordar que al setembre es dóna una disminució significativa respecte al mes d'agost quant a contingut de nitrats. A més, durant aquest període, l'activitat biològica del sòl d'aquesta plantació també era relativament elevada. Per contra, els valors relativament baixos d'aquesta forma de N mineral que es detecten al desembre, els quals no difereixen significativament dels determinats al setembre malgrat ser superiors, coincideixen amb un augment de l'activitat potencial desnitrificant sense que es doni un increment ni del contingut de matèria orgànica ni d'aigua en el sòl. En aquesta plantació la presència d'una capa impermeable subsuperficial pot afavorir l'activitat desnitrificant enfront la lixiviació dels nitrats en èpoques en les què no hi ha competència pels nitrats amb les plantes. En general, es pot afirmar que les mesures del reservori de nitrats podrien no donar massa informació sobre la seva disponibilitat per als desnitrificants per si mateixes.

L'anàlisi de correlacions i de regressió lineal també confirmaven que en aquesta plantació el principal factor regulador de l'activitat potencial desnitrificant sobre una escala anual era el contingut de matèria orgànica fàcilment oxidable. Tanmateix, la relació amb aquesta variable depenia de l'època de l'any. Els valors màxims d'activitat potencial desnitrificant es donaven a la primavera tot i que el major augment de matèria orgànica no era en aquest moment, sinó a finals de tardor. La introducció en el model de regressió de la relació C/N corregia aquest efecte temporal. En general, s'ha descrit que en sòls de conreu la matèria orgànica del sòl pot ser un factor regulador de la desnitrificació important (Drury *et al.*, 1991; Ryden i Lund, 1980; Ryden *et al.*, 1979). En zones de clima mediterrani això pot ser especialment important donat que, si la humitat del sòl no és limitant, les temperatures afavoreixen fortament l'activitat microbiana de manera que la presència de matèria orgànica en sòls de conreu és relativament baixa.

L'elevada variabilitat temporal de les emissions de N-gas del sòl a l'atmosfera a qualsevol escala de treball (d'hores, diària, setmanal i estacional) ha fet que relativament pocs investigadors hagin centrat els objectius del seu estudi en el coneixement de la dinàmica d'aquest procés microbià a una escala de temps relativament llarga (Cates i Keeney, 1987; Jarvis *et al.*, 1991; Kaiser i Heinemeyer, 1996; Parsons *et al.*, 1991); la majoria d'estudis es limiten a un període de l'any, en funció de les pràctiques de conreu realitzades. Els resultats d'aquest estudi indiquen, però, que analitzar la dinàmica temporal de l'activitat potencial desnitrificant pot aportar una informació valuosa de cares a millorar les pràctiques de conreu sobretot quan paral.lelament es determina la variació dels seus principals factors reguladors. Conèixer els períodes en els què l'activitat dels microorganismes desnitrificants està afavorida o bé quins paràmetres controlen aquesta activitat en diferents moments de l'any pot permetre replantejar-se les pràctiques de conreu per tal de controlar en la mesura que sigui possible les emissions de N-gas per desnitrificació. Globalment, els pics d'activitat potencial desnitrificant determinats en la plantació de pomeres adultes es donen en moments en els què les pràctiques de conreu no eren massa intenses. Tanmateix, l'aplicació d'adob de cobertora en forma de nitrat amònic a finals d'hivern-principis de primavera pot estar relacionada amb el pic d'activitat potencial desnitrificant. La bona disponibilitat de N-mineral juntament amb un lleuger increment del contingut de matèria orgànica pot tenir implicacions mediambientals importants donat que en aquesta època sembla que condicions òptimes per a l'activitat dels microorganismes desnitrificants es donen en bona part de la superfície edàfica, a diferència del què succeeix durant el període d'irrigació. En aquest cas, només una part molt petita de la superfície edàfica està afectada pel reg. A més, amb un sistema de reg localitzat d'elevada freqüència és d'esperar que la N_2O-reductasa, molt sensible a la presència d'oxigen, estigui activa.

En la plantació jove, la textura grollera del sòl juntament amb l'escassa cobertura vegetal no afavoreix en absolut la presència de microorganismes amb capacitat desnitrificant. Tanmateix, tot i que això pot ser un aspecte important degut a la poca participació en les emissions de N-gas cap a l'atmosfera d'aquest sòl, des d'un punt de vista mediambiental caldria també considerar que en aquest camp les pèrdues de nitrats per lixiviació poden ser importants fora del període de reg. Cal tenir present que amb un sistema de reg localitzat no s'afavoreixen les pèrdues per rentat.

Un estudi basat en la determinació de l'activitat potencial desnitrificant també permet la identificació dels sòls en els què les emissions via desnitrificació poden ser considerables, un aspecte molt important sobretot de cares a estudis posteriors. Per contra, amb estudis *in situ* es poden obtenir taxes d'emissió de N-gas similars entre sòls de característiques diferents quan en realitat el potencial desnitrificant pot variar fortament.

Els resultats d'aquest estudi semblen indicar que les diferències en les característiques texturals entre els sòls d'ambdues plantacions poden jugar un paper rellevant en el control tant de la dinàmica hídrica com dels nivells de matèria orgànica del sòl, dos aspectes molt importants des del punt de vista de la seva influència sobre els microorganismes desnitrificants.

3.1.3 Efecte de l'Aplicació de Diferents Dosis de Reg sobre l'Activitat Potencial Desnitrificant i els seus Principals Factors Reguladors

Per estudiar l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant es varen escollir tres tractaments diferents: 75, 100 i 150 % de l'ETc. La tesi del 100 de l'ETc es considerava la de referència donat que la quantitat d'aigua afegida diàriament al sòl corresponia a la quantitat evaporada-transpirada per tal de mantenir el 50 % del bulb d'humectació en un percentatge hídric òptim. Les altres dues dosis assajades corresponien a un nivell per sota de l'òptim (75 % de l'ETc) i una per sobre (150 % de l'ETc).

3.1.3.1 Resultats

3.1.3.1.1 Efecte sobre l'activitat potencial desnitrificant

L'anàlisi estadística de les dades d'activitat potencial desnitrificant considerant els factors camp, dosi de reg i mes de mostreig, mostra que, pel què fa a aquest paràmetre, només es donaven diferències significatives pel factor camp (Taula 3.15), el qual explicava el 64.4 % de la variabilitat de les dades; el sòl de la plantació de pomeres adultes presentava una activitat potencial desnitrificant significativament més elevada. D'altra banda, no es va observar cap interacció significativa entre les diferents fonts de variació.

Taula 3.15 - Efecte dels factors camp, dosi de reg i mes de mostreig sobre l'activitat potencial desnitrificant. Resultats de l'anàlisi de la variància utilitzant les dades log-transformades.

Font de variació	*gl*	*F*	*P>F*
Model	17	4.92	0.0001
Error	35		
C total	52		

Font de variació	*gl*	*F*	*P>F*
Camp	1	76.34	0.0001
Dosi	2	0.68	0.5127
Mes	2	0.60	0.5537
Camp*Dosi	2	0.57	0.5701
Camp*Mes	2	0.61	0.5515
Dosi*Mes	4	0.29	0.8805
Camp*Dosi*Mes	4	0.28	0.8873

Tot i que en ambdós camps els valors d'activitat potencial desnitrificant eren inferiors als obtinguts en les proves realitzades inicialment (3.1.1.1.c), continuaven diferint aproximadament en un ordre de magnitud.

A la Figura 3.16 es pot observar que en la plantació de pomeres joves l'activitat potencial desnitrificant era molt similar entre les tres tesis de reg assajades per a qualsevol dels mostrejos realitzats. A més, el seu valor tendia a mantenir-se en el temps. Per contra, en la plantació adulta, i malgrat no ser significatiu (P>0.05), es va observar que en general el valor mig d'activitat potencial desnitrificant era més elevat en la dosi del 150 % de l'ETc. En aquesta plantació tampoc es va detectar una variació significativa (P>0.05) durant el període d'irrigació. Tanmateix, l'elevada variabilitat entre les repeticions d'una mateix tractament segurament dificultava l'elucidació d'un efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant.

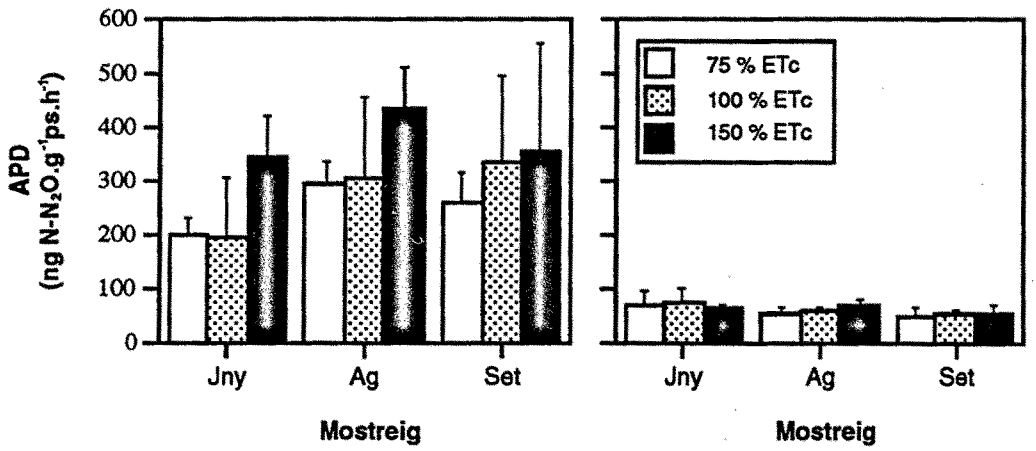

Figura 3.16 - Variació de l'activitat potencial desnitrificant (APD) durant el període d'irrigació en funció de la dosi de reg aplicada. Esquerra: plantació adulta; dreta: plantació jove. Les barres indiquen l'error estàndard (α=0.05).

3.1.3.1.2 Efecte sobre els principals factors reguladors de l'APD

Paral.lelament a l'estudi de l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant, es va analitzar l'efecte sobre alguns dels principals factors reguladors d'aquest procés microbiològic: contingut hídric, de matèria orgànica i de nitrats, els quals directament o indirecta poden variar en funció de la quantitat d'aigua afegida al sòl.

Els factors considerats també varen ser: camp, dosi de reg i mes de mostreig. A la Taula 3.16 es mostra el resum de l'anàlisi de variància obtinguda per a cadascuna d'aquestes variables dependents la qual inclou els graus de llibertat i els valors de l'estadístic de Fisher-Snedecor (*F*) juntament amb la probabilitat (*P*). Per a qualsevol d'elles es varen utilitzar les dades log-transformades.

Taula 3.16 - Efecte dels factors camp, dosi de reg i mes de mostreig sobre el contingut hídric (CHS), de matèria orgànica (MO) i de nitrats (NO_3^-) del sòl. Resum de les diferents anàlisis de variància utilitzant en qualsevol cas les dades log-transformades.

		CHS		MO		NO_3^-	
Font de variació	**gl**	***F***	***P***	***F***	***P***	***F***	***P***
Camp	1	154.47	0.0001	58.25	0.0001	29.73	0.0001
Dosi	2	3.87	0.0300	1.22	0.3079	2.24	0.1227
Mes	2	5.87	0.0062	9.95	0.0004	10.87	0.0002
Camp*Dosi	2	1.07	0.3521	3.90	0.0294	5.10	0.0118
Camp*Mes	2	4.29	0.0214	0.78	0.4648	16.57	0.0001
Dosi*Mes	4	1.40	0.2549	0.64	0.6373	2.81	0.0410
Camp*Dosi*Mes	4	0.63	0.6409	0.93	0.4573	1.48	0.2299

L'anàlisi estadística de les dades de contingut hídric del sòl va mostrar que aquest variava significativament en funció del factor camp, el qual explicava un 67.5 % de la variabilitat de les dades (Taula 3.16). El contingut hídric de les mostres de la plantació adulta era significativament més elevat que el de les mostres recollides en el camp de pomeres joves.

Tanmateix, també es donava un efecte significatiu del mes de mostreig i de la dosi de reg aplicada sobre el contingut d'aigua del sòl els quals explicaven el 5.1 % i 3.4 % de la variabilitat, respectivament. Tot i que globalment, les mostres en les quals s'aplicava una quantitat d'aigua equivalent al 150 % de l'ETc presentaven continguts superiors a les de les altres dues tesis assajades, les quals no diferien significativament entre elles, l'anàlisi de cada camp per separat indicava que en cap dels dos camps s'obtenien diferències significatives ($P>0.05$) entre dosis si bé es mantenia en certa manera la mateixa tendència (Figura 3.17). Quant a l'estat hídric del sòl en els tres moments diferents de mostreig, es va observar que es donava una interacció significativa entre camp i mes de mostreig; això indicava que la variació en el contingut hídric del sòl durant el període d'irrigació diferia entre els dos camps assajats. L'aplicació de test de comparació múltiple de *REGWF* ($\alpha=0.05$) per a cada camp per separat mostrava que, en la plantació de pomeres joves, el contingut hídric del sòl del mes d'agost era significativament superior al de les mostres del mes de setembre; per contra, l'estat hídric del sòl del mes de juny no diferia de cap dels dos anteriors. En la plantació de pomeres adultes les mostres de l'agost i

el juny eren significativament diferents mentre que les del setembre no variaven de manera significativa de cap dels dos mesos anteriors. En cap de les dues plantacions es va observar una interacció significativa (P>0.05) entre dosi i mes de mostreig.

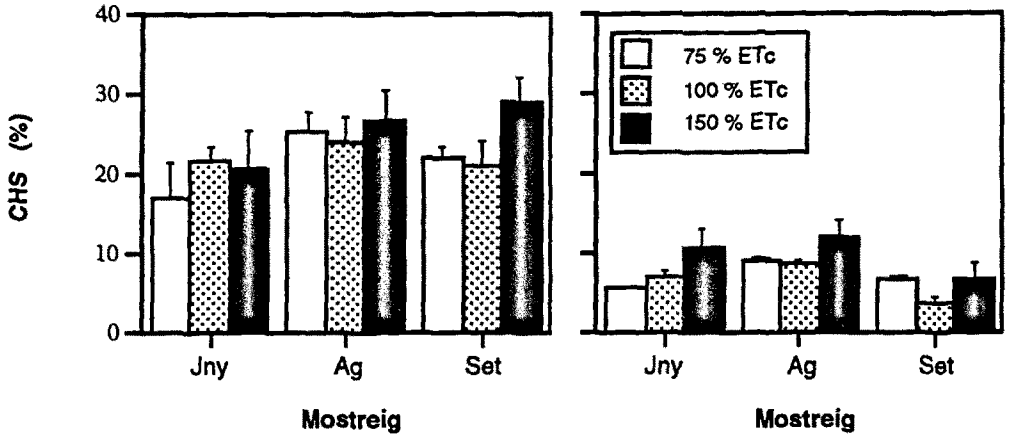

Figura 3.17 - Variació del contingut hídric del sòl durant el període d'irrigació en funció de la dosi de reg aplicada. Esquerra: plantació adulta; dreta: plantació jove. Les barres indiquen l'error estàndard (α=0.05).

El contingut de matèria orgànica del sòl estava afectat significativament pels factors camp i mes de mostreig, els quals explicaven el 44 % i el 15 % de la variabilitat de les dades, respectivament (Taula 3.16). El contingut de matèria orgànica en la plantació de pomeres joves era significativament inferior al de la plantació adulta. Malgrat no haver-hi un efecte significatiu de la dosi de reg sobre aquest paràmetre edàfic, la interacció significativa entre camp i dosi indicava que l'efecte de la dosi sobre el contingut de matèria orgànica era particular per a cadascuna de les plantacions. L'anàlisi de cada camp per separat mostrava que si bé en la plantació jove no es donava un efecte significatiu (P>0.05) de la dosi sobre el contingut de matèria orgànica, en el camp de pomeres adultes aquest era significativament més elevat en les parcel.les corresponents a la tesi del 75 % de l'ETc respecte a les del 100 % de l'ETc; per contra, en la dosi de reg del 150 % de l'ETc el contingut de matèria orgànica no diferia de cap de les dues tesis anteriors. A la Figura 3.18 es pot observar que dins de cada mostreig, en la plantació jove hi ha una tendència a què la tesi del 150 % de l'ETc presenti un valor mig de contingut de matèria orgànica més elevat.

També es va observar que en ambdues plantacions es donava una variació significativa durant el període de mostreig; en cap d'elles es va detectar una interacció significativa entre dosi de reg i mes. L'anàlisi estadística de les dades de cada mostreig per separat dins de cada camp indicava

que no es donaven diferències significatives entre dosis per a cap dels mostrejos realitzats. En el camp de pomeres joves, els mesos d'agost i setembre presentaven continguts de matèria orgànica significativament superiors al mes de juny. Per contra, en la plantació adulta, els continguts significativament més elevats es donaven al mes de setembre; entre els mesos de juny i agost el contingut de matèria orgànica no diferia de manera significativa. En aquesta plantació, la interacció entre dosi i mes no era significativa.

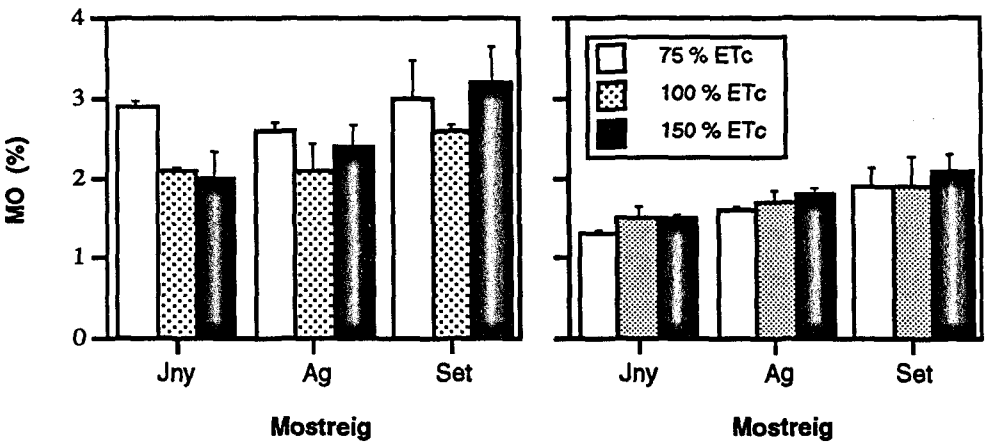

Figura 3.18 - Variació del contingut de matèria orgànica del sòl durant el període d'irrigació en funció de la dosi de reg aplicada. Esquerra: plantació adulta; dreta: plantació jove. Les barres indiquen l'error estàndard (α=0.05).

Finalment, el contingut de nitrats del sòl variava significativament en funció dels factors camp i mes de mostreig (Taula 3.16), els quals explicaven el 26 % i el 19 % de la variabilitat de les dades, respectivament. Per contra, tampoc hi havia un efecte significatiu de la dosi de reg. Tanmateix, les múltiples interaccions entre les diferents fonts de variació dificulten la interpretació dels resultats. La Figura 3.19 reflexa clarament la complexitat de la relació entre les diferents fonts de variació.

En ambdues plantacions, es donava una variació significativa en el contingut de nitrats durant el període d'irrigació. Tanmateix, la pauta de variació diferia entre elles. Mentre que a la plantació jove els continguts significativament més baixos es donaven a l'agost, en el camp de pomeres adultes els continguts significativament inferiors es detectaven al mes de setembre. En ambdues plantacions els altres dos mesos mostrejats no diferien significativament entre ells. A diferència del camp de pomeres adultes, en la plantació jove la dosi de reg aplicada tenia una efecte significatiu sobre el contingut de nitrats. Segons el test de separació de mitjanes de

REGWF (α=0.05), la dosi del 75 % de l'ETc presentava valors significativament inferiors als de les altres dues tesis assajades, les quals no diferien de manera significativa. En aquesta plantació, i malgrat el que s'observa en la Figura 3.19, dosi i mes de mostreig no interaccionaven significativament.

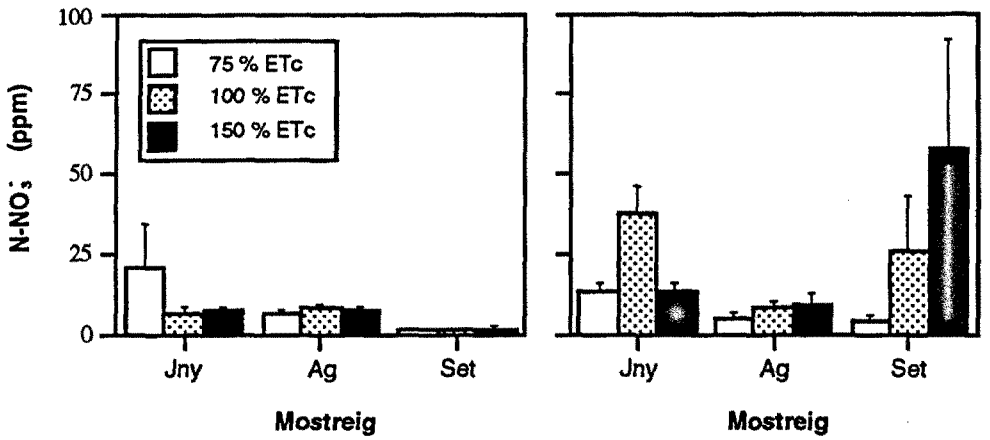

Figura 3.19 - Variació del contingut de nitrats del sòl durant el període d'irrigació en funció de la dosi de reg aplicada. Esquerra: plantació adulta; dreta: plantació jove. Les barres indiquen l'error estàndard (α=0.05).

3.1.3.1.3 Relació entre l'activitat potencial desnitrificant i els seus principals factors reguladors

L'assaig realitzat per determinar l'efecte de la dosi de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant i els seus principals factors reguladors en dues plantacions de pomera que diferien en l'edat de plantació va posar clarament de manifest la dificultat d'obtenir resultats concloents.

Tanmateix, una anàlisi de correlacions entre les diferents variables determinades (activitat potencial desnitrificant, contingut hídric, de matèria orgànica i de nitrats) per a cada camp per separat utilitzant el coeficient d'Spearman indicava que el contingut hídric del sòl era l'únic paràmetre edàfic determinat que estava correlacionat amb l'activitat potencial desnitrificant tant en la plantació de pomeres joves (r=0.4476; P=0.0192) com adultes (r=0.5270; P=0.0057). La variació dels valors d'activitat potencial desnitrificant en funció del contingut hídric del sòl es mostra a la Figura 3.20. A més, en les dues plantacions no s'establia cap altra correlació significativa entre les diferents variables determinades.

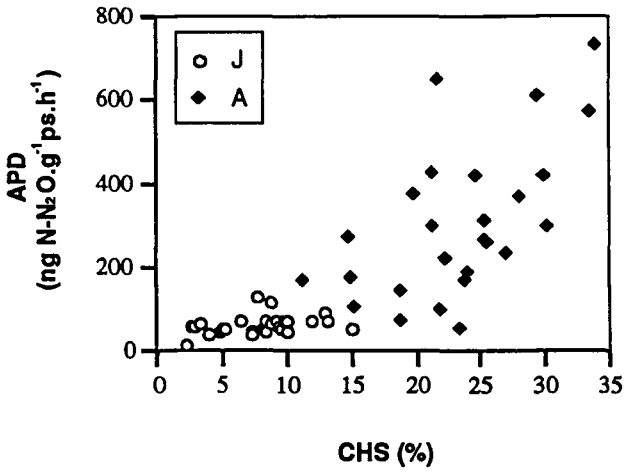

Figura 3.20 - Variació de l'activitat potencial desnitrificant (APD) en funció del contingut hídric del sòl en ambdues plantacions de pomera. J: plantació jove; A: plantació adulta.

3.1.3.2 Discussió

3.1.3.2.1 Efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant

En aquest estudi no es va observar un efecte significatiu de la dosi de reg aplicada sobre l'activitat potencial desnitrificant, almenys a les dosis assajades, ni globalment ni per a cada plantació per separat. En el camp de pomeres joves, els valors d'activitat potencial desnitrificant determinats eren baixos i similars per a les diferents tesis de reg i en qualsevol dels mostrejos realitzats. El baix contingut hídric determinat en qualsevol dels mostrejos i per a les diferents tesis assajades segurament era el principal factor que limitava la capacitat desnitrificant en el sòl d'aquesta plantació.

En la plantació adulta, l'elevada variabilitat entre repeticions d'un mateix tractament, especialment en la del 100 % de l'ETc, dificultaven l'elucidació d'un possible efecte de l'aplicació de diferents quantitats d'aigua al sòl. Tanmateix, es va observar que, en general, per a qualsevol mes mostrejat el valor mig d'activitat potencial desnitrificant corresponent a les parcel.les de la dosi del 75 % de l'ETc era més baix que aquell de la dosi del 150 % de l'ETc i que per ambdues dosis, en general, la variabilitat entre repeticions era relativament petita. Aquesta menor variabilitat en els valors d'activitat potencial desnitrificant en les tesis per sota i per sobre de l'agronòmicament correcta podria anar lligada al fet de què un contingut hídric al voltant de capacitat de camp és un valor crític en l'estimulació de l'activitat desnitrificant; segons De Klein i Van Logtestijn (1996) el valor de capacitat de camp seria el llindar per sota del qual l'activitat desnitrificant està fortament afectada. Donada la variabilitat textural observada en el sòl d'aquesta plantació, una variació en la permeabilitat del sòl podria comportar diferències en la grandària del bulb d'humectació entre les diferents parcel.les de repetició d'un mateix tractament. Aleshores, una mateixa quantitat d'aigua aplicada podria afectar el contingut hídric del sòl de manera que no sempre superés aquest llindar crític.

La dificultat d'observar diferències en l'activitat potencial desnitrificant entre les diferents dosis de reg assajades també pot explicar-se pel fet de què amb un sistema de reg localitzat d'elevada freqüència l'addició de diferents quantitats d'aigua al sòl pot traduir-se no només en una variació en el contingut hídric del sòl en el volum ocupat pel bulb d'humectació sinó també en diferències en la grandària d'aquest. Per tant, una major quantitat d'aigua afegida podria comportar un increment dels valors d'activitat potencial desnitrificant i/o un augment de la

superfície del sòl afectada per l'addició d'aigua. Tanmateix, és difícil valorar les implicacions que un i altre poden tenir des del punt de vista d'impacte ambiental.

En assajos de camp, l'efecte del reg pot quedar emmascarat per l'addició d'aigua al sòl a través de la pluja. Això és especialment important quan es determina l'activitat potencial desnitrificant donada la persistència dels enzims desnitrificants en el sòl (Groffman, 1985; Smith i Parsons, 1985). En la plantació de pomeres adultes, els efectes de la pluja podien tenir conseqüències més rellevants donat que aquest camp presenta problemes de drenatge.

Malgrat que no es va observar una variació significativa de l'activitat potencial desnitrificant durant el període de reg, en el camp de pomeres adultes el valor mig d'activitat potencial desnitrificant obtingut per a cada dosi aplicada al mes de juny era inferior al dels altres dos mesos mostrejats i els valors mitjos més elevats es donaven a l'agost; aquests coincidien amb continguts hídrics en el sòl superiors.

L'anàlisi estadística de les dades indicava que les característiques del sòl jugaven un paper principal en la regulació de la presència d'enzims desnitrificants en el sòl. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en el subcapítol anterior. En la plantació adulta, les pèrdues de N per desnitrificació podrien estar afavorides no només pels majors continguts hídrics i de matèria orgànica respecte a la plantació jove sinó també pel diferent tipus de sistema de reg utilitzat entre ambdues plantacions el qual pot afectar les emissions de N-gas via desnitrificació a través del tipus del bulb d'humectació que es genera. En la plantació de pomeres joves la utilització de degoters comportava una aplicació de l'aigua molt més localitzada, de manera que aquesta segurament es movia més en profunditat que lateralment, sobretot tenint en compte la seva textura grollera. Per contra, en la plantació adulta, on l'addició d'aigua al sòl es feia a través de microaspersors, la difusió lateral segurament predominava sobre el drenatge. Un augment de la superfície del sòl en condicions favorables per a l'activitat desnitrificant és important tenint en compte que la part superficial del perfil edàfic és principalment la responsable de les emissions de N-gas per desnitrificació.

Tot i que Rolston *et al.* (1982) observen que aplicacions d'aigua menys quantioses però més freqüents (tres vegades per setmana) comporten pèrdues de N per desnitrificació més grans que en irrigacions menys freqüents però en les què la quantitat d'aigua afegida era superior (1 vegada per setmana i 1 vegada cada dues setmanes), i independentment dels efectes sobre l'activitat potencial desnitrificant de l'aplicació de diferents dosis d'aigua a través d'un sistema de reg localitzat d'elevada freqüència, la reducció quant a superfície humectada que comporta la utilització d'un sistema d'aquest tipus segurament ha de suposar un gran avantatge respecte als

sistemes de reg convencionals des del punt de vista de les pèrdues de N-gas del sòl a l'atmosfera via desnitrificació.

De cares a l'impacte ambiental que poden tenir les possibles pèrdues de N-gas per desnitrificació quan s'utilitza un sistema de reg d'elevada freqüència, es pot esperar que les emissions en forma de N_2O siguin mínimes donat que l'activitat dels enzims desnitrificants depèn del règim hídric antecedent (Dendooven *et al.*, 1996a). Les diferències entre els enzims implicats en la desnitrificació quant a persistència en condicions aeròbiques i temps necessari per a la síntesi *de novo* una vegada s'han instaurat les condicions d'anaerobiosi juguen un paper molt important en l'emissió de N_2O en els cicles alternants d'humitejat-assecat (Dendooven i Anderson, 1994). La NO_3-reductasa desnitrificant s'activa ràpidament una vegada s'han instaurat les condicions d'anaerobiosi mentre que la N_2O-reductasa requereix un cert temps (Letey *et al.*, 1981). En aquest sentit, és probable que la N_2O-reductasa, molt sensible a la presència d'oxigen, estigui sempre activa en sòls amb un sistema de reg d'elevada freqüència almenys en les tesis de reg corresponents al 100 % de l'ETc o superiors. De fet, proves en el laboratori amb nuclis intactes de sòl extrets durant el període d'irrigació de les parcel.les experimentals corresponents a la dosi del 100 % de l'ETc incubats en condicions de recirculació sense i amb acetilè i als quals s'afegia o no aigua a l'inici de la incubació indicaven que la taxa desnitrificant podia incrementar fortament com a conseqüència de l'addició d'aigua mentre que aquesta no tenia pràcticament efecte sobre la taxa d'emissió de N_2O (resultats no publicats).

Tanmateix, l'aplicació conjunta d'aigua i adob en forma de nitrat pot modificar el patró d'emissió degut al fet de què elevades concentracions de nitrats inhibeixen la reducció de N_2O a N_2.

3.1.3.2.2 Efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre els principals factors reguladors de la desnitrificació

L'estudi de l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre els principals factors reguladors de la desnitrificació en dues plantacions de pomera, d'entrada, reafirmava les característiques diferencials entre els sòls d'ambdues plantacions, ja constatades en l'estudi de la variabilitat temporal de l'activitat potencial desnitrificant i d'alguns paràmetres edàfics relacionats amb la desnitrificació: la plantació de pomeres adultes es caracteritzava pels seus superiors continguts d'aigua i de matèria orgànica i menors de nitrats. Tanmateix, en aquest cas cal tenir present que les quantitats d'aigua i d'adob aplicats eren particulars per a cada camp.

A partir dels resultats obtinguts és difícil determinar una influència de l'aplicació de diferents quantitats d'aigua sobre les característiques del sòl. La variabilitat espacial del medi edàfic juntament amb les conseqüències que una major disponibilitat d'aigua pot comportar tant a la planta com als microorganismes edàfics són aspectes a considerar.

En aquest estudi només es va detectar un efecte significatiu de la dosi de reg aplicada sobre el contingut hídric del sòl; globalment les parcel.les corresponents a la dosi del 150 % de l'ETc presentaven un contingut d'aigua significativament superior. Tanmateix, l'anàlisi de cada camp per separat no va evidenciar un efecte significatiu de la dosi de reg. D'altra banda, tot i que amb un sistema de reg localitzat es pretén estar sempre en un percentatge hídric òptim d'aigua en el sòl, es va observar una variació significativa durant el període de mostreig la qual parcialment es pot atribuir al mètode de càlcul de l'aigua a aplicar diàriament.

No es va observar un efecte significatiu de l'aplicació de diferents quantitats d'aigua sobre el contingut de matèria orgànica del sòl. Malgrat això, la lleugera tendència a anar augmentant en incrementar la dosi d'aigua aplicada que es va observar en la plantació jove podria ser conseqüència de la influència d'una major disponibilitat d'aigua sobre el vigor de la planta; cal tenir en compte que en explotacions agrícoles comercials es controla tant la grandària de la planta com la càrrega de fruita. Per contra, en la plantació de pomeres adultes la dosi del 100 % de l'ETc era la que, en general, presentava valors més baixos de matèria orgànica. Sorprenen els relativament elevats continguts en la dosi corresponent al 75 % de l'ETc, sobretot tenint en compte que el contingut hídric era molt similar al de la dosi del 100 % de l'ETc. D'altra banda, l'increment significatiu del contingut de matèria orgànica del sòl durant el període d'irrigació segurament era degut a la purga i a la posterior caiguda de fruita durant el procés de maduració. Tot i que ha estat descrit que els cicles humitejat-assecat incrementen la disponibilitat de matèria orgànica, sistemes de reg d'elevada freqüència és probable que no tinguin pràcticament efecte, sobretot si es té en compte que una part considerable s'atribueix a la mort de biomassa microbiana (Bottner, 1985; Groffman i Tiedje, 1988). Amb un sistema de reg de freqüència diària segurament la població microbiana estarà adaptada a la fluctuació en el contingut hídric del sòl.

Quant al contingut de nitrats, les múltiples interaccions entre les diferents fonts de variació (camp, dosi i mes de mostreig) dificulten enormement la seva interpretació. En qualsevol cas, no es va detectar un efecte significatiu de la dosi aplicada sobre aquest paràmetre. En la plantació de pomeres joves sembla que la tesi de reg inferior presenta un valor mig de nitrats més baix. Això sorprèn donat que una major aportació d'aigua sembla que ha de comportar un efecte diluïdor de la concentració de nitrats. A més, una més gran disponibilitat d'aigua per part de la planta pot anar acompanyada d'uns majors requeriments de nutrients. D'altra banda, en la

plantació de pomeres joves una menor concentració de nitrats en la dosi de reg inferior segurament no està relacionada amb unes majors pèrdues per desnitrificació.

3.1.3.2.3 Relació entre activitat potencial desnitrificant i alguns factors reguladors

L'anàlisi de correlacions per a cada camp per separat entre els diferents paràmetres edàfics determinats en aquest assaig indicava que el contingut hídric del sòl era l'única variable correlacionada amb l'activitat potencial desnitrificant, malgrat no observar-se un efecte significatiu de la dosi de reg aplicada sobre aquesta. A més, en cap de les dues plantacions es donava una correlació entre contingut hídric del sòl i de matèria orgànica. Per tant, sembla que el contingut hídric del sòl pot actuar com a factor limitant de la capacitat desnitrificant del sòl durant el període d'irrigació malgrat que a una escala anual sigui la presència de matèria orgànica el principal factor regulador.

Donada la manca de relació entre contingut hídric del sòl i de matèria orgànica establerta en aquest assaig, l'estreta relació entre contingut hídric del sòl i activitat potencial desnitrificant podria anar lligada a una major adaptació dels microorganismes desnitrificants respecte a altres microorganismes edàfics a mesura que incrementa el contingut hídric del sòl. En aquest sentit, cal tenir present que en la plantació adulta el percentatge de porus ocupats per aigua (EPA) variava del 36 al 91 %. S'ha descrit que per sobre del 60 % de l'EPA es facilita el desenvolupament de condicions anaeròbiques les quals afavoreixen la desnitrificació; aquest llindar crític disminueix a mesura que la textura és més fina i a més la resposta en aquests sòls és més forta que en sòls de textura grollera (De Klein i Van Logtestijn, 1996; Linn i Doran, 1984; Nelson i Terry, 1996; Parsons *et al.*, 1991; Sexstone *et al.*, 1988).

En la plantació jove els valors pràcticament constants d'activitat potencial desnitrificant entre les diferents dosis de reg i durant tot el període d'irrigació també estarien d'acord amb l'existència d'un llindar crític per sota del qual un increment en el contingut hídric no té efecte. En aquesta plantació els valors de contingut hídric determinats en els diferents mostrejos corresponien a entre el 8 % i el 53 % d'espai porós ple d'aigua, un percentatge molt baix. Tot i que el mostreig no es realitzava immediatament després del reg sinó aproximadament al cap de 24 h i que, per tant, aquests percentatges augmentarien si la determinació es fes immediatament després de l'addició d'aigua, és probable que en el sòl de la plantació jove un augment del contingut hídric

no afectés o afectés molt poc la síntesi de nous enzims. Tanmateix, també cal recordar que en aquesta plantació el contingut de matèria orgànica és inferior.

Els resultats d'aquest estudi indiquen que les característiques texturals del sòl determinen en bona part l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de reg sobre l'activitat potencial desnitrificant els quals anirien lligats a l'estreta relació entre textura del sòl i continguts d'aigua i de matèria orgànica. Tanmateix, la diferent dinàmica hídrica lligada al diferent grau d'ombrejament sobre la superfície del sòl entre ambdues plantacions, jove i adulta, segurament també interfereix en els possibles efectes del reg sobre diferents paràmetres edàfics.

3.2 Efecte de l'Aplicació de Diferents Tipus i Dosis de Fertilitzant Nitrogenat sobre les Emissions de N_2O

En sòls agrícoles la pèrdua de nutrients del sistema a través de la collita és considerable. Si l'aigua no actua com a factor limitant, l'efecte de l'aplicació de fertilitzants sobre l'augment de la producció dels conreus és molt important, sobretot en climes càlids on els períodes de creixement són més llargs i la fotosíntesi més eficient. Tot i que el N no és l'únic nutrient essencial, la seva importància particular rau en una major influència sobre la producció vegetal: de tots els elements requerits per al creixement de les plantes, el N és el més mòbil i subjecte a unes pèrdues més grans del sistema sòl-planta, convertint-se en el nutrient que sovint limita el creixement dels cultius.

L'addició de N als sistemes agrícoles comporta una alteració del cicle global del nitrogen. En aquest sentit, diferents autors han observat que la fertilització nitrogenada estimula les emissions de N_2O (Aasen *et al.*, 1994; Arcara i Sparvoli, 1989; Aulakh *et al.*, 1984; Brams *et al.*, 1990; Bremner i Blackmer, 1978; De Groot *et al.*, 1994a, 1994b; Egginton i Smith, 1986; Jarvis *et al.*, 1991; Kaiser *et al.*, 1996; Skiba et al, 1993; van Cleemput *et al.*, 1994). S'assumeix que del 0.5 a l'1.5 % de l'adob nitrogenat es perd en forma de N_2O (Eichner, 1990). Tenint en compte això, l'aplicació de fertilitzants nitrogenats suposa una aportació de N_2O a l'atmosfera d'entre 0.14 i 3.0 Tg N.any^{-1} (Byrnes, 1990). Tanmateix, s'espera que la seva demanda augmenti amb el creixement demogràfic, sobretot tenint en compte que aquest es donarà pràcticament en països en desenvolupament, en els quals el nivell d'aplicació d'adobs és relativament baix. Mentre que s'espera que en els països desenvolupats la utilització de fertilitzants nitrogenats augmenti amb una taxa aproximada de l'1 % anual en les properes dècades, en els països en desenvolupament aquesta taxa serà de l'ordre del 4 % (Mosier, 1994). S'estima que la proporció de N_2O derivada dels fertilitzants passarà de l'aproximadament 13 % actual a entre un 19-22 % per l'any 2025 (Byrnes, 1990).

Des d'un punt de vista econòmic, les pèrdues de N dels fertilitzants nitrogenats en forma de N_2O són insignificants (Davidson *et al.*, 1996). Tanmateix, la seva magnitud és suficient com perquè l'impacte de la seva utilització sobre la qualitat de l'aigua i la pol.lució atmosfèrica sigui cada vegada més centre d'interès, apuntant els objectius de la recerca cap a una aplicació racionalitzada dels adobs nitrogenats. En aquest sentit, la filosofia de les pràctiques agronòmiques podria ser equiparar el subministrament de N a la demanda del conreu, intentat

minimitzar el *pool* de N vulnerable als processos de pèrdues, reduint la presència de nitrats en el sòl fora de l'estació de creixement; a més, la millora en l'eficiència d'utilització dels adobs nitrogenats també comportarà una disminució en les emissions del CO_2 produït durant els processos de fabricació dels adobs. Sembla que la producció i emissió de N_2O derivat dels fertilitzants no només depèn de les característiques del sòl i de les condicions climàtiques sinó també de les pràctiques agrícoles tals com tipus de fertilitzant, taxa d'aplicació, modes i temps d'aplicació, tipus de conreu, altres pràctiques de conreu tals com la irrigació (Arcara i Sparvoli, 1989; Eichner, 1990).

Els objectius d'aquesta part del treball eren:

a) estudiar l'efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats sobre les emissions de N_2O

b) determinar l'efecte sobre la taxa desnitrificant i la relació $N_2O/(N_2O+N_2)$ de l'aplicació de diferents tipus d'adob nitrogenat

c) estudiar l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de fertilitzant nitrogenat sobre les emissions de N_2O

Disseny experimental

L'estudi de l'efecte de l'aplicació de diferents tipus i dosis de fertilitzants nitrogenats sobre les emissions de N_2O es va realitzar amb mostra de sòl recollida en la plantació de pomeres adultes. Aquesta mostra estava formada per submostres corresponents a les diferents parcel.les de repetició del tractament de reg del 100 % de l'ETc. Donat que cada incubació durava aproximadament dotze dies, aquesta mostra inicial es va guardar a 4 °C durant el període que va durar l'assaig i es va fer un seguiment de la mostra durant el seu emmagatzemament. Prèviament a l'inici de cada incubació es varen determinar els següents paràmetres edàfics:

- contingut hídric del sòl
- contingut de N-mineral (nitrats i amoni)
- activitat potencial desnitrificant

Per assolir els objectius proposats es va procedir de la següent manera:

a) Per a la determinació de **l'efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats sobre les emissions de N_2O** es va incubar mostra alterada de sòl en condicions dinàmiques durant un període aproximadament de 12 dies en condicions controlades (20°C i 60% HR) portada a capacitat de camp amb un solució aquosa que contenia una quantitat tal d'adob nitrogenat que suposés l'addició de 100 ppm de N sobre una base de pes sec (2.2.1.1.2.a). Les diferents formes minerals nitrogenades assajades varen ser les més freqüentment utilitzades a la zona:
- nitrat amònic
- urea
- N32

Paral.lelament es va realitzar una incubació control, en la què la mostra de sòl es portava a condicions de capacitat de camp únicament amb aigua destil.lada.

b) Per a l'estudi de **l'efecte de l'aplicació de diferents tipus d'adobs nitrogenats sobre la taxa desnitrificant així com sobre la relació $N_2O/(N_2O+N_2)$** es va incubar mostra alterada de sòl en condicions d'anaerobiosi i a saturació durant 24 h, amb i sense acetilè (2.2.1.1.2.b2). Els adobs assajats varen ser:
- nitrat amònic
- urea
- N32

La quantitat d'adob afegida era l'equivalent a 100 ppm de N calculats sobre el pes sec de mostra. En aquest cas, també es va realitzar una incubació control amb l'addició únicament d'aigua destil.lada.

c) Per a la determinació de **l'efecte de l'aplicació de diferents dosis de fertilitzant nitrogenat sobre les emissions de N_2O** es va incubar mostra alterada de sòl en les mateixes condicions i durant un període de temps similar que per a l'estudi de l'efecte de diferents adobs nitrogenats sobre l'emissió de N_2O (objectiu a). Els tractament assajats varen ser:
- NO_3NH_4: 0, 25 i 100 ppm N
- N32: 0, 25, 50 i 100 ppm N

3.2.1 Resultats

3.2.1.1 Alteració de la mostra de sòl durant l'emmagatzematge

Des del moment de recollida de la mostra de sòl fins que va finalitzar l'assaig varen passar aproximadament uns 5 mesos. Durant aquest període la mostra es va guardar a baixes temperatures (4-5 °C) i, prèviament a l'inici de cada incubació, es varen fer unes determinacions analítiques les quals incloïen continguts d'aigua, de nitrats i d'amoni del sòl, i activitat potencial desnitrificant. El contingut de matèria orgànica inicial de la mostra era del 2.5 %.

Taula 3.17 - Variació de les característiques de la mostra de sòl durant el període d'emmagatzemament a baixes temperatures. NA: nitrat amònic; N32-s: N32 preparat al laboratori.

Dies post-recolecció	Tractament	CHS (%)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)	$N\text{-}NH_4^+$ (ppm)	APD (ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}$ ps. h^{-1})
0		22.9	5.0	4.1	260
20	100 ppm N-NA	22.9	2.6	3.5	267
36	100 ppm N-Urea	22.9	3.1	5.7	222
51	100 ppm N-N32	22.8	7.4	6.1	181
75	Control	22.6	7.8	4.3	205
107	25 ppm N-NA	22.8	7.0	3.3	251
120	25 ppm N-N32	22.7	8.3	4.1	210
135	46 ppm N-N32	22.6	8.0	3.5	225
150	100 ppm N-32s	22.7	7.8	2.1	

Els resultats obtinguts indiquen que el material de partida per a les diferents incubacions realitzades diferia només lleugerament (Taula 3.17). Mentre que el contingut hídric de la mostra es mantenia constant durant el període d'emmagatzemament, els altres paràmetres presentaven una certa fluctuació, sobretot en el cas del contingut de nitrats.

3.2.1.2 Efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats sobre les emissions de N_2O

Per a l'estudi de l'efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats (nitrat amònic, urea i N32) sobre les emissions de N_2O, tots els tractaments rebien una dosi de fertilitzant de 100 ppm de N referits a pes sec de mostra. A la Figura 3.21 es mostra la corba acumulativa d'emissió de N_2O durant el període d'incubació per als diferents adobs assajats juntament amb el d'una corba

control (0 ppm de N) en la qual la mostra es portava a les mateixes condicions d'humectació (capacitat de camp) únicament amb aigua destil.lada.

Per a l'anàlisi estadística dels resultats es va utilitzar com a paràmetre descriptor de cadascuna de les corbes d'incubació el pendent de la recta de regressió obtinguda amb les dades transformades logarítmicament a partir del moment en què la taxa màxima disminuïa. Per a qualsevol incubació, la recta obtinguda presentava un coeficient de determinació superior a 0.9. També es va considerar el valor de la taxa d'emissió de N_2O dos dies després de començar la incubació, com una mesura de la resposta inicial.

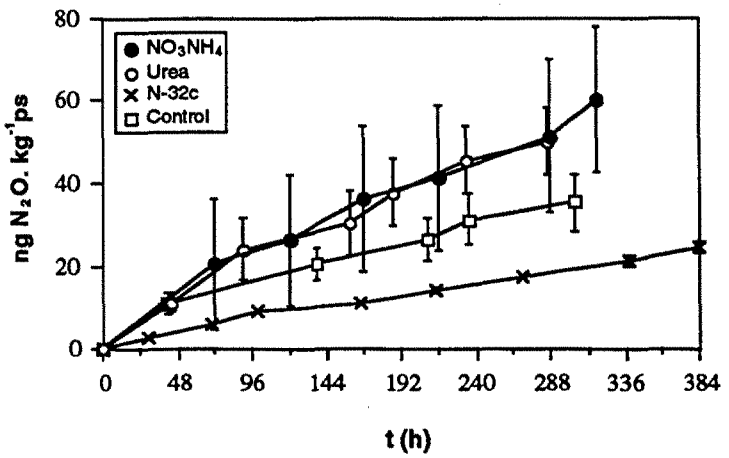

Figura 3.21 - Cinètica acumulativa del N_2O emès en aplicar 100 ppm de N en forma de diferents adobs al llarg del període d'incubació. Les barres representen la variabilitat entre repeticions (n=6).

Els resultats de l'anàlisi de la variància realitzada sobre els pendents indicaven que es donaven diferències molt significatives ($P<0.001$) entre els diferents tractaments. Aplicant el test de separació de mitjanes de *REGWF* ($\alpha=0.05$) s'obtenia que el pendent (b) de la recta en els tractaments amb nitrat amònic i urea (b=0.16 en ambdós casos) era significativament superior al del control (b=0.09) i el d'aquest al del tractament amb N32 (b=0.06).

D'altra banda, es va observar que també hi havia diferències significatives ($P<0.01$) en la taxa inicial entre els diferents tractaments. En el cas de les incubacions amb N32 les emissions de N_2O durant les primeres 48 h eren significativament inferiors a les dels altres tractaments, els quals no diferien entre ells.

3.2.1.3 Efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats sobre la taxa de desnitrificació i la relació $N_2O/(N_2O+N_2)$

Per tal d'obtenir informació sobre la proporció de N emesa en forma de N_2O via desnitrificació respecte a les emissions totals (N_2O+N_2) a través d'aquest procés es varen incubar estàticament mostres de sòl en condicions d'anaerobiosi durant 24 h amb i sense acetilè (10 % del volum lliure) a les que se'ls havia afegit 100 ppm de N referits a pes sec en forma de diferents adobs nitrogenats (NO_3NH_4, urea i N32).

L'anàlisi de la variància realitzada amb les dades d'emissió de N_2O log-transformades va mostrar que hi havia un efecte significatiu ($P<0.001$) del tractament sobre el paràmetre analitzat. En el cas de la urea, els nivells d'emissió eren significativament més baixos que els del control, i els d'aquest que els de les incubacions amb N32 i NO_3NH_4, els quals no diferien significativament ($P>0.05$) entre ells (Figura 3.22). L'anàlisi estadística de les pèrdues totals de N per desnitrificació (N_2O+N_2) va mostrar que també es donaven diferències significatives ($P<0.001$) en funció del tractament aplicat. En aquest cas, el NO_3NH_4 i N32 presentaven una taxa desnitrificant mitjana significativament més elevada que la urea i el control.

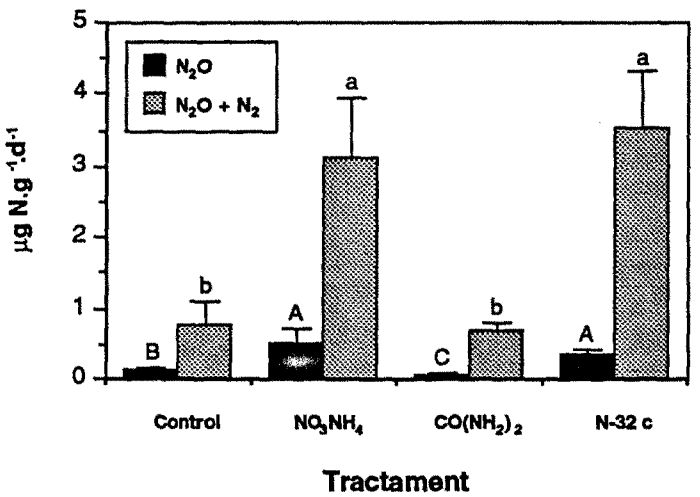

Figura 3.22 - Emissions de N_2O i N-gas (N_2O + N_2) degudes a l'aplicació de 100 mg de $N.kg^{-1}$ de sòl sec. Les barres mostren l'error estàndard. Les lletres majúscules corresponen als resultats obtingut en aplicar el test de separació de mitjanes de *REGWF* sobre les dades d'emissió d' N_2O, mentre que les minúscules fan referències a les dades de taxa desnitrificant. D'acord amb aquest test, lletres idèntiques indiquen que les mitjanes no són significativament diferents ($\alpha = 0.05$).

Pel què fa als efectes dels diferents tipus d'adobs sobre la proporció de N_2O emès respecte a les emissions de N-gas totals també es varen obtenir diferències significatives ($P<0.001$) entre

els tractaments. Segons els resultats obtinguts amb el test de separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05), el nitrat amònic (0.17) no diferia del control (0.16). Per contra, la urea reduïa significativament el valor de la proporció (0.08), mentre que el N32c (0.10) no era significativament diferent de cap dels dos.

3.2.1.4 Efecte de l'aplicació de diferents dosis de fertilitzant nitrogenat sobre les emissions de N_2O

a. Nitrat Amònic

A la Figura 3.23 es representen gràficament les pèrdues de N_2O al llarg del període d'incubació per als tractaments amb 0, 25 i 100 ppm de N en forma de nitrat amònic. El procediment seguit amb les dades obtingudes per a l'estudi de l'efecte de les diferents dosis aplicades és anàleg al de l'apartat 3.2.1.2.

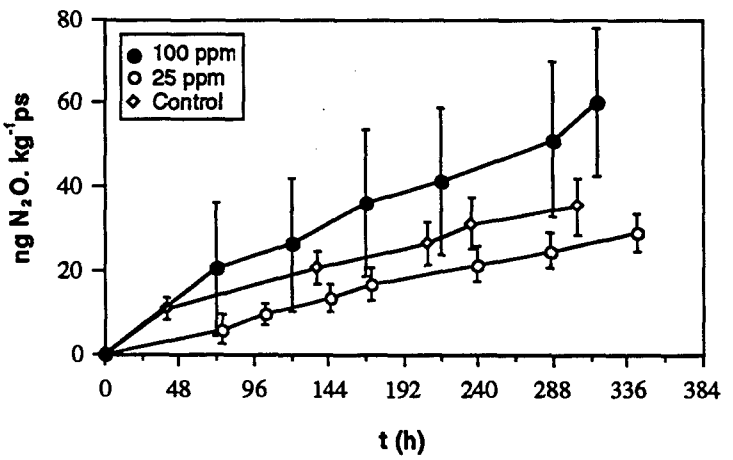

Figura 3.23 - Cinètica acumulativa del N_2O emès en aplicar diferents dosis de N en forma de nitrat amònic. Les barres representen la variabilitat entre repeticions (n=6).

Els pendents de les rectes obtingudes eren significativament diferents (P<0.001) entre les tres condicions assajades. Segons els resultats obtinguts aplicant el test de separació de mitjanes de *REGWF* (α=0.05) en les incubacions amb 25 ppm de N-nitrat amònic la taxa d'emissió de N_2O a partir del segon temps de mostreig no era significativament diferent a la del control. No es

varen detectar diferències significatives (P>0.1) en els valors de les pèrdues a les 48 h, malgrat que en la incubació amb 25 ppm de N semblaven ser inferiors.

L'efecte de l'aplicació de 100 ppm de N-NO_3NH_4 respecte al control ja ha estat comentat en l'apartat 3.2.1.2.

b. N32

La representació gràfica de les pèrdues de nitrogen en forma de N_2O durant el període d'incubació en afegir diferents quantitats de N32 va mostrar que les cinètiques d'incubació obtingudes diferien amplament en funció del tractament (Figura 3.24). Quan s'aplicaven 25 ppm de N la dinàmica s'aproximava a una cinètica sigmoidal, estabilitzant-se més o menys al voltant del quart dia. Per contra, per a la dosi superior (100 ppm de N) la taxa d'emissió de N_2O durant el període d'incubació es mantenia força constant. Amb la dosi intermitja les pèrdues de N_2O al llarg del temps inicialment seguien la mateixa tendència que quan s'aplicaven 100 ppm de N; tanmateix, al tercer dia d'incubació es donava un augment substancial de la taxa d'emissió de N_2O, el qual anava seguit d'una segona fase linear de major pendent que la primera. Aquest comportament diferencial va impedir el tractament estadístic de les dades.

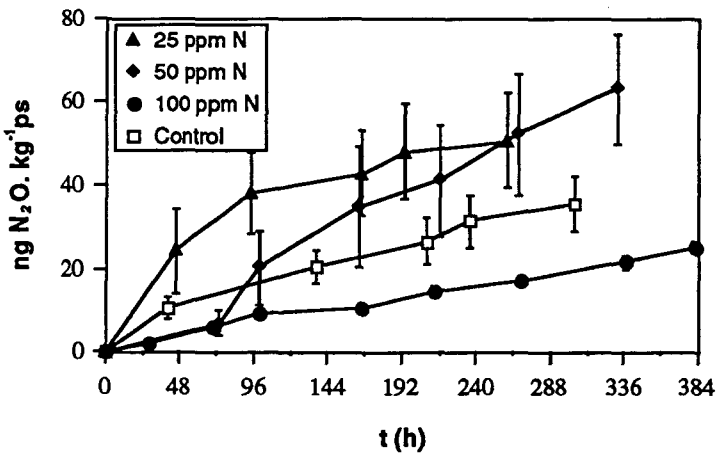

Figura 3.24 - Cinètica acumulativa del N_2O emès en aplicar diferents dosis de N en forma de N32. Les barres representen la variabilitat entre repeticions (n=6).

D'altra banda, es va observar que es donava una certa relació inversa entre pèrdues de N_2O i dosi d'adob aplicada. Això va fer pensar que en la solució comercial devia haver-hi alguna substància no especificada en la formulació comercial que inhibís algun dels processos implicats

en l'emissió de N_2O o bé que afavorís la seva reducció a N_2. Amb la incubació de mostra de sòl sota les mateixes condicions amb una solució nitrogenada de 100 ppm de N referits a pes sec preparada amb reactius de laboratori amb la mateixa proporció entre nitrogen nítric, ureic i amoniacal que en el N32 comercial s'obtenien taxes d'emissió molt superiors que en aplicar 100 ppm de N del preparat comercial i amb una cinètica molt similar a l'obtinguda en afegir 25 ppm de N-N32c (Figura 3.25).

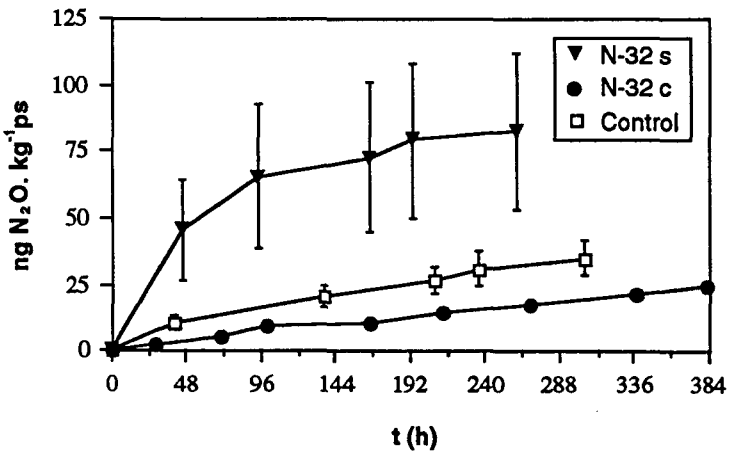

Figura 3.25 - Cinètica acumulativa del N_2O emès en aplicar diferents 100 ppm N en forma de N32 comercial i preparat al laboratori, juntament amb una incubació control. Les barres representen la variabilitat entre repeticions (n=6). N32-s: sintetitzat al laboratori; N32-c: comercial.

3.2.2 Discussió

3.2.2.1 Variació de les característiques de la mostra de sòl durant el període d'emmagatzematge

El seguiment d'algunes característiques de la mostra de sòl durant el seu emmagatzemament en condicions de refrigeració va evidenciar que el seu potencial desnitrificant es mantenia durant aquest període. Altres autors també observen que l'activitat potencial desnitrificant no varia massa en aquestes condicions, almenys durant un període d'un mes (Breitenbeck i Bremner, 1987) però contrasta amb l'observat per Luo *et al.* (1996). També va posar de manifest una certa variació en el contingut tant d'amoni com de nitrats. En el primer cas, el patró de fluctuació no seguia una pauta massa clara; per contra, el contingut de nitrats tenia tendència a augmentar. Globalment, això pot indicar que la nitrificació i probablement la mineralització de la matèria orgànica es donaven a temperatures de refrigeració. Això també ha estat observat per altres autors (Limmer i Steele, 1982; Luo *et al.*, 1996). L'increment en el contingut de nitrats també indicava que, en aquestes condicions, es mantenia l'activitat de *Nitrobacter* tot i estar descrit que és molt més sensible que *Nitrosomonas* a baixes temperatures (Bouwman, 1990b). Tanmateix, i pel que fa als objectius d'aquest treball, és important remarcar que la concentració de N-mineral a l'inici de cada incubació era suficientment baixa com per no emmascarar l'efecte dels tractaments aplicats.

3.2.2.2 Efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats sobre les emissions de N_2O

El mètode d'incubació utilitzat per a l'estudi de l'efecte de l'aplicació de diferents tipus i dosis d'adob nitrogenat sobre les pèrdues de N_2O no ha estat massa freqüentment emprat per altres autors. En la majoria de casos, els estudis s'han realitzat *in situ* fent un seguiment durant varis anys (Arcara i Sparvoli, 1989; Arcara *et al.*, 1990). Tanmateix, sembla que és útil quan els objectius principals es centren en la determinació de la resposta d'un o més sòls a l'addició de fertilitzants, minerals o orgànics, ja que permet realitzar incubacions en condicions controlades durant un període de temps relativament llarg (superior a 24 h) sense que l'acumulació de N_2O en l'atmosfera d'incubació dificulti la seva difusió (Arcara, 1988).

En l'assaig realitzat per estudiar l'efecte de l'addició de diferents tipus d'adob nitrogenat sobre les pèrdues de N en forma de N_2O es va obtenir que en el tractament control (0 ppm de N afegides) l'increment del contingut d'aigua de la mostra a l'inici de la incubació segurament estimulava les emissions de N_2O. En aquest tractament la taxa màxima d'emissió es va donar durant les 48 h després de l'addició d'aigua; a partir d'aquest moment disminuïa bruscament i es mantenia pràcticament constant fins al final de la incubació. Aquests resultats estarien d'acord amb aquells autors que mantenen que un increment del contingut hídric del sòl augmenta les pèrdues de N-gas per desnitrificació durant períodes molt breus després de l'addició d'aigua (Rolston *et al.*, 1982; Ryden i Lund, 1980; Sexstone *et al.*, 1985). Ryden i Lund (1980) també detecten pics màxims d'emissió entre les 24-48 h després de la irrigació. Aquest pic d'emissió de N_2O després de l'addició d'aigua al sòl està relacionat amb les diferències entre els enzims implicats en la desnitrificació quant a persistència en sòl en condicions aeròbiques i temps necessari per a la síntesi *de novo* una vegada s'han instaurat les condicions d'anaerobiosi (Dendooven i Anderson, 1994).

L'aplicació conjunta d'aigua i adob en forma de nitrat amònic o urea incrementava significativament la taxa d'emissió de N_2O després del pic inicial respecte al control, la qual es mantenia fins al final de la incubació. Tenint en compte que en ambdós casos s'afegia directament o indirecta amoni al medi, aquest increment en la taxa d'emissió podria anar lligat a una acumulació de nitrits el qual podria ser utilitzat com a substrat pels microorganismes desnitrificants. En aquest sentit, se sap que un increment en el contingut d'amoni pot inhibir en major grau l'activitat de *Nitrobacter* (Smith *et al.*, 1997). Donat el caràcter bàsic de la solució del sòl és més fàcil que es doni una acumulació de nitrits que no pas un augment de compostos gasosos de N degut a la seva descomposició química (Van Cleemput, 1984).

Tanmateix, urea i nitrat amònic diferien en el seu comportament durant els primers dies d'incubació. En aquest període, la urea seguia una pauta pràcticament idèntica a la del control amb una variabilitat entre repeticions molt petita. El substrat disponible inicialment en la mostra de sòl incubada amb 100 ppm de N en forma de urea era el mateix que en el control donat que, tot i que es considera un fertilitzant amoniacal, prèviament a trobar-lo com a tal s'ha de produir la seva hidròlisi. També es va observar que tot i que aquesta hidròlisi és una reacció de caràcter bàsic, l'augment de pH sembla que no afavoria la reducció del N_2O a N_2, almenys en aquestes condicions d'incubació. Per contra, les incubacions amb nitrat amònic presentaven una gran variabilitat en la primera presa de mostra. L'addició d'aquest tipus de fertilitzant a la mostra incubada suposava un increment de substrat considerable tant per microorganismes nitrificants com desnitrificants el qual podia estimular l'activitat d'ambdós, sobretot tenint en compte que l'assaig es realitzava en condicions de capacitat de camp. Aquesta variabilitat més gran també es

podria explicar per la major complexitat de la situació ja que l'efecte d'un increment de la concentració de nitrats i de l'acidificació del medi com a conseqüència de l'activitat nitrificant pot afectar la proporció de $N_2O/(N_2O+N_2)$.

Globalment, aquests resultats concorden amb aquells autors que mantenen que en condicions d'humitat relativament elevada i pH bàsic el flux més elevat de N_2O es dóna durant la primera setmana seguint l'aplicació de l'adob; per contra, en sòls de pH poc àcid o neutre sembla que s'assoleix aproximadament al cap de dues setmanes (Bremner i Blackmer, 1978; De Groot *et al.*, 1994b; Velthof *et al.*, 1994a). Alguns autors han observat un pic d'emissió de N_2O dues setmanes després del subministrament d'urea i lligat a una acumulació de nitrits (Arcara *et al.*, 1990; Byrnes *et al.*, 1990; Christianson *et al.*, 1979).

La reducció de la taxa d'emissió de N_2O en les incubacions amb N32 respecte al control no es pot atribuir a una estimulació de la reducció de N_2O a N_2 conseqüència de l'increment de pH que suposa la hidròlisi de la urea, donat el similar comportament inicialment entre el tractament amb urea i el control. Més aviat, sembla que aquesta disminució en l'emissió de N_2O és deguda a la inhibició d'algun dels processos involucrats en l'emissió de N_2O. Així ho confirma el tractament amb una solució de 100 ppm de N-N32 preparada amb reactius de laboratori. Donat que en l'assaig en condicions estàtiques es va observar que l'addició de N32 no inhibia la desnitrificació, aquests resultats podrien indicar que realment en els diferents tractaments assajats les pèrdues de N_2O no només serien degudes a la desnitrificació sinó que la nitrificació també podria jugar-hi un paper important directament o indirecta.

En els tractaments amb 100 ppm de N en forma de nitrat amònic o urea la quantitat de N perdut en forma de N_2O 12 dies després de l'inici de la incubació representava aproximadament el 0.02 % del N aplicat. És d'esperar que allargant el temps d'incubació s'incrementi lleugerament. Tot i això aquest percentatge és molt baix. En aquest sentit, Eichner (1990) determina que un rang de variació de 0.04 a 1.71 pel nitrat amònic i de 0.07 a 0.18 per la urea. En qualsevol cas, els valors més freqüentment observats són inferiors a l'1 % (Aasen *et al.*, 1994; Aulakh *et al.*, 1984; Bremner i Blackmer, 1978; Byrnes *et al.*, 1990; Duxbury i McConnaughey, 1986; McTaggart *et al.*, 1994; Mosier *et al.*, 1981; Mosier *et al.*, 1982; Ryden, 1981; Smith i Patrick, 1983; Velthof i Oenema, 1994b).

3.2.2.3 Efecte de l'aplicació de diferents fertilitzants nitrogenats sobre la taxa de desnitrificació i la relació $N_2O/(N_2O+N_2)$

La concentració d'acetilè que inhibeix el pas de N_2O a N_2 per desnitrificació repercuteix negativament en l'activitat nitrificant. Per tant, la seva utilització només es considera vàlida per a mesures de curta durada o bé en aquelles situacions en les què només s'ha aplicat NO_3^-. Per tal de conèixer la proporció de N_2O emès respecte al total (N_2+N_2O) per desnitrificació es va realitzar una incubació en condicions anaeròbiques durant 24 h.

Dels resultats obtinguts en aquest estudi es pot deduir que l'addició de NO_3NH_4 o de N32 comportava un augment significatiu tant de la taxa d'emissió de N_2O via desnitrificació com de les emissions totals (N_2O+N_2) a través d'aquest procés respecte al control, indicant que els nitrats actuaven com a factor limitant. Per contra, la urea no tenia cap efecte sobre la taxa desnitrificant ja que, tot i que la seva hidròlisi es pot donar en condicions anaeròbiques, la nitrificació és un procés aerobi. Per tant, en aquest cas l'únic NO_3^- susceptible de ser desnitrificat era el present en la mostra a l'inici de la incubació.

La relació $N_2O/(N_2O+N_2)$ obtinguda en el tractament amb nitrat amònic no era significativament diferent a la del control malgrat que elevades concentracions de nitrats tendeixen a afavorir aquesta relació. Tanmateix, cal tenir en compte que l'efecte dels nitrats sobre aquesta proporció s'incrementa en disminuir el pH. L'estimulació de la reducció del N_2O a N_2 en el tractament amb urea respecte al control pot ser una conseqüència de la reacció bàsica de la seva hidròlisi. El fet de què en la incubació amb N32 el valor d'aquesta relació no diferís significativament dels corresponents a les incubacions amb nitrat amònic i urea podria ser deguda a què ambdós es troben en la seva composició.

3.2.2.4 Efecte de l'aplicació de diferents dosis de fertilitzant nitrogenat sobre les emissions de N_2O

a. Nitrat amònic

La cinètica acumulativa de les pèrdues de N_2O corresponent a la dosi de 25 ppm de N en forma de nitrat amònic no diferia significativament del control. Malgrat això, les pèrdues eren lleugerament inferiors, fet que no deixa de sorprendre. Si bé és cert que altres autors han observat que es donen relacions N_2O/N-fertilitzant molt més grans quan s'afegeixen quantitats

elevades de N (400 ppm) que a 50-100 ppm (Bremner i Blackmer, 1978; Jarvis *et al.*,1991), no és d'esperar que sigui inferior al control. Tot i que és probable que la disponibilitat de C hagi disminuït durant el període d'emmagatzemament de la mostra, aquesta manca de resposta inicial pot ser deguda a alguna errada a l'inici de la incubació. Quant a la dosi de 100 ppm de N, el seu comportament ja s'ha comentat en l'apartat 3.2.2.2.

b. N32

Els resultats obtinguts en incubar mostra de sòl amb diferents dosis de N32 semblen corroborar la presència d'un agent retardant en la solució nitrogenada ja que quant més baixa és la dosi d'adob aplicada més elevada és la taxa d'emissió de N_2O inicial. A més, la cinètica de la dosi de 50 ppm de N presenta un comportament intermig entre la dosi de 25 ppm i la de 100 ppm, en funció del temps d'incubació. En aquest sentit, sembla que l'efecte inhibidor a aquesta dosi aplicada s'aturava aproximadament al tercer dia. A partir d'aquest moment la taxa d'emissió s'incrementava considerablement i es mantenia fins al final del període incubació. A l'acabament de l'assaig, les pèrdues acumulades eren superiors a les de la dosi de 25 ppm. D'altra banda, cal remarcar que en el tractament amb 25 ppm les pèrdues de N_2O després de 12 dies d'incubació eren del mateix ordre que en les dosis de 100 ppm de nitrat amònic i urea. Globalment, el N32 té un comportament particular que no s'acaba d'explicar.

La corba acumulativa del tractament amb 25 ppm de N-N32 de la solució comercial és molt similar a la de 100 ppm N-N32 de la solució preparada al laboratori. En ambdues, la resposta inicial és molt intensa però l'emissió de N_2O s'atura pràcticament al quart dia d'incubació. Tanmateix, s'observa una relació inversa entre quantitat aplicada i el % de N en forma de N_2O respecte al total aplicat; mentre que en afegir 25 ppm aquest percentatge pren un valor aproximat de 0.18 en les incubacions amb 100 ppm és de 0.05, un valor lleugerament superior a l'obtingut aplicant 100 ppm de N ja sigui en forma de nitrat amònic o bé d'urea. Aquesta relació inversa podria indicar que la quantitat de N_2O emès en resposta a l'addició combinada d'aigua i adob nitrogenat no és proporcional a la concentració d'adob. Tot i això, cal tenir present la diferent puresa de les dues solucions utilitzades.

CAPÍTOL 4

Emissió de N_2O i Desnitrificació en Ecosistemes Naturals. Relació amb alguns Paràmetres Edàfics

Malgrat que hi ha relativament pocs estudis sobre emissions gasoses de N en forma de N_2O en sòls naturals en comparació amb sòls agrícoles, un 20 % de les emissions globals d'aquest compost i un 50 % de les emissions totals (N_2O + N_2) provenen de les emissions d'ecosistemes terrestres naturals (Bowden, 1986). Tanmateix, aquestes emissions poden ser molt diverses en funció de la comunitat vegetal així com la proporció de N emès en forma de N_2O respecte a les emissions totals. Altres factors formadors com la matriu litològica i el clima també poden incidir en les emissions.

Un altre aspecte interessant d'aquests ecosistemes és la seva heterogeneïtat espacial la qual comporta una elevada variabilitat en les taxes d'emissió de N-gas degut a la natura dinàmica dels processos implicats. S'ha suggerit que la variabilitat en les taxes d'emissió de N_2O és considerablement més elevada quan la desnitrificació n'és el principal procés responsable ja que part d'aquesta variabilitat és deguda a la gran variació en la fracció del flux de gasos total que es perd en forma de N_2O.

Aprofitant la riquesa paisatgística de la nostra àrea d'estudi es varen definir com a principals objectius d'aquesta part del treball:

a. establir una funció empírica per a la predicció de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació a partir d'alguns dels principals factors reguladors proximals quan es treballa amb un rang de condicions del medi edàfic ampli.

b. determinar les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació, analitzar la seva variabilitat espacial i relacionar-la amb alguns paràmetres edàfics en dos sòls de fageda que diferien en el material originari.

4.1 Taxes d'Emissió de N_2O i de Desnitrificació en Ecosistemes naturals. Factors Reguladors

Estudis amb cultius purs o en condicions de laboratori han elucidat la regulació a nivell cel.lular dels processos involucrats en les emissions de N_2O, bàsicament nitrificació i desnitrificació, així com de la proporció de N perduda en forma de N_2O a través de cadascun d'ells. Tanmateix, hi ha una gran dificultat a l'hora d'establir quins són els principals factors reguladors en el medi edàfic. La natura dinàmica d'aquests processos microbians -conseqüència dels múltiples factors reguladors que interactuen- comporta una elevada variabilitat espacial i temporal de les emissions de N_2O (Groffman i Tiedje, 1989a; 1989b; Myrold, 1988; Parkin, 1987; Parkin *et al.*, 1987; Parsons *et al.*, 1991), que limiten la capacitat de quantificar-les i dificulten el desenvolupament de relacions predictives entre aquestes emissions i els principals factors reguladors. El fet de que el factor controlador principal pugui variar al llarg del temps i entre hàbitats, el requeriment de condicions contrastants per als dos processos responsables -aeròbies per a la nitrificació i anaeròbies o baixa disponibilitat d'O_2 per a la desnitrificació- però amb un efecte contrari d'aquests requeriments sobre la producció de N_2O per cada procés, i la resposta d'histèresi de la desnitrificació enfront el contingut d'aigua del sòl (Groffman i Tiedje, 1988) compliquen fortament la predicció de les emissions de N_2O. Per aconseguir-ho, s'haurien de caracteritzar un nombre de situacions diferents, des de diferències en el contingut d'oxigen a escala de microzona, que poden permetre que nitrificació i desnitrificació es donin simultàniament en punts molt propers, fins a inundacions prolongades del sòl les quals poden limitar la desnitrificació si comporta una disminució significativa de la disponibilitat de nitrats.

La majoria d'estudis s'han realitzat en sòls de conreu degut a un interès bàsicament de tipus econòmic; la menor heterogeneïtat *a priori* del medi edàfic en aquests sistemes, que facilita el treball científic, també ha estat un aspecte amplament considerat (Linn i Doran, 1984; Rolston *et al.*, 1984). Tanmateix, els resultats obtinguts en sòls agrícoles no es poden extrapolar als ecosistemes naturals ja que la regulació de les emissions pot diferir substancialment. Les pràctiques de conreu (aplicació d'aigua de reg, fertilització, treball de la terra,...) poden tenir importants conseqüències sobre les fonts de producció i consum de les diferents formes de N-gas.

A més, generalment els estudis destinats a anar elucidant la regulació de les taxes d'emissió de N-gas via nitrificació i desnitrificació s'han realitzat en àrees relativament petites (a escala de parcel.la) en les que, malgrat la variabilitat espacial inherent a qualsevol sòl, dins de cadascuna

d'elles es cobreix un ventall de condicions del medi edàfic limitat. El nombre d'estudis publicats disminueix a mesura que augmenta l'escala d'investigació. Alguns intents s'han fet a escala de *landscape*, utilitzant les classes textural i de drenatge com a paràmetres de predicció de les pèrdues per desnitrificació (Groffman i Tiedje, 1989a; 1989b) o bé considerant les diferents subunitats geomorfològiques (Elliott i de Jong, 1992; Pennock *et al.*, 1992; Van Kessel *et al.*, 1993); tots ells són considerats factors de regulació distals dels processos implicats en les emissions de N-gas. A mesura que l'escala de treball s'incrementa aquests factors juguen cada vegada un paper més important en les pèrdues de N-gas del sòl a l'atmosfera. Tanmateix, cal tenir present l'estreta relació existent entre ambdós tipus de factors, distals i proximals.

La idea central d'aquesta part del treball és intentar establir una funció empírica per a la predicció de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació a partir d'alguns dels principals factors reguladors proximals quan es treballa amb un rang de condicions del medi edàfic ampli. La considerable riquesa paisatgística de les nostres contrades conseqüència de la gran diversitat climàtica, geològica i geomorfològica fa que aquesta zona sigui un marc força idoni quan es pretén aprofundir en la regulació de les taxes d'emissió de N-gas del sòl a l'atmosfera a una escala més global. A partir d'aquí, els objectius d'aquesta part del treball es varen concretar en:

a. Determinar a escala global els principals factors reguladors proximals de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació en sòls naturals i intentar trobar una relació funcional per predir aquestes taxes.

b. Determinar a escala global els principals factors reguladors proximals de l'activitat potencial desnitrificant en sòls naturals i establir si aquest paràmetre millora la capacitat predictiva de les taxes actuals d'emissió d'N_2O i de desnitrificació.

Disseny experimental

Per tal d'assolir els objectius proposats es varen escollir 14 zones de mostreig diferents en funció del material originari, la vegetació i les condicions climatològiques. Totes elles estaven localitzades al N-E de la Península Ibèrica, concretament a les comarques de Girona.

a. Per **determinar els principals factors reguladors proximals de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació i intentar trobar una funció empírica per predir aquestes taxes** es varen recollir a cadascuna de les zones

escollides 5 nuclis intactes de sòl de 10 cm de profunditat i es varen incubar a 20 °C durant 24 h en condicions estàtiques (apartat 2.2.1.1.1.b1) sense i amb acetilè (10 % del volum lliure). Paral.lelament es recollia mostra alterada de sòl de la zona immediatament circumdant a cada nucli extret per a la determinació del contingut hídric, de matèria orgànica, nitrogen total, relació C/N, continguts de nitrats i d'amoni.

b. Per a la **determinació dels principals factors reguladors proximals de l'activitat potencial desnitrificant** (apartat 2.2.1.1.2.c) **i establir si aquest paràmetre millorava la capacitat predictiva de les taxes d'emissió de N-gas** es va determinar aquest paràmetre en 7 de les 14 zones escollides inicialment.

4.1.1 Resultats

4.1.1.1 Característiques de les zones

Les zones mostrejades es varen escollir fonamentalment en base al tipus de material originari sobre el que s'havia format el sòl i la vegetació que suportava; la climatologia en alguns casos quedava prefixada tot i que es va intentar abarcar tant zones sotmeses a un clima típicament mediterrani com a clima subalpí (apartat 2.1.2). Des del punt de vista del material originari es va considerar si era silícic àcid (SiO_2>55%), silícic bàsic (SiO_2<55%) o bé material calcari. Pel què fa a la comunitat vegetal es varen mostrejar comunitats herbàcies i comunitats forestals, en aquest cas tant caducifòlies com perennifòlies.

4.1.1.1.1 Característiques físico-químiques del sòl

Les característiques físico-químiques de les mostres de sòl recollides en cadascuna de les zones es mostren a la Taula 4.1.

Es pot observar que hi havia un predomini de zones en les que la part del perfil edàfic mostrejada presentava un caràcter àcid. Només en tres zones el pH de la solució era proper a la neutralitat; en qualsevol d'elles, el sòl s'havia desenvolupat sobre una matriu calcària i suportava una vegetació de tipus herbaci. Cal destacar els valors extremadament àcids determinats a la fageda del Puigneulós.

Pel que fa al contingut hídric, les zones on es donaven els valors més baixos es caracteritzaven per presentar un vegetació típicament mediterrània (alzinar i sureda). Per contra, en les dues zones lacustres el grau d'humitat present en el medi edàfic era molt elevat.

Els continguts més elevats de matèria orgànica estaven associats als ambients més humits (prats d'alta muntanya i fagedes). Les característiques qualitatives de la matèria orgànica sembla que estarien relacionades amb el tipus de vegetació. En general, la matèria orgànica dels sòls de les zones amb vegetació herbàcia es caracteritzava per presentar una major proporció de N respecte al contingut en C que en les diferents comunitats forestals mostrejades.

Taula 4.1. - Valor mig i rang de variació (*) dels diferents paràmetres físico-químics determinats en cadascuna de les zones mostrejaes. CHS: contingut hídric; MO: matèria orgànica; Nt: nitrogen total; C/N: relació C/N.

	Característiques Físico-Químiques						
Comunitat vegetal	**pH**	**CHS (%)**	**MO (%)**	**Nt (%)**	**Relació C/N**	**N-NO_3^- (ppm)**	**N-NH_4^+ (ppm)**
Veg. Lacustre							
Estanys de La Jonquera	5.4 (5.2-5.7)*	64.3 (32.2-88.8)	8.5 (5.4-11.8)	0.37 (0.19-0.52)	12.7 (9.6-16.4)	5.1 (0.0-20.4)	30.6 (12.1-52.0)
Aiguamolls de Vilaüt	6.9 (6.8-7.0)	74.8 (65.8-82.3)	11.2 (6.7-15.4)	0.66 (0.57-0.81)	8.8 (6.3-10.9)	31.1 (0.0-50.2)	7.6 (3.2-13.3)
Prat							
La Pastuïra	4.9 (4.6-5.1)	29.3 (20.5-36.5)	18.7 (15.8-23.2)	0.98 (0.80-1.22)	9.6 (8.4-10.2)	14.2 (11.2-19.0)	6.5 (3.3-15.7)
Setcases-Vallter	5.1 (4.9-5.1)	27.5 (12.3-35.2)	14.0 (7.6-19.6)	0.73 (0.45-1.19)	10.1 (8.2-12.0)	9.8 (0.6-24.1)	7.0 (0.3-11.7)
Oix-Beget	6.9 (6.8-7.1)	13.4 (11.8-14.4)	3.9 (2.6-7.7)	0.38 (0.30-0.43)	8.8 (5.1-10.6)	1.7 (0.8-2.9)	3.2 (2.0-4.2)
Coll de Merolla	7.2 (6.7-7.4)	18.6 (13.0-28.2)	7.8 (4.9-15.6)	0.45 (0.29-0.83)	9.6 (9.3-9.9)	4.6 (0.8-13.3)	7.1 (3.8-10.0)
Bosc mixt							
Massanet de La Selva	5.0 (4.3-5.9)	23.9 (14.6-33.0)	14.5 (6.0-22.1)	0.43 (0.24-0.56)	16.8 (13.5-21.3)	1.1 (0.0-4.1)	15.1 (5.2-25.6)
Alzinar							
Adri	5.6 (5.0-5.9)	12.9 (10.3-15.2)	7.9 (6.4-10.0)	0.30 (0.23-0.39)	14.9 (11.9-17.8)	0.0 (0.0-0.0)	5.3 (4.3-6.0)
La Crosa de St. Dalmai	5.7 (5.4-6.2)	14.6 (10.2-18.4)	8.0 (6.4-12.2)	0.33 (0.25-0.42)	13.4 (12.1-14.9)	8.0 (6.4-12.2)	11.6 (4.8-24.0)
Sureda							
St. Hilari Sacalm	5.1 (4.7-5.4)	6.3 (3.6-8.5)	5.9 (2.7-11.4)	0.20 (0.15-0.27)	15.3 (10.0-21.1)	0.2 (0.0-0.4)	7.3 (5.1-10.4)
St. Grau d'Ardenyà	5.5 (4.7-5.9)	6.6 (3.5-11.4)	4.6 (2.5-6.3)	0.20 (0.11-0.25)	13.0 (11.8-15.0)	0.3 (0.0-0.8)	5.0 (2.2-9.1)
Fageda							
Puigneulós	4.0 (3.9-4.1)	25.6 (14.3-33.0)	14.3 (10.3-23.0)	0.40 (0.32-0.47)	17.4 (16.1-20.2)	0.7 (0.0--1.2)	9.9 (6.6--13.6)
St. Martí del Corb	5.3 (5.1-5.7)	37.6 (13.0-45.6)	20.2 (15.3-23.0)	0.80 (0.73-0.83)	12.6 (10.4-13.9)	6.3 (0.0-13.2)	7.1 (3.3-11.4)
d'en Jordà	5.4 (5.1-6.0)	34.8 (8.2-45.0)	19.9 (10.9-24.5)	0.64 (0.20-0.96)	17.6 (12.8-27.2)	1.2 (0.0-3.5)	9.2 (3.0-22.1)

El contingut de nitrats del sòl també podria anar lligat al tipus de vegetació; els nivells més alts es donaven en les zones amb vegetació herbàcia. Només en una zona (alzinar d'Adri) no es detectava la seva presència en cap dels punts mostrejats. Normalment, la variabilitat dins de cadascuna d'elles era elevada per aquest paràmetre. Els rangs de variació més elevats es donaven en les dues zones lacustres. En relació al contingut d'amoni, els valors mitjos són relativament similars entre les diferents zones; només cal destacar l'elevada concentració determinada en les mostres recollides als Estanys de La Jonquera.

Globalment, i tal i com es pretenia, el rang de variació per als diferents paràmetres físico-químics del sòl era considerablement elevat: pH (3.9 - 7.4); % contingut hídric del sòl (3.6 - 88.8); % contingut de matèria orgànica (2.5 - 24.5); % nitrogen total (0.11 - 1.22); relació C/N (5.1 - 27.2); contingut de nitrats en mg $N.kg^{-1}$ (0 - 50.2) i d'amoni en mg $N.kg^{-1}$ (0.3 - 52.0). Això ens podia permetre intentar relacionar aquesta diversitat amb les emissions de N_2O i/o la desnitrificació.

4.1.1.1.2 Taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació. Relació entre ambdues

A la Taula 4.2 es mostren les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació així com la relació entre ambdues per a cadascuna de les zones mostrejades. Tot i que el rang de variació global tant per a les taxes actuals d'emissió de N_2O (6-320 ng $N.g^{-1}.d^{-1}$) com de desnitrificació (5-403 ng $N.g^{-1}.d^{-1}$) era considerable, cal remarcar que només en el sòl dels Aiguamolls de Vilaüt es donaven taxes relativament elevades. Excloent aquest sòl, el rang de variació es reduïa molt (6-78 ng $N.g^{-1}.d^{-1}$ per a la taxa d'emissió de N_2O; 5-107 ng $N.g^{-1}.d^{-1}$ per a la taxa de desnitrificació). En el sòl d'Adri el valor mig tant per a la taxa d'emissió de N_2O com de desnitrificació era molt baix i el rang de variació molt petit; en la resta de zones la variabilitat era considerable.

Pel què fa referència a la proporció de N emès en forma de N_2O respecte a les emissions totals (N_2+N_2O) es va obtenir un rang de variació comprès entre 0.4 i 5.0. En la majoria de zones, el valor mig d'aquesta relació es trobava per sobre d'1 tot i que el rang de variació abarcava valors per sota i per sobre d'1. Els Aiguamolls de Vilaüt era l'única zona en la que sempre es donaven taxes més elevades de desnitrificació enfront les pèrdues exclusivament en forma de N_2O. A la fageda de St. Martí del Corb també hi havia un predomini dels valors d'aquesta relació inferiors a 1.

Taula 4.2 - Valor mig i rang de variació (*) de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació (N_2O+N_2) i de la proporció de N emès en forma de N_2O respecte a les emissions totals (N_2O+N_2) en cadascuna de les zones mostrejades (n=5). Ambdues taxes estan expressades en ng $N.g^{-1}.d^{-1}$.

	Emissió N (ng $N.g^{-1}.d^{-1}$)		
Comunitat vegetal	**N_2O**	**Desnitrificació**	**N_2O/total**
Veg. Lacustre			
Estanys de La Jonquera	35 (15-78)*	41 (9-107)	1.1 (0.4-2.0)
Aiguamolls de Vilaüt	143 (28-320)	238 (41-403)	0.6 (0.4--0.8)
Prat			
La Pastuïra	38 (32-51)	37 (24-53)	1.1 (0.8-1.4)
Setcases-Vallter	28 (16-40)	23 (8-43)	1.8 (0.7-5.0)
Oix-Beget	19 (7-29)	14 (9-26)	1.6 (0.8-3.1)
Coll de Merolla	25 (14-41)	27 (8-44)	1.3 (0.5-2.6)
Bosc mixt			
Massanet de La Selva	27 (7-61)	28 (11-43)	1.0 (0.4-1.5)
Alzinar			
Adri	10 (6-14)	10 (5-13)	1.2 (0.4-1.9)
La Crosa de St. Dalmai	28 (18-35)	21 (8-39)	1.7 (0.9-3.9)
Sureda			
St. Hilari Sacalm	25 (11-56)	25 (5-60)	1.2 (0.8-2.2)
St. Grau d'Ardenyà	25 (16-37)	25 (18-39)	1.0 (0.7-1.5)
Fageda			
Puigneulós	28 (11-54)	25 (10-50)	1.1 (0.7-1.3)
St. Martí del Corb	18 (14-25)	25 (17-40)	0.8 (0.4-1.1)
d'en Jordà	24 (17-31)	23 (14-27)	1.1 (0.8-1.4)

4.1.1.1.3 Agrupació de les mostres

Per tal de fer més interpretadora la informació sobre les característiques físico-químiques (Taula 4.1) i les taxes actuals d'emissió de N-gas (Taula 4.2) es va realitzar una anàlisi de components principals. Inicialment, es varen incloure en l'anàlisi tots els paràmetres determinats (pH, contingut d'aigua, matèria orgànica, nitrogen total, nitrats, amoni, relació C/N, taxa d'emissió de N_2O i de desnitrificació, relació $N_2O/(N_2O+N_2)$); excepte pel pH, les dades es varen transformar logarítmicament. Tanmateix, i donat que el valor de l'índex d'adequació de Kaiser global era excessivament baix (MSA<0.5), es va prescindir de les relacions $N_2O(N_2O+N_2)$ i C/N ja que aquestes variables eren les que individualment presentaven el valor més baix d'aquest mateix

índex. D'aquesta manera es va aconseguir augmentar la idoneïtat de l'aplicació d'aquest mètode estadístic sobre les 8 variables restants (MSA=0.61).

Agafant com a criteri d'elecció aquells vectors propis amb un valor propi superior a 1, es varen escollir les tres primeres components principals les quals, conjuntament, explicaven el 77 % de la variabilitat de les dades. Amb el mètode de rotació varimax es va obtenir que la primera component principal, que explicava el 43 % de la variabilitat de les dades, estava fonamentalment relacionada amb la fracció orgànica del sòl (Taula 4.3).

Taula 4.3 - Càrregues factorials corresponents a les 3 primeres components principals obtingudes pel mètode de rotació Varimax a partir de les dades log-transformades, excepte pel pH. CHS: contingut hídric; MO: contingut de matèria orgànica; Nt: nitrogen total; N_2O: taxa d'emissió de N_2O. PC: component principal

	Components Principals		
Paràmetre	**PC 1**	**PC 2**	**PC 3**
pH	-0.134	0.105	0.973
CHS	0.475	0.268	0.076
MO	0.925	0.101	-0.245
Nt	0.897	0.131	0.030
Nitrats	0.233	0.258	0.143
Amoni	0.043	0.055	-0.083
N_2O	0.116	0.952	0.079
Desnitrificació	0.129	0.853	0.082

La segona component estava estretament lligada a les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació; la variabilitat explicada per aquesta component era aproximadament del 21 %. Finalment, el tercer factor escollit, relacionat amb el pH de la solució del sòl, explicava un 14 % de la variabilitat total.

La primera component principal separava clarament les fagedes sobre material silícic bàsic (Serra del Corb i la Fageda d'en Jordà) i els sòls de prat sobre silícic àcid (La Pastuïra i Setcases Vallter) de les suredes desenvolupades sobre roques silíciques àcides; la resta de zones quedarien englobades en un grup intermig. La segona component principal permetia separar bàsicament les mostres dels Aiguamolls de Vilaüt de la resta de zones (Figura 4.1).

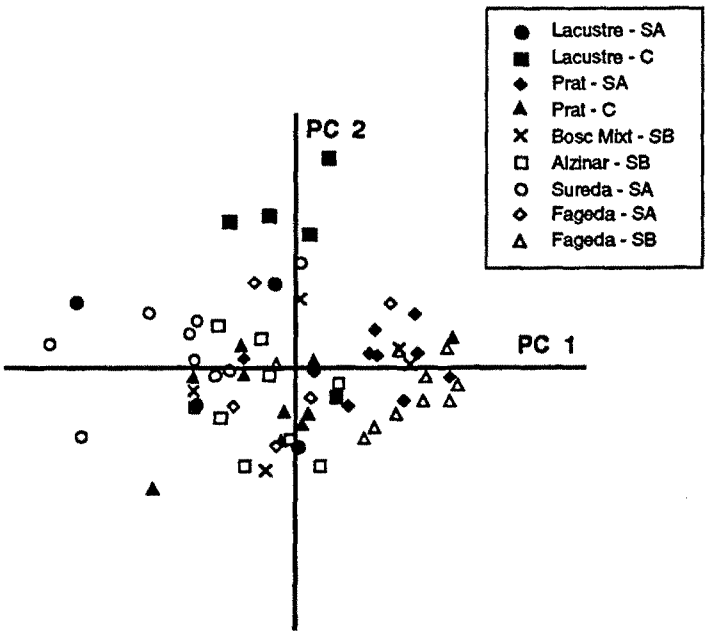

Figura 4.1 - Representació gràfica de les diferents mostres considerant com a eixos les dues primeres components principals obtingudes pel mètode de rotació Varimax. SA: silícic àcid; SB: silícic bàsic; C: material calcari.

La tercera component principal permetia separar les mostres dels sòls desenvolupats sobre materials calcaris d'aquelles recollides en els sòls desenvolupats sobre material silícic (Figura 4.2). La representació gràfica de les dades agafant com a eixos de coordenades la segona i la tercera components principals no aportava massa informació.

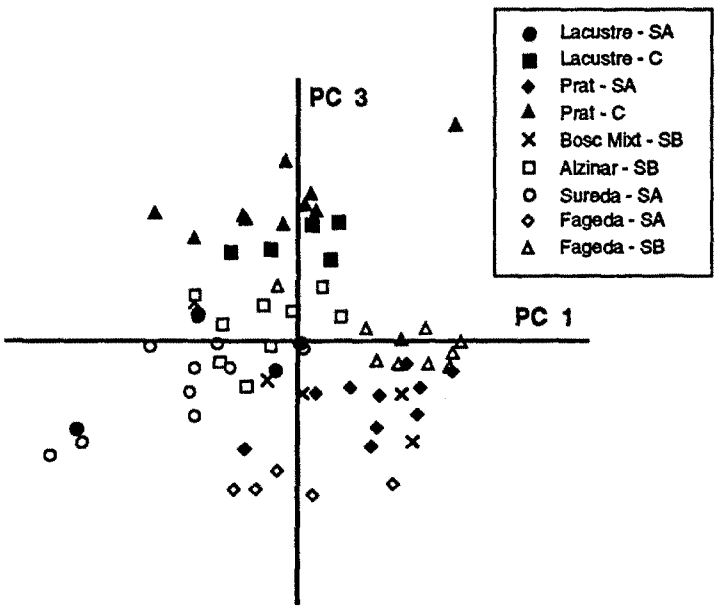

Figura 4.2 - Representació gràfica de les diferents mostres considerant com a eixos la primera i la tercera components principals obtingudes pel mètode de rotació Varimax. SA: silícic àcid; SB: silícic bàsic; C: material calcari.

4.1.1.2 Relació entre les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació amb alguns paràmetres edàfics

Per a l'estudi de les relacions entre les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació amb diferents paràmetres edàfics es va realitzar inicialment una anàlisi de correlacions utilitzant el coeficient de correlació de Pearson. Excepte en el cas del pH, es varen utilitzar les dades prèviament log-transformades (Taula 4.4).

Els resultats obtinguts indicaven que les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació estaven fonamentalment correlacionades amb el contingut hídric i de nitrats del sòl. Tot i que també estaven correlacionades amb la fracció orgànica del sòl, especialment amb el nitrogen total, tant el grau d'associació com la seva significació eren menors, sobretot en el cas de l'emissió de N_2O. No es va observar cap correlació amb el pH de la solució del sòl. Tot i que no es va observar cap correlació entre les taxes d'emissió de N-gas i la relació C/N cal tenir present que el contingut de nitrats estava molt significativament i negativa correlacionat amb la relació C/N. A més també estava molt significativament correlacionat amb el nitrogen total.

Taula 4.4 - Matriu de correlacions utilitzant el coeficient de Pearson entre les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació i els seus principals factors reguladors. Excepte pel pH, s'han utilitzat les dades log-transformades. CHS: contingut hídric; MO: contingut de matèria orgànica; Nt: nitrogen total; N_2O: taxa d'emissió de N_2O; Desnit.: taxa de desnitrificació. n.s: no significatiu, $P>0.1$; *: poc significatiu, $0.1>P>0.05$; **: significatiu, $0.05>P>0.01$; ***: molt significatiu, $0.01>P$.

	pH	CHS	MO	Nt	C/N	Nitrats	Amoni	N_2O	Desnit.
pH	1	0.0810 n.s.	-0.3470 ***	-0.0268 n.s.	-0.5445 ***	0.2536 **	-0.1588 n.s.	0.1830 n.s.	0.1817 n.s.
CHS		1	0.5956 ***	0.6911 ***	-0.2322 *	0.4346 ***	0.2940 **	0.4493 ***	0.4514 ***
MO			1	0.8335 ***	0.2208 *	0.2907 **	0.1995 n.s.	0.2054 *	0.2477 **
Nt				1	-0.3324 ***	0.5174 ***	0.0132 n.s.	0.3024 **	0.3124 ***
C/N					1	-0.4511 ***	0.2891 **	-0.1979 n.s.	-0.1415 n.s.
Nitrats						1	0.0521 n.s.	0.4065 ***	0.5267 ***
Amoni							1	0.0607 n.s.	0.1850 n.s.
N_2O								1	0.8042 ***
Desnit.									1

Per a l'obtenció d'uns models linears per predir les pèrdues de N-gas en forma de N_2O i per desnitrificació (N_2O+N_2) es va utilitzar, en qualsevol cas, el mètode de regressió múltiple pel sistema d'eliminació progressiva de variables, evitant la inclusió de paràmetres altament colineals. En aquest sentit, l'índex de condició calculat a partir dels valors propis obtinguts en l'anàlisi de components principals considerant només les variables independents era superior a 1000, cosa que indicava la presència de multicolinealitat entre aquestes. Donat que només un dels nombres de condició era superior a 1000 i que els pesos de les diferents variables en l'últim vector propi indicaven que els continguts de matèria orgànica i de nitrogen total eren variables altament colineals, es va prescindir d'una d'elles. Per a qualsevol de les dues combinacions de variables regressores possibles es va obtenir que la variació en la taxa d'emissió de N_2O era funció del contingut d'aigua i de nitrats del sòl (Equació 4.1). Aquest model, tot i que era altament significatiu ($P<0.001$), només explicava el 26 % de la variabilitat de les dades.

$$\log(\text{Emissió } N_2O) = 0.30 \log CHS + 0.16 \log N\text{-}NO_3 + 0.92 \qquad \text{(Equació 4.1)}$$

L'anàlisi dels residus indicava que dues mostres es podien considerar valors extrems. Una d'elles corresponia als Aiguamolls de Vilaüt i presentava la taxa d'emissió de N_2O més elevada. L'altra, recollida al bosc mixt de St. Hilari Sacalm, es caracteritzava per presentar una taxa d'emissió relativament elevada tenint en compte el seu baix contingut hídric i la poca presència de nitrats en el medi edàfic.

La representació gràfica dels residus respecte als valors predits era la típica de models en els que poques dades exerceixen una influència excessiva sobre l'equació de la recta. Efectivament, la comparació dels estadístics d'influència (*leverage*, *dffits* i la distància *D* de Cook) amb els seus valors crítics indicava que les mostres recollides en els Aiguamolls de Vilaüt així com dues dels Estanys de La Jonquera -aquelles que presentaven un contingut hídric més elevat- exercien una influència significativa sobre el pendent de la recta.

En el cas de la taxa desnitrificant es va partir de les mateixes variables i es varen tenir en compte les mateixes consideracions. El model obtingut, altament significatiu ($P<0.001$), indicava que les pèrdues de N per desnitrificació també eren funció del contingut d'aigua i de nitrats (Eq. 4.2). Aquest model explicava el 34 % de la variabilitat de les dades.

$$\log \text{Desnitrificació} = 0.30 \log CHS + 0.30 \log N\text{-}NO_3 + 0.84 \qquad \text{(Equació 4.2)}$$

Tanmateix, els residus no es distribuïen normalment. A més, en aquest cas 3 de les mostres recollides en els Aiguamolls de Vilaüt es podien considerar valors extrems, igual que la mateixa

mostra de la zona de St. Hilari Sacalm que es considerava valor extrem en el model per a la predicció de la taxa d'emissió de N_2O. Les mostres dels Aiguamolls de Vilaüt juntament amb una dels Estanys de La Jonquera exercien una forta influència sobre el pendent de la recta.

Donada la dificultat de trobar un model de regressió lineal que expliqués una part important de la variabilitat de les dades es va treballar amb els valors mitjos de cada paràmetre per a cada zona. La reducció en el nombre de casos que això comportava (n=14) no permetia pensar amb un model amb diferents variables independents donat que es recomana que la relació entre aquestes i el nombre de casos sigui com a mínim de 1:10. D'entrada, una anàlisi de correlacions utilitzant el coeficient de Pearson i treballant amb les dades transformades logarítmicament va mostrar que la taxa d'emissió de N_2O estava significativament correlacionada amb el contingut hídric del sòl (r=0.5633, P= 0.0359) i, especialment, amb el de nitrats (r=0.7438, P=0.0023). La taxa de desnitrificació també estava associada al contingut d'aigua (r=0.6322, P=0.0153) i de nitrats (r=0.69107, P=0.0062). Cap altre paràmetre estava correlacionat amb les taxes d'emissió de N-gas. Per a qualsevol de les dues taxes es va obtenir que el contingut de nitrats del sòl actuava com a millor variable regressora. Les equacions obtingudes es mostren a continuació:

$$\log(\text{Emissió } N_2O) = 0.43 \log N\text{-}NO_3 + 1.19$$

$$\log \text{Desnitrificació} = 0.51 \log N\text{-}NO_3 + 1.13$$

A la Taula 4.5 es pot observar la comparació entre els models obtinguts tant per a la taxa d'emissió de N_2O com de desnitrificació amb el contingut hídric i de nitrats.

Taula 4.5 - Significació i variabilitat explicada per diferents models de regressió lineal obtinguts entre les taxes d'emissió de N-gas i algunes variables edàfiques. Punts que influeixen significativament sobre l'equació de la recta, normalitat dels residus i valors que no s'ajusten massa al model.

y	x	*P>F*	R^2	Punts influents	Residus *P>W*	Extrems
Emissió N_2O	CHS	0.0359	0.32	A. de Vilaüt/ St. G. d'Ardenyà	0.8216	A. de Vilaüt
	Nitrats	0.0023	0.55	A. de Vilaüt	0.5688	A. de Vilaüt
Desnitrificació	CHS	0.0153	0.40	A. de Vilaüt/ St. G. d'Ardenyà	0.0656	A. de Vilaüt
	Nitrats	0.0062	0.48	A. de Vilaüt	0.2018	A. de Vilaüt

Per ambdós models la zona dels Aiguamolls de Vilaüt influenciava fortament l'equació de la recta.

4.1.1.3 L'activitat potencial desnitrificant (APD) com a variable predictora de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació

Per tal de provar si la incorporació de l'activitat potencial desnitrificant com a variable regressora millorava la capacitat de predicció de les taxes d'emissió actuals de N_2O i, sobretot, de desnitrificació es va determinar aquest paràmetre en algunes de les zones mostrejades. Aquestes es varen escollir intentant abarcar en la mesura que fos possible el ventall de condicions de les característiques físico-químiques i biològiques de les zones. Concretament, varen ser: Aiguamolls de Vilaüt, Estanys de La Jonquera, La Crosa de Sant Dalmai, Massanet de la Selva, el Coll de Merolla, La Pastuïra i la Fageda d'en Jordà. Els valors d'activitat potencial desnitrificant obtinguts en cadascuna d'aquestes zones es mostren a la Taula 4.6.

En general, es pot observar que en les zones amb vegetació herbàcia l'activitat potencial desnitrificant era elevada. Cal destacar els valors extremadament alts determinats a La Pastuïra, una zona de prat d'alta muntanya en el que hi havia símptomes evidents de pastura. Per contra, en les zones forestals més mediterrànies (La Crosa de St. Dalmai i Massanet de la Selva) la capacitat desnitrificant dels sòls era molt reduïda. La Fageda d'en Jordà presentava una activitat potencial desnitrificant mitjana superior a la d'aquestes darreres zones, tot i que la variabilitat entre les diferents mostres era considerable. Globalment, el rang de variació obtingut era molt gran (5 - 9694 ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}.h^{-1}$).

Taula 4.6 - Valors mig, màxim i mínim d'activitat potencial desnitrificant (APD) expressades en ng $N\text{-}N_2O.g^{-1}.h^{-1}$ per a cadascuna de les zones mostrejades (n=5).

Zona	APD		
	$\bar{x}$	màx.	mín.
Capmany	415	912	69
Vilaüt	1023	2165	210
La Crosa	15	24	9
Massanet S.	33	84	5
La Pastuïra	5573	9694	3162
Coll Merolla	412	756	275
Fageda Jordà	188	451	13

Una anàlisi de correlacions utilitzant el coeficient de Pearson i amb les dades log-transformades indicava que l'activitat potencial desnitrificant estava significativament correlacionada amb la taxa d'emissió de N_2O (r=0.4432; P=0.0111); per contra, la correlació amb la taxa de desnitrificació era poc significativa (r=0.3375; P=0.0.0589). Malgrat això, en una anàlisi de regressió múltiple que incloïa l'activitat potencial desnitrificant com a possible variable regressora en cap cas, ni per a la taxa d'emissió de N_2O ni per a la desnitrificació, el model proposat conservava aquesta variable.

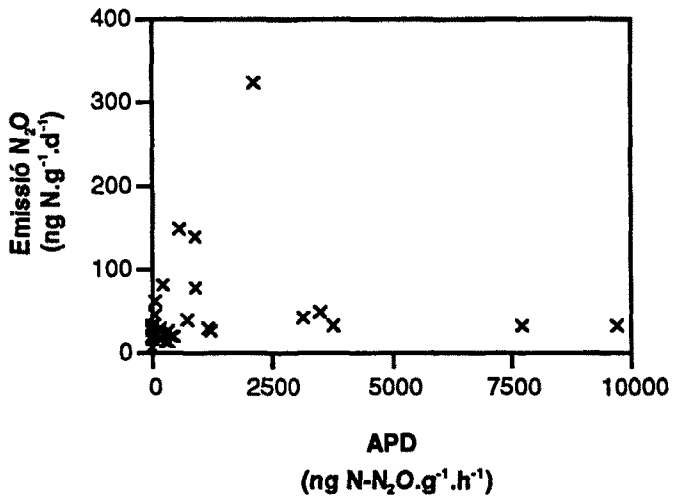

Figura 4.3 - Relació entre activitat potencial desnitrificant (APD) i taxa actual d'emissió de N_2O en algunes de les zones mostrejades.

La pobra relació entre les taxes d'emissió de N-gas i activitat potencial desnitrificant queda reflexada en la Figura 4.3. D'una banda, les mostres corresponents a La Pastuïra es caracteritzaven per presentar els valors més elevats d'activitat potencial desnitrificant (superiors a 2500 ng $N.g^{-1}.h^{-1}$) i taxes actual d'emissió de N-gas relativament baixes. De l'altra, les mostres de la zona dels Aiguamolls de Vilaüt eren bàsicament les responsables de la relació linear. En aquesta zona l'activitat potencial desnitrificant del sòl també estava estretament relacionada amb l'activitat desnitrificant (Figura 4.4).

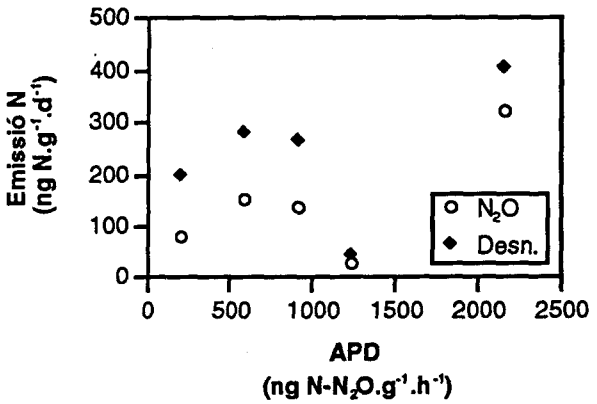

Figura 4.4 - Variació de les taxes d'emissió de N-gas (N_2O i desnitrificació -desn.-) en funció de l'activitat potencial desnitrificant (APD) en el sòl dels Aiguamolls de Vilaüt.

4.1.1.4 Relació entre activitat potencial desnitrificant i alguns paràmetres edàfics

Una anàlisi de correlació utilitzant el coeficient de Pearson i treballant amb les dades log-transformades va mostrar que globalment l'activitat potencial desnitrificant estava fonamentalment correlacionada amb el contingut de nitrogen total (r=0.6758; P=0.0001) i la relació C/N (r=-0.7143; P=0.0001), mentre que el seu grau d'associació amb la matèria orgànica era baix i molt poc significatiu (r=0.3022; P=0.0927). D'altra banda, també estava molt significativament correlacionada amb el contingut hídric (r=0.5783; P=0.0006) i de nitrats del sòl (r=0.5734; P=0.0006).

Malgrat el baix grau d'associació entre activitat potencial desnitrificant i contingut de matèria orgànica, una anàlisi de regressió múltiple utilitzant el mètode d'eliminació progressiva amb diferents combinacions dels paràmetres edàfics determinats, evitant sempre la inclusió en el model de variables colineals, va mostrar que el millor model era aquell en el que la variació de l'activitat potencial desnitrificant era funció del contingut de matèria orgànica, la relació C/N i el contingut de nitrats del sòl (Equació 4.3).

$$\log APD = 1.63 \log MO - 4.66 \log C/N + 0.40 \log N\text{-}NO_3 + 5.33 \quad \text{(Eq. 4.3)}$$

Aquest model era altament significatiu ($P<0.001$) i explicava el 72 % de la variabilitat de les dades. Una anàlisi dels residus indicava que aquests es distribuïen normalment i que cap dada es podia considerar un valor extrem. Tanmateix, dues de les mostres exerceixen una forta influència sobre l'equació de la recta. Una d'elles es va recollir a la zona de Massanet de la Selva; l'altra, a la Fageda d'en Jordà.

4.1.2 Discussió

A l'hora d'interpretar els resultats obtinguts en aquesta part del treball s'ha de tenir present que l'objectiu no era quantificar les emissions de N-gas del sòl a l'atmosfera via nitrificació i/o desnitrificació en diferents ecosistemes naturals -per a la qual cosa hagués calgut un altre tipus de mostreig- sinó abarcar un ampli ventall de condicions del medi edàfic diferents per aprofundir a una escala més global en la regulació d'aquestes emissions. Per tal d'assegurar això, les zones es varen escollir principalment en base al material originari i tipus de vegetació; la climatologia es tenia en compte a un segon nivell. Les diferents combinacions obtingudes entre aquests tres factors no eren ni pretenien ser un reflex de la importància de la seva presència en les nostres contrades. En aquest sentit, comunitats vegetals tals com pinedes, rouredes i matollars, amplament presents en les nostres contrades, no varen ser considerades. Contràriament, algunes de les zones mostrejades es troben ubicades en àrees molt localitzades però es varen considerar donada la seva singularitat (p.e.: Fageda d'en Jordà).

4.1.2.1 Característiques de les zones

Amb l'anàlisi de components principals es va obtenir que el contingut de matèria orgànica del sòl era una variable altament discriminant que permetia separar clarament les zones de fageda sobre material silícic bàsic (Fageda d'en Jordà i Serra del Corb) i els prats sobre silícic àcid (La Pastuïra i Setcases-Vallter) dels ecosistemes forestals perennifolis típicament mediterranis, fonamentalment, les suredes (St. Hilari Sacalm i St. Grau d'Ardenyà). Aquesta primera component podria estar lligada a la climatologia de la zona, tot i que el material originari també podria jugar-hi un paper important. En aquest sentit, els sòls desenvolupats sobre material silícic bàsic es caracteritzen per presentar una bona integració de la matèria orgànica a la matriu mineral mentre que la pobresa del material originari dels sòls de les suredes comporta tant una poca integració de la matèria orgànica com una escassa presència de sotabosc. Alhora, aquestes quedaven lleugerament separades de les corresponents als alzinars; això pot reflexar les particularitats de cadascuna d'aquestes comunitats vegetals, ambdues mediterrànies per excel.lència. Tot i que l'alzina i la surera són espècies molt similars, aquesta es desenvolupa en sòls molt pobres comportant un pobre sotabosc mentre que l'alzinar és un bosc dens.

La segona component principal estava altament relacionada amb les taxes d'emissió de N-gas. Tanmateix, la interpretació d'aquesta component és difícil ja que només en la zona dels

Aiguamolls de Vilaüt les taxes d'emissió eren relativament elevades. La similitud de valors obtinguts entre la resta de zones permetia únicament separar les fagedes sobre silícic bàsic, amb taxes d'emissió molt baixes, dels prats sobre silícic àcid, amb taxes d'emissió lleugerament superiors; ambdós tipus de zones presentaven nivells similars de matèria orgànica.

La tercera component escollida indicava que el pH de la solució del sòl també era una variable influent que separava les mostres en funció del material originari. Com era d'esperar, aquelles recollides en sòls desenvolupats sobre material calcari presentaven valors de pH més elevats, propers a la neutralitat, mentre que en la resta de mostres el pH era marcadament àcid.

Malgrat que el contingut de nitrats no era una variable que d'entrada expliqués una part important de la variabilitat de les dades cal remarcar que, en general, els valors mitjos més elevats es donaven en comunitats herbàcies. Això pot respondre al fet de que generalment en els ecosistemes forestals inalterats es dóna un fort control biològic sobre les pèrdues de nutrients que és particularment important en el cas dels nitrats ja que rarament s'adsorbeixen sobre els col.loides del sòl (Tamm, 1991). També es va observar que la matèria orgànica dels sòls que suportaven comunitats herbàcies presentaven millors relacions C/N que els ecosistemes forestals. Això podria anar lligat a una intensa activitat mineralitzadora en aquelles comunitats ja que es caracteritzen per presentar una xarxa més o menys densa d'arrels que excreten substàncies orgàniques que afavoreixen l'activitat microbiana.

Tot i que en aquest assaig la determinació del contingut d'aigua esdevé una mesura totalment circumstancial, cal remarcar que els valors més elevats es varen determinar en els ambients lacustres; per contra, aquelles comunitats sotmeses a un clima típicament mediterrani presentaven els continguts d'aigua més baixos.

Globalment, el rang de variació per a cadascun dels paràmetres tant físico-químics com biològics determinats era considerable. A més, una anàlisi detallada de cada zona per separat indicava que s'abarcava una àmplia gamma de combinacions diferents, en les què nitrificació i desnitrificació es podien anar repartint el paper com a principal procés responsable de les emissions de N-gas. Així, la presència de nuclis de sòl amb valors de la relació $N_2O/(N_2O+N_2)$ clarament superiors a 1 indicaven que la nitrificació autotròfica en alguns casos podia jugar un paper molt important en les pèrdues de N_2O, mentre que en d'altres les pèrdues es donarien principalment per desnitrificació (Aiguamolls de Vilaüt). En la majoria de zones es podien donar situacions ben diferents (Estanys de La Jonquera, La Crosa, Massanet de la Selva, St. Grau d'Ardenyà, Oix-Beget, La Pastuïra, Setcases-Vallter, Coll de Merolla, Serra del Corb, Fageda

d'en Jordà). Robertson i Tiedje (1987) també observen que la importància de les fonts específiques de N_2O pot variar entre els diferents punts de mostreig d'una mateixa zona.

Malgrat que les relacions entre les taxes d'emissió de N-gas i els diferents paràmetres edàfics determinats així com entre aquests no s'han mostrat explícitament en aquest treball ha semblat interessant remarcar la gran varietat de situacions diferents que quedaven reflexades. En alguns casos el contingut hídric del sòl era el principal factor regulador de les emissions per desnitrificació (Aiguamolls de Vilaüt; St. Grau d'Ardenyà); en d'altres, la desnitrificació semblava anar associada al contingut d'amoni del sòl (Puigneulós; la Crosa de Sant Dalmai; Adri), al contingut de matèria orgànica del sòl (St. Hilari Sacalm; La Pastuïra; Setcases) o bé de nitrats (Serra del Corb). A la Fageda d'en Jordà la variabilitat en la taxa de desnitrificació podria estar relacionada amb la variació en el pH de la solució del sòl. La proporció de N emesa en forma de N_2O respecte a les emissions totals (N_2O+N_2) en alguns casos estava estretament relacionada amb el contingut de nitrats del sòl (Aiguamolls de Vilaüt) o bé de matèria orgànica (Sant Grau d'Ardenyà, Setcases-Vallter). En algunes de les zones la taxa d'emissió de N_2O presentava una regulació diferent a la de la taxa de desnitrificació. En general, però, el nombre limitat de mostres recollides a cadascuna de les zones juntament amb les imbricades interrelacions entre els diferents paràmetres edàfics fan difícil la interpretació d'algunes de les relacions observades.

4.1.2.2 Relació de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació amb alguns paràmetres edàfics

L'objectiu de trobar un model linear el més senzill possible que incorporés totes aquelles variables independents que tinguessin un pes important en la regulació de les taxes d'emissió de N-gas requeria fer un estudi previ de la colinealitat entre les variables regressores inicialment considerades. Tot i que la presència de multicolinealitat no impossibilita l'obtenció d'una equació de regressió, la inclusió conjunta en el model de variables altament colineals comporta que els coeficients de regressió de les variables independents escollides no reflexin cap efecte inherent de la variable independent particular. A més, en el cas de presència de colinealitat, els coeficients de regressió són molt inestables. En aquest estudi es va obtenir que de les variables independents determinades només el contingut de matèria orgànica i nitrogen total eren altament colineals. Això és lògic donat que es considera que el 95 % del nitrogen present en el sòl va lligat a la matèria orgànica. Donades les dues diferents combinacions de variables regressores, a l'hora d'escollir el model es va tenir en compte: significació del model, variabilitat explicada, significació dels coeficients de la recta i normalitat i linealitat dels residus.

Tant per a les taxes d'emissió de N_2O com de desnitrificació es va obtenir que el contingut hídric i de nitrats del sòl eren les variables independents retingudes quan s'aplicava una anàlisi de regressió múltiple pel sistema d'eliminació progressiva de variables; ambdues tenien un efecte estimulador sobre les pèrdues de N-gas. Tot i la similitud de les equacions, en el cas de la desnitrificació es detectava un major pes del contingut de nitrats. Skiba *et al.* (1994) treballant amb dades corresponents a diferents ecosistemes, tant agrícoles com seminaturals, també arriben a un model en el què contingut de nitrats i d'aigua en el sòl eren les dues variables regressores que, conjuntament, explicaven millor la variabilitat en la taxa d'emissió de N_2O.

En aquest estudi els models obtinguts semblaven indicar que la desnitrificació era, globalment, el principal procés responsable de les pèrdues de N_2O. Això estaria d'acord amb aquells autors que associen taxes elevades d'emissió de N_2O a la desnitrificació (Davidson, 1992b; Smith i Patrick, 1983). Per contra, sobre una base anual la nitrificació podria ser-ne la font dominant ja que és un procés molt constant en molts ecosistemes (Byrnes *et al.*, 1990; Firestone i Davidson, 1989; Robertson *et al.*, 1988). Tanmateix, el percentatge de la variabilitat en la taxa d'emissió de N_2O explicat pel model obtingut en aquest estudi era lleugerament inferior al del model que explicava la variació en la taxa de desnitrificació. Això pot ser parcialment degut a la més complexa regulació en el cas de les emissions del N_2O ja que aquest és producte de dos processos que requereixen condicions contrastants, aeròbiques per a la nitrificació i de baixa disponibilitat d'O_2 per a la desnitrificació però amb una relació contrària respecte al contingut hídric del sòl quan es parla de la proporció de N emès en forma de N_2O per a cadascun dels processos.

Tanmateix, els models proposats no eren massa acceptables malgrat la seva significació. D'una banda, la poca variabilitat explicada pel model; de l'altra, l'elevat pes de les dades corresponents a la zona dels Aiguamolls de Vilaüt sobre l'equació de la recta. Les mostres d'aquesta zona, amb un pH proper a la neutralitat, un elevat contingut hídric i de N-mineral, especialment nitrats, i quantitats remarcables, tot i que no molt elevades, de matèria orgànica eren les úniques que presentaven unes taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació clarament superiors als de la resta de les zones. A més, en aquesta zona l'emissió de N_2O estava estretament relacionada a la desnitrificació. Per contra, en la resta de zones les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació eren baixes i molt similars entre elles i presentaven una considerable variabilitat.

Un escàs poder de predicció de les taxes d'emissió de N-gas a partir de models empírics ha estat obtingut per altres autors (Burton i Beauchamp, 1985; Parsons *et al.*, 1991; Skiba *et al.*, 1994). Això pot ser degut a que en ecosistemes terrestres les principals pèrdues per desnitrificació es donen de manera breu però intensa (Smith i Tiedje, 1979). Aquesta elevada variabilitat temporal

en les taxes de desnitrificació és un *handicap* important a l'hora d'intentar predir les pèrdues de N-gas (Groffman i Tiedje, 1989a; Myrold, 1988).

Si es treballava amb els valors mitjos i es considerava una única variable independent com a paràmetre regressor -donada la reducció en el nombre de casos- els models obtinguts per predir les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació presentaven una elevada significació i explicaven una proporció considerable de la variabilitat de les dades (al voltant del 50 %). Parsons *et al.* (1991) també obtenien una millora de la capacitat predictiva de la taxa desnitrificant al treballar amb valors mitjos. En el nostre estudi es va obtenir que per ambdues taxes la millor variable regressora era el contingut de nitrats.

Tanmateix, la validesa d'aquests models era dubtosa donat que igualment el parell de dades corresponent a la zona dels Aiguamolls de Vilaüt continuava exercint una elevada influència sobre l'equació de la recta. Les relativament elevades taxes d'emissió de N-gas determinades en aquest sòl segurament podrien atribuir-se a una combinació de les condicions del medi edàfic molt concretes les quals, d'una banda, estimularien la nitrificació i la desnitrificació i, de l'altra, permetrien que part del N_2O s'escapés directament a l'atmosfera; en aquest sòl al voltant del 60 % de les emissions es donaven en forma de N_2O, un percentatge considerable sobretot tenint en compte el caràcter neutre de la solució d'aquest sòl i el relativament elevat contingut hídric de les mostres. El caràcter particular d'aquestes condicions s'entén sobretot si es considera que en una zona lacustre, amb problemes de drenatge, és probable que el contingut de nitrats actuï moltes vegades com a principal factor limitant (Batjes, 1992). En aquest sentit, les característiques del medi edàfic del sòl dels Estanys de La Jonquera reflexarien més les característiques típiques d'una zona on la nitrificació podia estar limitada per la manca d'oxigen. En aquesta zona, en quatre dels cinc punts mostrejats els nitrats eren indetectables. Per contra, el contingut d'amoni era molt elevat.

4.1.2.3 L'activitat potencial desnitrificant (APD) com a variable predictiva de les taxes actuals d'emissió de N-gas

A partir dels resultats de l'estudi fins al moment es va pensar que la incorporació de l'activitat potencial desnitrificant com a possible variable independent, que podia resumir en part la història mediambiental relativament recent de cadascuna de les zones, potser milloraria la capacitat predictiva dels models obtinguts.

Tanmateix, es va observar que, en general, hi havia molt poca relació entre taxes actuals d'emissió de N-gas i l'activitat potencial desnitrificant i que el potencial desnitrificant d'un sòl podia ser molt superior a les emissions mesurades amb nuclis intactes de sòl al laboratori. El cas més espectacular era el del prat de La Pastuïra on les taxes d'emissió actuals eren relativament baixes però presentaven un potencial desnitrificant extraordinàriament elevat (Peterjohn, 1991). Segurament, l'elevada presència d'enzims desnitrificants en aquest sòl era conseqüència d'una bona disponibilitat de matèria orgànica i, sobretot, de nitrogen juntament amb una climatologia en la què són freqüents cicles alternants de condicions aeròbies i anaeròbies, almenys durant un període considerable de l'any degut al propi règim de precipitacions. La disponibilitat de N en aquesta zona podia estar afavorida per les aportacions a través de les excrecions dels animals de pastura. D'altra banda, només en el sòl dels Aiguamolls de Vilaüt es donava una relació directa entre taxes d'emissió de N i activitat potencial desnitrificant; això indicava que realment en aquesta zona es donaven unes condicions que propiciaven l'activitat dels enzims desnitrificants presents. Els resultats d'aquest estudi també indicaven que els sòls dels ecosistemes forestals típicament mediterranis (La Crosa de St. Dalmai i Massanet de La Selva) eren els que presentaven un potencial desnitrificant més baix. En el sòl de La Crosa, els relativament elevats continguts de nitrats i amoni, juntament amb un valors de la relació $N_2O/(N_2O+N_2)$ en general per sobre de 1 apuntaven cap a un important paper de la nitrificació autotròfica en les pèrdues de N_2O.

Conseqüentment, per a cap de les dues taxes d'emissió de N-gas determinades l'activitat potencial desnitrificant era retinguda com a possible variable predictora. Parsons *et al.* (1991) també troben que l'activitat potencial desnitrificant no era una bona predictora de les pèrdues per desnitrificació, ni sola ni en combinació amb altres variables tals com contingut d'humitat, taxa de respiració del sòl i concentració de nitrats. La persistència d'enzims desnitrificants inactius en el medi edàfic durant un període relativament llarg segurament invalida aquesta variable com a possible regressora de les pèrdues de N-gas del sòl a l'atmosfera quan les condicions del medi edàfic no són massa favorables per a l'activitat dels enzims desnitrificants. Altres autors també observen que l'activitat potencial desnitrificant no és un bon predictor de la taxa de desnitrificació determinada a una escala d'hores o de dia (Groffman i Tiedje, 1989b; Smith i Parsons, 1985). Per contra, Groffman i Tiedje (1989b) troben una forta relació entre pèrdues anuals de N per desnitrificació i el valor mig anual de l'activitat potencial desnitrificant en ecosistemes forestals.

Finalment només comentar que, en general, es donava una elevada variabilitat espacial de l'activitat potencial desnitrificant en ecosistemes naturals. El coeficient de variació dins de cada zona oscil.lava entre el 40 i el 106 %. D'altra banda, i malgrat no haver estat possible realitzar una

anàlisi de components principals considerant l'activitat potencial desnitrificant, donada la relativament reduïda matriu de dades, en aquest estudi es va observar que la comunitat vegetal semblava ser un factor regulador important de la capacitat desnitrificant d'un sòl.

4.1.2.4 Relació entre activitat potencial desnitrificant i alguns paràmetres edàfics

Es va observar que l'activitat potencial desnitrificant estava fortament relacionada tant amb els aspectes quantitatius com qualitatius de la matèria orgànica i amb el contingut de nitrats. La presència dels substrats necessaris per a l'activitat dels microorganismes desnitrificants eren els principals factors reguladors de la capacitat desnitrificant d'un sòl, malgrat que l'absència d'oxigen és un pre-requisit necessari tant per a la síntesi com per a l'activitat dels enzims desnitrificants (Firestone, 1982; Parkin i Tiedje, 1984). Tanmateix, elevats continguts de matèria orgànica solen anar lligats a climes humits. A més, el valor determinat de contingut hídric en un moment donat no deixa de ser circumstancial de manera que segurament té un pes molt més important en la regulació de les taxes actuals d'emissió de N-gas.

D'altra banda, la inclusió en el model de la relació C/N indicava que la matèria orgànica no només influïa a través de la disponibilitat de C orgànic sinó també de la competència pel nitrogen; en aquest sentit, una relació C/N elevada normalment va associada a una baixa disponibilitat de N. El signe negatiu d'aquesta variable en el model estaria d'acord amb aquells autors que suggereixen que les pèrdues de nutrients més grans es donen en sistemes amb una elevada disponibilitat de nutrients (Vitousek *et al.*, 1979). Altres autors també han observat que els índexs de disponibilitat de C i de N són forts predictors de l'activitat potencial desnitrificant (Peterjohn, 1991; Peterjohn i Schlesinger, 1991).

En aquest estudi no es va observar cap influència del pH de la solució del sòl sobre la capacitat desnitrificant. Per contra, altres autors han trobat que, malgrat que aquests dos paràmetres no estan fortament associats, el pH limita la producció d'enzims desnitrificants fora d'un cert rang (Peterjohn, 1991).

La major facilitat de predicció de l'activitat potencial desnitrificant que sembla preveure's a partir dels resultats d'aquest estudi -també observada per altres autors (Peterjohn, 1991)- pot ser un aspecte a considerar degut a que pot donar idea de quins ecosistemes poden jugar un paper

important en les pèrdues de N-gas del sòl a l'atmosfera via desnitrificació. Tanmateix, caldria conèixer en cada cas la dinàmica anual d'aquesta variable.

4.2 Taxes d'Emissió de N_2O i de Desnitrificació en Sòls Forestals. Variabilitat Espacial i Factors de Regulació

El coneixement dels processos microbiològics implicats en les emissions de N_2O en ecosistemes forestals és més aviat pobre ja que durant molt de temps s'ha assumit que en aquests ecosistemes els nitrats eren un factor limitant molt important. Tanmateix, actualment s'accepta que nitrificació autotròfica i heterotròfica es donen en els ecosistemes forestals; la poca presència de nitrats sovint detectada en aquests ecosistemes seria deguda més aviat a una forta demanda per part dels organismes vius que no a la inhibició de la nitrificació.

Ampliar els coneixements en aquests ecosistemes és interessant no només per anar definint el paper d'ambdós processos nitrificació i desnitrificació en el balanç de N en ecosistemes forestals sinó perquè sembla que en ecosistemes forestals àcids les pèrdues via desnitrificació es donarien principalment en forma de N_2O degut a una major sensibilitat de l'N_2O-reductasa al pH de la solució del sòl, amb les conseqüents implicacions ambientals que això pot comportar.

La major part de la informació obtinguda fins al moment sobre la regulació dels processos implicats en les emissions de N_2O es basa en estudis realitzats en sòls de conreu. Tanmateix, les propietats físiques, químiques i bioquímiques dels sòls forestals difereixen considerablement d'aquells. En aquest sentit, els sòls de conreu generalment són menys àcids i més rics en N mineral; per contra, els sòls forestals es caracteritzen per presentar una prominent capa orgànica que proporciona una elevada capacitat de retenció d'aigua als horitzons superficials del perfil edàfic i, normalment, per l'absència de nivells detectables de nitrats en aquests mateixos horitzons. Tot i que els paràmetres que controlen les emissions de N_2O i la desnitrificació en aquests sòls estan poc caracteritzats, se sap que el contingut de nitrats pot esdevenir un factor regulador molt important en els ecosistemes forestals (Davidson i Swank, 1986; Robertson i Tiedje, 1984). A més, les fonts de N_2O en sistemes no conreats poden ser més diverses (Robertson i Tiedje, 1987).

A l'hora de treballar amb sòls forestals la principal dificultat és la major heterogeneïtat respecte als sòls de conreu que suposa una dificultat important a l'hora d'estimar les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació. Conèixer l'estructura espacial de la variabilitat d'aquests paràmetres és essencial a l'hora de poder estimar-los i entendre la seva regulació. La representació gràfica de les dades prenent la distància entre les mostres recollides com a eix d'abscisses, el coeficient de variació i les característiques formals de la distribució són les eines més freqüentment

utilitzades. Tanmateix, i donat que aquests estadístics obvien l'existència de correlació espacial, cada vegada hi ha més autors que utilitzen tècniques geoestadístiques per a l'estudi de la variabilitat espacial de diferents propietats del sòl, essent el semivariograma, que quantifica l'estructura de la correlació en l'espai de les variables, el més comunment aplicat (Mallants *et al.*, 1996; Parkin *et al.*, 1987; Rossi *et al.*, 1992; Trangmar *et al.*, 1985). L'estudi de l'autocorrelació a partir del càlcul de la semivariància a cada distància específica és un pas previ a la utilització del "kriging" que permet interpolar valors entre punts mesurats en base al grau d'autocorrelació determinat.

L'objectiu d'aquest estudi és determinar les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació, analitzar la seva variabilitat espacial i relacionar-la amb alguns paràmetres edàfics en dos sòls de fageda de la zona central d'Itàlia que diferien en el material originari: el sòl de Monte Amiata (MA), desenvolupat sobre material volcànic, i el sòl de Pania (PN), originat a partir d'un substrat calcari. Els objectius que ens vàrem proposar són:

a) determinar les característiques físico-químiques i biològiques de l'horitzó superficial;

b) determinar les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació, i la relació entre ambdues en aquests ecosistemes;

c) estudiar l'estructura espacial de la variabilitat d'aquestes taxes;

d) determinar les taxes d'emissió i de desnitrificació en condicions d'anaerobiosi, així com la relació entre ambdues;

e) establir els principals factors reguladors edàfics de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació.

Disseny experimental

a) Per a la **caracterització físico-química i biològica del medi edàfic** es va recollir mostra alterada de sòl dels 0 - 5 cm superficials a cada metre al llarg d'un transecte de 9 m orientat perpendicularment a la direcció del pendent. Es va determinar: pH, contingut hídric, de matèria orgànica, nitrogen total, relació C/N, contingut de nitrats i activitat respiratòria. Al mateix temps, es va fer una determinació global de l'activitat potencial desnitrificant (APD) sota diferents graus de potencialitat: anaerobiosi, anaerobiosi amb suplement de nitrats en la solució d'incubació, i en condicions de potencialitat màxima que suposava l'addició a més de glucosa.

b) Per a la **determinació de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació i de la relació entre elles** es varen recollir a cadascuna de les zones de mostreig 30 nuclis intactes de sòl dels 10 cm superficials i es varen incubar en condicions estàtiques a temperatura controlada (20 °C), amb absència i presència d'acetilè (10 % del volum lliure); en cada cas la durada de la incubació va ser de 24 h.

c) Per tal de **conèixer l'estructura espacial de la variabilitat d'aquestes taxes** els nuclis intactes es varen recollir a cada metre al llarg del transecte; en cada punt de mostreig es varen prendre 3 nuclis, la distància entre els quals era aproximadament d'uns 10 cm (Figura 4.5).

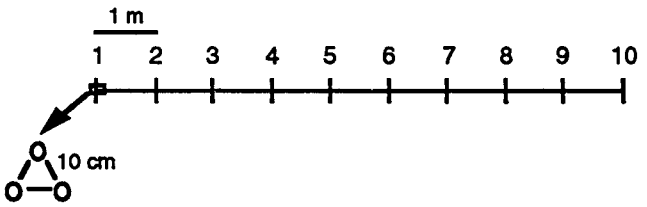

Figura 4.5- Esquema del mostreig realitzat per a la determinació de l'estructura de la variabilitat espacial de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació

d) Per a la **determinació de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en condicions d'anaerobiosi i de la relació entre ambdues** es va incubar mostra alterada de sòl de cada punt de mostreig en condicions estàtiques amb atmosfera de N_2 i a 20 °C durant 24 h mostra, amb i sense acetilè (10 % del volum lliure). La mostra es portava a capacitat de camp amb aigua destil.lada.

e) Per **establir els principals factors reguladors de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació** es varen relacionar tant les taxes actuals com les determinades en condicions d'anaerobiosi obtingudes a cada punt del transecte amb els diferents paràmetres edàfics determinats: pH, contingut hídric, de matèria orgànica, nitrogen total, relació C/N, contingut de nitrats i amoni, i activitat respiratòria del sòl.

4.2.1 Resultats

4.2.1.1 Caracterització físico-química i biològica dels sòls

Malgrat que els sòls mostrejats s'haguessin desenvolupat sota el mateix tipus de vegetació, les característiques del medi edàfic diferien considerablement entre ells (Taula 4.7). Des del punt de vista de la seva influència sobre les pèrdues de N a través dels processos de nitrificació i desnitrificació cal remarcar que el sòl de Pania, tot i presentar un pH menys àcid i uns continguts d'aigua i de matèria orgànica més elevats, es caracteritzava per l'absència d'una quantitat detectable de nitrats.

Taula 4.7 - Estadística descriptiva per a cadascun dels paràmetres mesurats: a) Monte Amiata; b) Pania. (n=10). CHS: contingut hídric del sòl; MO: contingut de matèria orgànica; Nt: Nitrogen total; C/N: relació C/N. Ind.: indetectable. CV: coeficient de variació; màx: valor màxim; mín.: valor mínim.

a)

Paràmetre	Unitats	Mitjana	CV (%)	Màx.	Mín.
pH		4.7	2.2	4.9	4.5
CHS	%	37.5	9.5	43.0	32.0
MO	%	12.2	12.5	14.5	9.7
Nt	%	0.23	16.1	0.30	0.18
C/N		26.5	8.7	29.9	21.6
$N\text{-}NO_3^-$	ppm	9.6	40.0	14.8	2.5
Activitat biològica	mg CO_2.100 $g^{-1}.d^{-1}$	18.3	8.4	20.6	16.3

b)

Paràmetre	Unitats	Mitjana	CV (%)	Màx.	Mín.
pH		5.8	6.5	6.7	5.2
CHS	%	66.7	10.1	80.0	58.0
MO	%	22.2	19.7	30.4	16.8
Nt	%	0.36	11.1	0.43	0.30
C/N		30.9	12.5	39.9	25.5
$N\text{-}NO_3^-$	ppm	Ind.			
Activitat biològica	mg CO_2.100 $g^{-1}.d^{-1}$	28.1	22.2	38.2	21.1

Dins de cada sòl, la variabilitat per a cadascun dels diferents paràmetres determinats era considerable. El sòl desenvolupat sobre material volcànic (MA) era el que, en general, presentava una variació menys marcada. En ambdós sòls, els paràmetres relacionats amb l'activitat biològica eren els que mostraven un major coeficient de variació. Per contra, el pH era la variable que menys fluctuava. Tot i que en ambdós sòls el rang de variació d'aquest paràmetre abarcava aproximadament mitja unitat de pH, des del punt de vista del seu efecte sobre les

variables objecte d'estudi és molt important ressaltar el caràcter molt àcid determinat en els diferents punts de mostreig del sòl de Monte Amiata mentre que en el sòl de Pania oscil.lava entre molt àcid i lleugerament àcid. A la Figura 4.6 es pot observar el patró de variació espacial de cada paràmetre al llarg del transecte per a cada zona per separat.

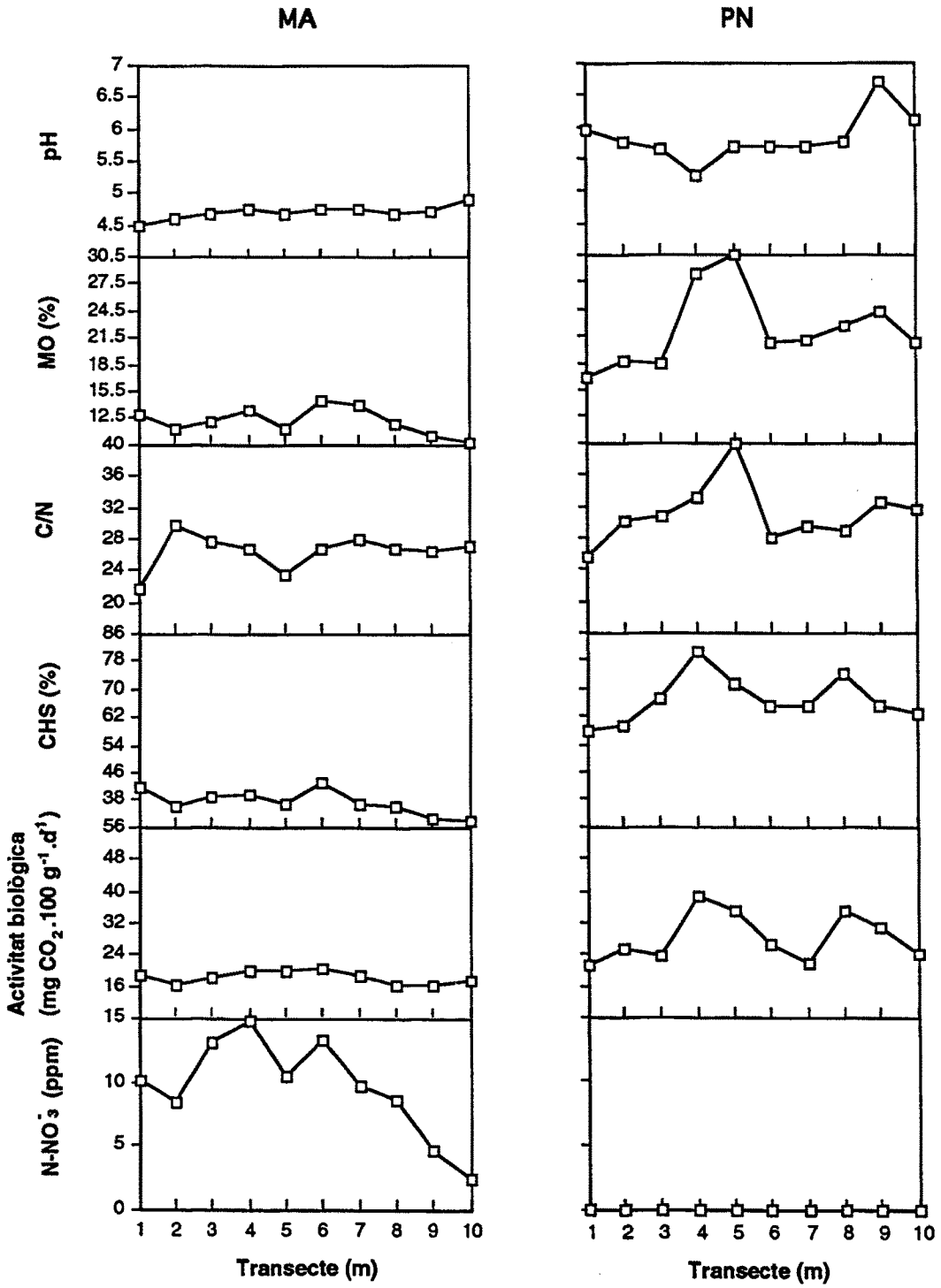

Figura 4.6 - Variació al llarg del transecte de cadascun dels paràmetres mesurats. MA: Monte Amiata; PN: Pania. MO: contingut de matèria orgànica; C/N: relació C/N; CHS: contingut hídric del sòl.

Una anàlisi de correlacions utilitzant el coeficient de Pearson i amb les dades log-transformades va indicar que en el sòl de Monte Amiata el contingut hídric estava directament correlacionat amb el contingut de matèria orgànica (r=0.8602, P=0.0014), igual que el de nitrats del sòl (r=0.8148, P=0.0041). La correlació entre aquest i el contingut hídric del sòl també era molt significativa (r=0.8573; P=0.0015). S'evidenciava una certa associació positiva entre l'activitat biològica i contingut de matèria orgànica (r=0.6161, P=0.0578), d'aigua (r=0.6748, P=0.0323) i de nitrats (r=0.5550, P=0.0958).

En el sòl de Pania el contingut hídric del sòl també estava molt correlacionat amb el contingut de matèria orgànica (r=0.7742, p=0.0086), igual que l'activitat biològica del sòl (r=0.8556, P=0.0016). A l'hora aquesta estava associada amb el contingut hídric del sòl (r=0.8377, P=0.0025).

El pH de la solució del sòl no estava correlacionat amb cap paràmetre edàfic en cap dels dos sòls mostrejats.

D'altra banda, i per tal de tenir idea de la importància del procés desnitrificant en cadascuna de les zones mostrejades i conèixer el paper dels principals factors reguladors d'aquest procés, es va fer una mesura per a cada sòl de l'activitat dels enzims desnitrificants presents en el moment de prendre la mostra sota diferents graus de potencialitat. En qualsevol de les condicions d'incubació es va obtenir que la capacitat desnitrificant del sòl de Monte Amiata era de l'ordre de 10 vegades més elevada que la de Pania (Figura 4.7).

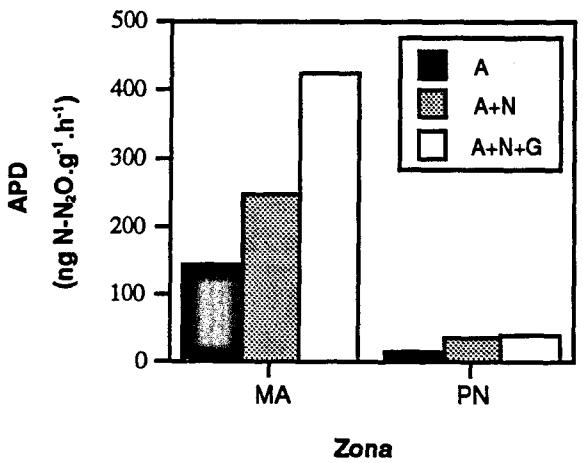

Figura 4.7 - Activitat potencial desnitrificant (APD) determinada sota diferents condicions d'incubació. A: anaerobiosi; N: nitrats; G: Glucosa. MA: Monte Amiata; PN: Pania.

En el sòl de Monte Amiata tant l'addició de nitrats com de C orgànic fàcilment disponible jugaven un paper important en la regulació de l'expressió dels enzims desnitrificants presents en el sòl. Per contra, en el sòl de Pania l'aportació de nitrats semblava tenir un paper més rellevant que el de C orgànic sobre l'activitat d'aquests enzims, tot i que els valors obtinguts en qualsevol cas eren molt baixos.

4.2.1.2 Taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació. Relació entre ambdues

Les dades corresponents a les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació seguien una distribució de freqüències esbiaixada cap a la dreta (Figura 4.8), sobretot en el sòl de Monte Amiata, indicant la presència d'una proporció elevada de mostres amb taxes relativament baixes; tanmateix, en cap dels dos es va detectar la presència de nuclis d'intensa activitat.

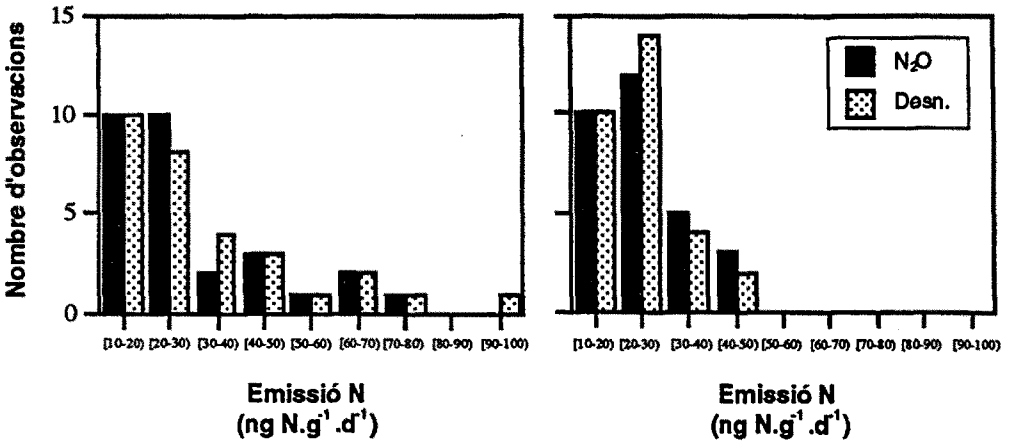

Figura 4.8 - Distribució de freqüències per a les dades de taxa d'emissió de N_2O i de desnitrificació (Desn.). Esquerra: Monte Amiata; dreta: Pania.

L'aplicació del test de Shapiro-Wilks tant a les dades originals com a les log-transformades d'ambdues taxes (Taula 4.8) indicava que en el sòl de Pania aquests paràmetres es distribuïen log-normalment. En el sòl de Monte Amiata la log-transformació no comportava una normalització de les dades tot i que els valors del test de normalitat indicaven que s'aproximava més a una distribució d'aquest tipus; un nombre més elevat de mostres segurament confirmaria la distribució log-normal de les taxes d'emissió de N-gas determinades en aquest sòl.

Taula 4.8 - Valors del test de Shapiro-Wilks (*W*) i probabilitat (*P*) per a les taxes d'emissió de N_2O i desnitrificació en cadascun dels sòls.

Paràmetre	Monte Amiata		Pania	
	W	*P*	*W*	*P*
Emissió N_2O	0.7989	0.0001	0.8635	0.0010
Log (Emissió N_2O)	0.8896	0.0054	0.9402	0.1083
Desnitrificació	0.8127	0.0001	0.8749	0.0019
Log (Desnitrificació)	0.9035	0.0107	0.9543	0.2548

El valor mig de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació era superior en el sòl de Monte Amiata (Taula 4.9). Els valors mínims detectats per a cadascuna de les taxes eren similars entre ambdós sòls. Tanmateix, el sòl de Monte Amiata presentava valors màxims superiors per ambdues taxes; d'aquí el major coeficient de variació. En aquest sòl la mediana d'ambdues taxes presenta valors més diferents de la mitjana que en el sòl de Pania.

Taula 4.9- Estadística descriptiva de les dades corresponents a les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació expressades en ng $N.g^{-1}.d^{-1}$. CV: coeficient de variació; màx: valor màxim; mín: valor mínim. (n=30)

Zona	Paràmetre	Mitjana	Mediana	Desviació estàndard	CV (%)	Màx.	Mín.
Monte Amiata	Emissió N_2O	29	23	16	54	71	15
	Desnitrificació	33	23	20	61	91	15
Pania	Emissió N_2O	25	22	9	36	49	14
	Desnitrificació	24	22	9	36	50	14

Malgrat els valors mitjos relativament superiors obtinguts en el sòl de Monte Amiata tant per a la taxa actual d'emissió de N_2O com de desnitrificació, una anàlisi de la variància realitzada utilitzant les dades log-transformades per a cadascuna de les dues taxes va mostrar que aquests sòls només diferien significativament en la taxa desnitrificant ($P<0.1$).

Quant a la proporció de N emès en forma de N_2O respecte a les pèrdues totals per desnitrificació (N_2O+N_2) es va observar que en el sòl desenvolupat sobre material volcànic (MA) aquesta proporció variava de 0.5 fins a 1.2, amb un 41 % dels nuclis incubats amb un valor <0.9 i un 55 % entre 0.9 i 1.1; només en un nucli era > 1.1. En el sòl de Pania la relació oscil.lava entre 0.9 i 1.5, trobant-se entre 0.9 i 1.1 en el 90 % dels nuclis; el 10 % restant el constituïen 3 nuclis intactes en els quals la proporció de N emès en forma de N_2O era força superior a l'emissió determinada

en presència d'acetilè. L'anàlisi de la relació entre les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació per a cada nucli d'incubació per separat mostra que en ambdós sòls s'establia una estreta relació lineal entre ambdues variables (Figura 4.9).

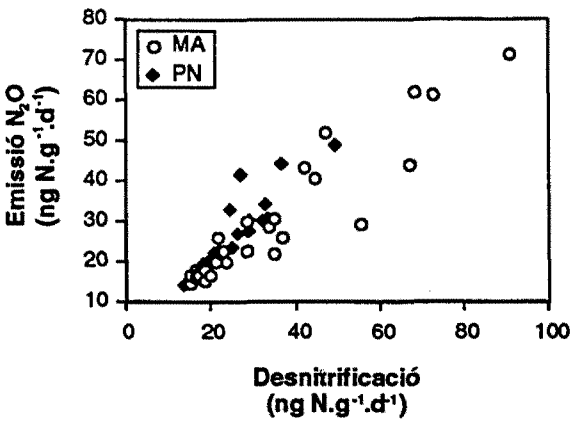

Figura 4.9 - Relació entre les taxes de desnitrificació i d'emissió de N_2O en els sòls mostrejats. MA: Monte Amiata; PN: Pania.

Per provar la igualtat de pendents entre les dues rectes es va realitzar una anàlisi de covariància en la qual el logaritme de la taxa desnitrificant era la covariable i es considerava la interacció entre factor i covariable. Els resultats obtinguts van mostrar que la proporció de nitrogen emès en forma de N_2O respecte al total (N_2O+N_2) variava significativament (P<0.1) entre ambdós sòls.

Els models de regressió lineals obtinguts a partir de les dades log-transformades no eren massa adequats donat que els residus no es distribuïen normalment. Tanmateix, utilitzant els valors mitjos per a cada punt de mostreig s'obtenien models altament significatius (P<0.001), que explicaven el 97 % de la variabilitat de les dades. Els residus es distribuïen normalment i en cap dels dos sòls aquests estaven autocorrelacionats. Les equacions de les rectes obtingudes emprant els valors mitjos es mostren a continuació:

log (Emissió N_2O) = 0.17 + 0.85 log (Desnitrificació) Equació 4.5 (Sòl de Monte Amiata)

log (Emissió N_2O) = 0.04 + 0.97 log (Desnitrificació) Equació 4.6 (Sòl de Pania)

Tanmateix, mentre que en el sòl de Pania cap dels parells de dades exercia una influència excessiva sobre l'equació de la recta, en el sòl desenvolupat sobre material volcànic (MA) el punt corresponent al primer metre del transecte influenciava considerablement el valor del pendent;

malgrat això, no es va excloure donada la consistència de la relació entre les dues taxes d'emissió de N-gas en els tres nuclis recollits en aquest punt.

4.2.1.2.1 Estructura de la variabilitat espacial de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació

En el sòl de Monte Amiata no es varen obtenir diferències significatives entre els diferents punts del transecte ni per a les dades de taxa actual d'emissió de N_2O ni de desnitrificació. En el sòl de Pania es donaven diferències poc significatives per ambdues taxes ($P<0.1$). La variació dels valors mitjos al llarg del transecte es mostra a la Figura 4.10. Donat que aquests seran els que es consideraran per a l'anàlisi posterior de les relacions amb els diferents pràmetres edàfics, en aquesta figura no es mostra la variabilitat entre els tres nuclis per a cada punt.

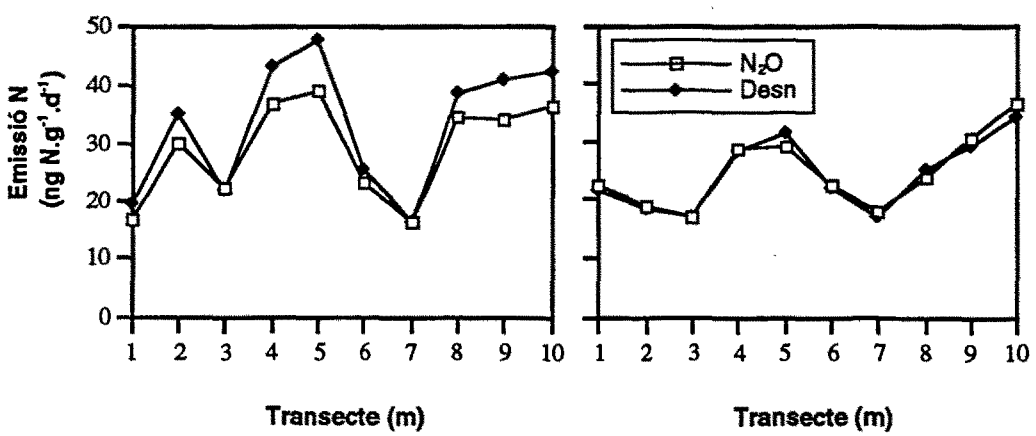

Figura 4.10 - Variació al llarg del transecte de les taxes d'emissió de N_2O (N_2O) i de desnitrificació (Desn) en el sòl de Monte Amiata (esquerra) i de Pania (dreta).

L'estructura espacial de la variabilitat de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació determinades a cada zona es va determinar a partir del càlcul de la semivariància. Es va observar que la correlació espacial de la variabilitat detectada per a les taxes d'emissió de N_2O diferia lleugerament entre ambdós sòls (Figura 4.11). Mentre que en el cas del sòl de Monte Amiata no es va observar cap estructura espacial de la variabilitat de la taxa d'emissió de N_2O a les distàncies analitzades de manera que tota era variància *nugget* -la qual representa la proporció de la variància de la població que no contribueix a l'autocorrelació- almenys a l'escala estudiada, amb les dades del sòl de Pania la interpretació no era tan clara donat que sembla que es donava

una certa estructura espacial; les mostres situades a distàncies d'entre 2-3 m podrien estar més autocorrelacionades que mostres que es trobaven a distàncies inferiors i superiors.

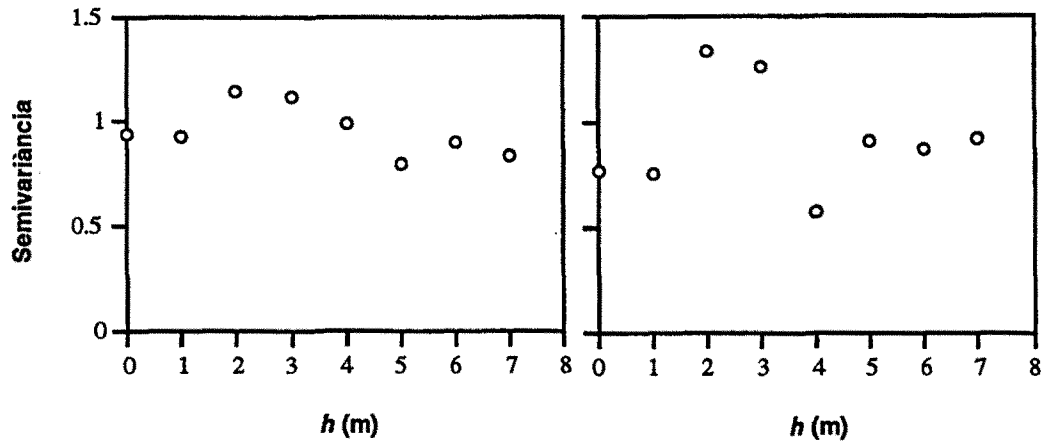

Figura 4.11 - Semivariogrames construïts a partir de les dades de taxa d'emissió de N_2O (ng $N.g^{-1}.d^{-1}$) transformades logarítmicament. Esquerra: Monte Amiata; Dreta: Pania.

Els semivariogrames obtinguts amb les dades de taxa de desnitrificació presentaven un patró de comportament molt similar al de les dades de taxa d'emissió de N_2O.

4.2.1.2.2 Relació entre les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació amb alguns paràmetres edàfics

En general, el limitat nombre de punts mostrejats en cadascun dels transectes juntament amb l'elevada variabilitat en les taxes actuals d'emissió de N-gas entre els diferents nuclis de sòl corresponents a cada punt del transecte no han permès aprofundir massa bé en l'estudi de les relacions entre aquestes taxes i els diferents paràmetres edàfics determinats.

En el sòl de Monte Amiata es va observar que ambdues taxes estaven fonamentalment relacionades amb el contingut de matèria orgànica del sòl (Figura 4.12). En els dos casos, l'augment en la taxa d'emissió de N-gas anava lligat a un descens en el contingut de matèria orgànica. Aquesta relació inversa sorprenia donats els estrets vincles observats entre matèria orgànica, contingut hídric i de nitrats en aquest sòl. Per tal de poder esbrinar una possible causa

d'aquesta relació es va realitzar una anàlisi més detallada de les interrelacions entre les diferents variables al llarg del transecte. Tanmateix, no es va trobar cap explicació.

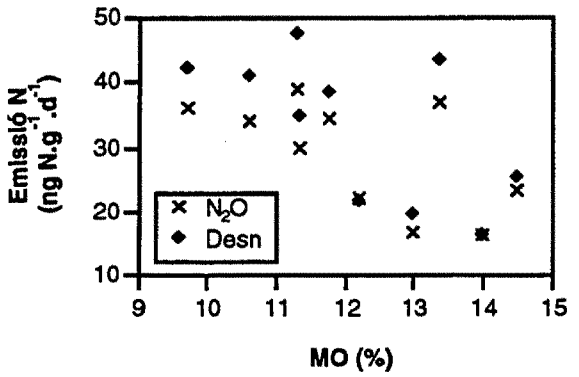

Figura 4.12 - Variació de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en funció del contingut de matèria orgànica (MO) en el sòl de Monte Amiata.

En el sòl de Pania el contingut de matèria orgànica també era la variable més estretament relacionada amb les taxes actuals d'emissió de N-gas (Figura 4.13). Tanmateix, en aquest sòl la relació era directa per ambdues taxes i en qualsevol cas sembla que no seguia una tendència lineal. D'altra banda, i malgrat que no quedi reflexat, es va observar que en els primers 6 punts del transecte la relació era molt diferent que en la resta. Aquest canvi de relació no es va poder atribuir a la influència de cap altra variable.

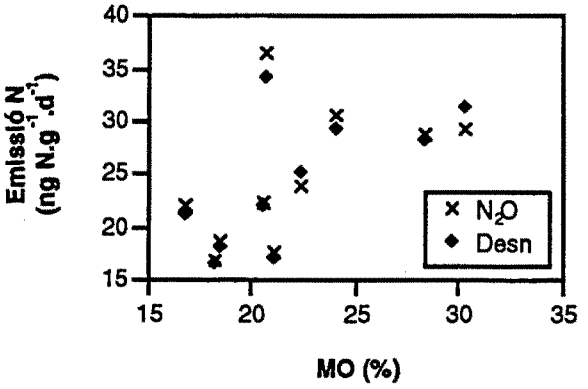

Figura 4.13 - Variació de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en funció del contingut de matèria orgànica (MO) en el sòl de Pania.

4.2.1.3 Taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en condicions d'anaerobiosi. Relació entre ambdues

Les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació determinades en condicions d'anaerobiosi eren significativament més elevades ($P<0.05$) en el sòl de Monte Amiata que en el sòl de Pania (Figura 4.14). A més, globalment en el sòl desenvolupat sobre material volcànic (MA) al voltant del 70 % de les emissions totals es donaven en forma de N_2O mentre que en el sòl sobre calcària (PN) no superava el 30 %. En el sòl de Pania les taxes d'emissió de N_2O en condicions anaeròbiques eren molt similars a les obtingudes en les incubacions amb mostra inalterada; per contra, les taxes de desnitrificació eren molt superiors en anaerobiosi. En el sòl la Monte Amiata, l'anaerobiosi estimulava molt ambdues taxes.

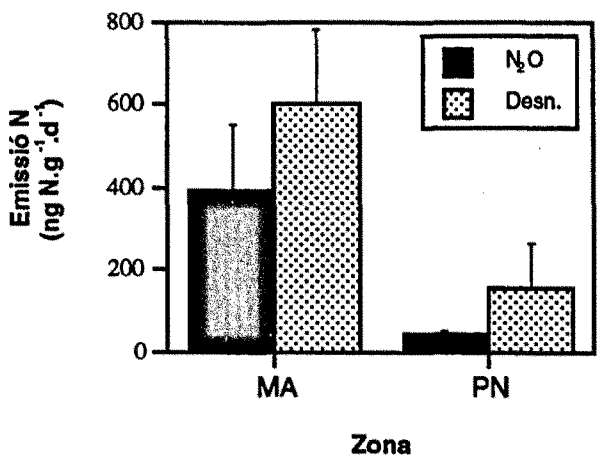

Figura 4.14 - Taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació determinades en condicions d'anaerobiosi. MA: Monte Amiata; PN: Pania. Les barres indiquen l'error estàndard (α=0.05). Desn.: Desnitrificació.

4.2.1.3.1 Variabilitat espacial de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en condicions d'anaerobiosi

En el sòl de Monte Amiata l'activitat desnitrificant determinada en condicions d'anaerobiosi i portada a capacitat de camp era força constant al llarg del transecte; només en els punts finals disminuïa considerablement (Figura 4.15). Per contra, la taxa d'emissió de N_2O presentava una major fluctuació. Tot i això, es donava una correlació molt significativa entre ambdues taxes

(r=0.7736, P=0.0144). En la majoria de punts, el valor de la relació entre elles es trobava al voltant de 0.8.

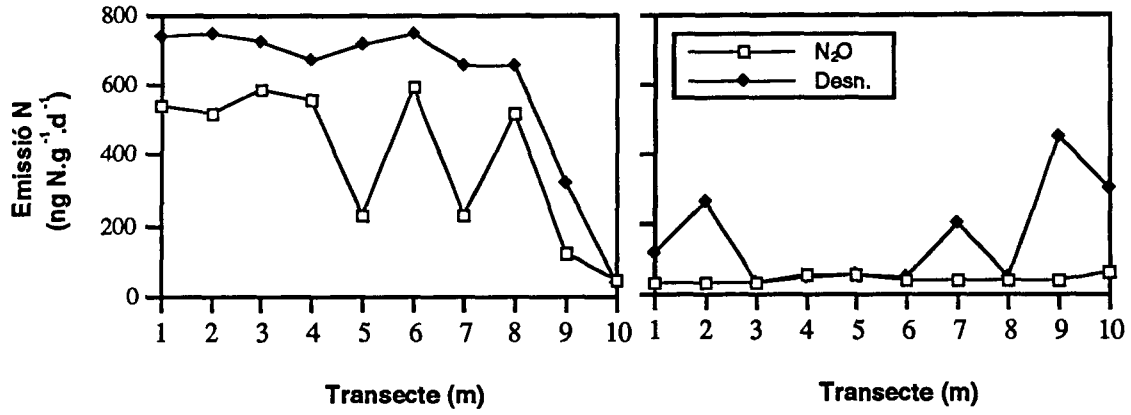

Figura 4.15 - Variació al llarg del transecte de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació (N_2O+N_2) en condicions d'anaerobiosi en els sòls de Monte Amiata (esquerra) i de Pania (dreta). Desn.: Desnitrificació.

En el sòl de Pania les taxes d'emissió de N_2O determinades en condicions d'anaerobiosi eren molt baixes i es mantenien pràcticament constants al llarg del transecte. Per contra, la taxa desnitrificant fluctuava considerablement sense seguir una pauta clara. Mentre que en alguns punts les pèrdues de N determinades en absència i presència d'acetilè eren pràcticament idèntiques, en d'altres les pèrdues totals per desnitrificació incrementaven considerablement. En aquest sòl no es donava cap correlació significativa entre ambdues taxes.

4.2.1.3.2 Relació entre les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació determinades en condicions d'anaerobiosi amb alguns paràmetres edàfics

En el sòl de Monte Amiata es va observar que en la major part dels punts mostrejats ni el contingut d'aigua, ni el de matèria orgànica, ni el de nitrats en el sòl actuaven com a factors limitants de la desnitrificació determinada en condicions d'anaerobiosi, i que cap dels altres paràmetres determinats podia ajudar a interpretar aquests resultats. Només en els dos punt finals del transecte es manifestava l'efecte estimulador d'aquelles variables sobre les taxes.

En el cas de la desnitrificació semblava que era la disponibilitat de nitrats la variable que més fortament regulava la taxa de desnitrificació en aquests dos punts (Figura 4.16). Tanmateix, la

variació de la taxa d'emissió en funció del contingut matèria orgànica i de nitrats seguia un comportament molt similar donada l'estreta relació entre aquests paràmetres edàfics.

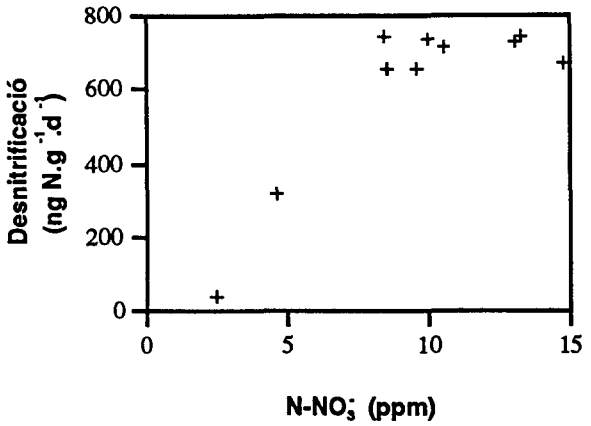

Figura 4.16 - Variació de la taxa de desnitrificació determinada en condicions d'anaerobiosi en funció del contingut de nitrats en el sòl en el sòl de Monte Amiata.

Degut al fort paral.lelisme entre les dues taxes d'emissió de N-gas determinades en condicions d'anaerobiosi en aquest sòl, sense i amb acetilè, es va obtenir que la taxa d'emissió de N_2O estava relacionada amb els mateixos paràmetres. Tanmateix, en aquest cas hi havia dos punts (5 i 7 del transecte) en els que la taxa d'emissió de N_2O era molt menor a la que en principi es podria esperar tenint en compte la taxa desnitrificant. Aquesta disminució no es va poder interpretar per l'efecte de cap altra variable que pogués interferir. Malgrat que es mostri la relació entre emissió de N_2O i contingut de nitrats (Figura 4.17) és important remarcar que la relació entre aquella i el contingut de matèria orgànica o d'aigua en el sòl era molt similar.

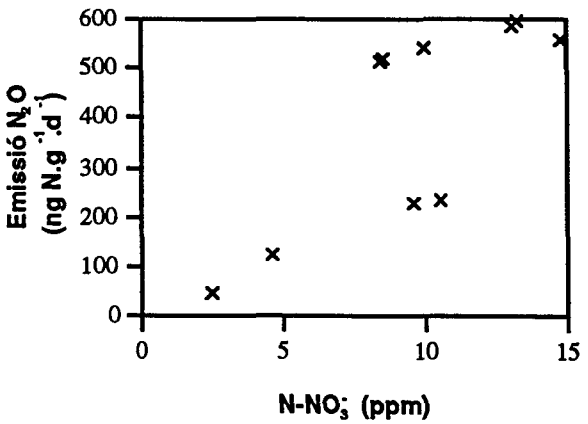

Figura 4.17 - Variació de la taxa d'emissió de N_2O determinada en condicions d'anaerobiosi en funció del contingut de nitrats en el sòl de Monte Amiata.

En el sòl de Pania la taxa d'emissió de N_2O determinada en condicions d'anaerobiosi, en general, estava relacionada amb el contingut de matèria orgànica. La representació gràfica d'ambdues variables (Figura 4.18) va mostrar que hi havia una clara tendència a augmentar la taxa d'emissió de N_2O en incrementar el contingut de matèria orgànica; només un punt s'apartava de la pauta general. Aquest punt correspon a la mostra recollida en el punt 10 del transecte.

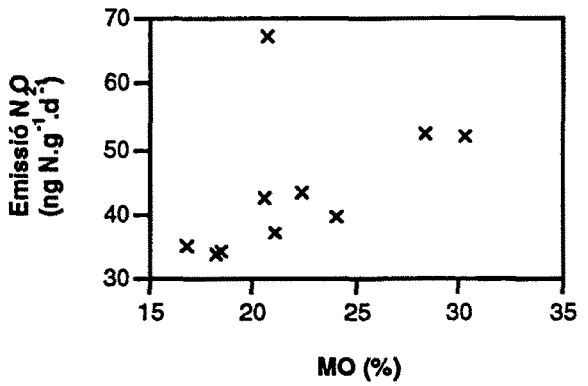

Figura 4.18 - Variació de la taxa d'emissió de N_2O determinada en condicions d'anaerobiosi en funció del contingut de matèria orgànica (MO) en el sòl de Pania.

En aquest mateix sòl, la taxa desnitrificant determinada en condicions d'anaerobiosi estava fonamentalment relacionada amb el pH de la solució del sòl (Figura 4.19).

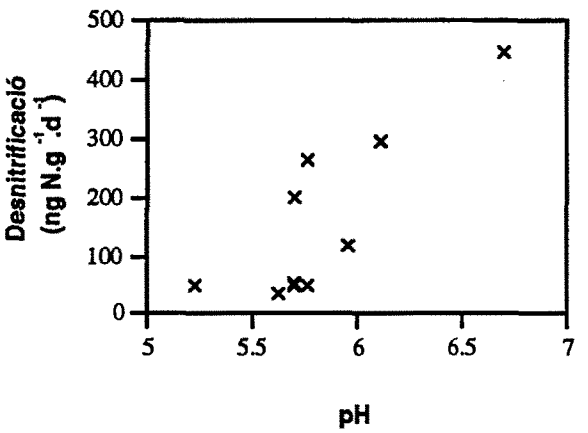

Figura 4.19 - Variació de la taxa desnitrificant determinada en condicions d'anaerobiosi en funció del pH en el sòl de Pania.

4.2.2 Discussió

4.2.2.1 Característiques físico-químiques i biològiques del medi edàfic

Les característiques de la part del perfil edàfic estudiada diferien considerablement entre les dues zones mostrejades, Monte Amiata i Pania. El diferent material originari i la particular climatologia de cadascuna d'elles -malgrat presentar una pluviometria anual similar- serien aspectes importants a considerar. En aquest sentit, el major contingut de matèria orgànica determinat en el sòl de Pania podria anar lligat a la presència de Ca^{2+} en el medi edàfic heretat del material originari que afavoreix una bona integració de la matèria orgànica amb la matriu mineral i, per tant, la protegeix de l'atac per part dels microorganismes edàfics. Tanmateix, el fet de que en aquesta zona la superfície edàfica estigui coberta de neu durant un període relativament llarg de l'any també pot afavorir l'acumulació de matèria orgànica en el sòl. Les característiques qualitatives de la matèria orgànica també diferien entre ambdós sòls; els valors superiors de la relació C/N en el sòl de Pania també podrien anar lligats als processos d'insolubilització de la matèria orgànica per part del Ca^{2+}. Aquest major contingut de matèria orgànica en el sòl de Pania juntament amb un major contingut hídric i un pH menys àcid poden ser responsables de la major activitat biològica determinada en aquest sòl.

En el sòl de Monte Amiata, malgrat el caràcter fortament àcid de la solució del sòl, es detectava activitat nitrificant. Altres autors també han observat que microorganismes nitrificants poden ser presents en sòls àcids (De Boer *et al.*, 1989; Hankinson i Schmidts, 1984). Per contra, el sòl de Pania es caracteritzava per l'absència de quantitats detectables de nitrats. Aquests resultats estarien d'acord amb Arcara *et al.* (1979) que troben absència de microorganismes nitrificants entre 0-5 cm de profunditat en aquest mateix sòl i una dèbil presència de desnitrificants, tot i que observen una presència considerable d'aquells microorganismes entre 5-10 cm de profunditat. És difícil saber si aquesta absència d'activitat nitrificant va lligada a un major presència de matèria orgànica en el sòl de Pania. Alguns autors creuen que la virosta de faig exerceix una inhibició específica sobre els microorganismes nitrificants (Arcara *et al.* 1979). Tanmateix, en el sòl de Monte Amiata es dóna una relació directa entre contingut de matèria orgànica i de nitrats en el sòl. Altres autors pensen que en realitat no es tracta d'un efecte inhibitori *per se* de la matèria orgànica sinó més aviat que la inhibició d'aquest procés biològic en els punts de major acumulació de matèria orgànica podria ser deguda a què aquesta capa orgànica constitueix una barrera per a la difusió de l'O_2 o bé d'un problema de competència amb els organismes descomponedors, els quals poden dificultar la disponibilitat de NH_4^+ i O_2 als

microorganismes nitrificants (Lensi *et al.*, 1991). Tanmateix, els resultats d'Arcara *et al.* (1979) no concorden amb això.

D'altra banda, es donava una relativament elevada activitat potencial desnitrificant en el sòl desenvolupat sobre material volcànic (MA), indicant una elevada adaptació de la població desnitrificant a baixos valors de pH. Altres autors també han observat que microorganismes desnitrificants poden ser presents en sòls àcids (Hankinson i Schmidts, 1984; Parkin *et al.*, 1985). La baixa presència d'enzims desnitrificants en el sòl de Pania podria anar lligada a l'absència de quantitats detectables de nitrats. En aquest sentit, l'activitat potencial desnitrificant determinada en el sòl de Pania era molt similar a la d'un altre sòl de fageda amb un caràcter menys àcid (pH 6) i en el qual tampoc es detectava presència de nitrats (dades no publicades).

4.2.2.2 Taxes actuals d'emissió de N_2O i desnitrificació

Les taxes actuals mitjanes d'emissió de N_2O i de desnitrificació eren força similars entre els dos sòls mostrejats, Monte Amiata i Pania, tot i que el rang de variació era superior en el sòl de Monte Amiata. Tanmateix, els coeficients de variació determinats en cada cas eren baixos si es té en compte que generalment oscil.len entre el 50 i el 500 % (Burton i Beauchamp, 1985; Christensen *et al.*, 1990a; Parkin *et al.*, 1984; Parsons *et al.*, 1991; Pennock *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1988). Tot i això, ambdues taxes seguien una distribució de freqüències esbiaixada cap a la dreta aproximant-se a una distribució log-normal, com ja ha estat observat per altres autors (Folorunso i Rolston, 1984; Parkin *et al.*, 1985). Hi ha qui manté que baixos coeficients de variació es donen en períodes d'activitat elevada. Tanmateix, la comparació de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació amb aquelles determinades en condicions d'anaerobiosi indica que *in situ* les condicions del medi edàfic no eren favorables per a l'emissió de N-gas.

Parkin *et al.* (1987) recomanen l'extracció de nuclis d'un diàmetre més gran de 4.2 cm; d'aquesta manera hi ha una probabilitat més alta d'incloure un centre d'elevada activitat desnitrificant que, a més, queda diluït per una massa més gran de sòl de baixa activitat. En aquest sentit, el diàmetre dels nuclis extrets era suficientment gran (6 cm) per tal de minimitzar els problemes que comporta una dispersió heterogènia de les microzones desnitrificants. L'absència de nuclis amb una taxa excepcionalment elevada pot parcialment ser responsable dels baixos coeficients de variació obtinguts.

Relació entre ambdues taxes

En el sòl de Monte Amiata part del N_2O produït era reduït a N_2. Aquest fet sorprenia sobretot pel caràcter àcid de la solució del sòl. A més, cal tenir en compte que l'efecte inhibidor de la concentració de nitrats sobre la reducció de N_2O a N_2 s'estimula a baixos valors de pH (Blackmer i Bremner, 1978; Firestone *et al.*, 1980). Tot i això, altres autors també han observat reducció de N_2O a N_2 en sòls àcids, malgrat que a un nivell insignificant en comparació amb la taxa de producció de N_2O (Parkin *et al.*, 1985). En el sòl de Monte Amiata aquesta reducció representava com a mínim un 15 % de les emissions totals (N_2O + N_2).

Diferents autors han utilitzat la tècnica d'inhibició amb acetilè per separar la contribució relativa de les vies oxidativa i reductiva en les emissions de N_2O degut a que la inhibició de la nitrificació i de la reducció de N_2O a N_2 via desnitrificació requereixen diferents pressions parcials d'acetilè (Aulakh *et al.*, 1984; Kaiser i Heinemeyer, 1996; Robertson i Tiedje, 1987). Tot i que el disseny realitzat en aquest estudi no estava pensat per a la seva identificació, en base als resultats obtinguts fins al moment és totalment assumible pensar que en el sòl de Monte Amiata ambdós processos, nitrificació i desnitrificació, puguin col.laborar en les emissions de N_2O. La relativament elevada presència d'enzims desnitrificants i la inhibició de la reducció de N_2O a N_2 en presència d'acetilè a l'atmosfera d'incubació confirmen la presència de microorganismes desnitrificants en aquest sòl. La detecció de nitrats indica que es dóna activitat nitrificant. Donat el caràcter àcid de la solució d'aquest sòl i l'atmosfera fonamentalment aeròbia de la incubació, podria ser que es donessin pèrdues de N_2O per quimiodesnitrificació; cal tenir present, però, que la reducció química dels nitrits afavoreix la formació de NO (Hynes i Knowles, 1984; Stevenson, 1986).

En el sòl de Pania, d'entrada es va pensar que la desnitrificació podia ser el principal procés responsable de les emissions de N-gas en el què pràcticament no es donaria reducció de N_2O a N_2. Tanmateix, i malgrat la no detecció de nitrats en el medi edàfic, també és possible la col.laboració de nitrificants heterotròfics ja que no estan afectats per la presència d'acetilè.

4.2.2.2.1 Estructura de la variabilitat espacial de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació

Pel què fa a l'estudi de l'estructura de la variabilitat espacial de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació, els resultats obtinguts en el sòl de Monte Amiata indicaven que la màxima variabilitat es donava a distàncies inferiors a 10 cm. Aquests resultats estarien d'acord amb

aquells autors que mantenen que el procés desnitrificant es caracteritza per presentar un elevat grau de variabilitat a petita escala, essent una component principal de la variabilitat total observada (Folorunso i Rolston, 1984; Parkin, 1990; Parkin et *al.*, 1987). En el sòl de Pania, per contra, sembla intuir-se una certa estructura espacial. Tanmateix, cal tenir present que per a la seva confirmació caldria un mostreig més exhaustiu. En aquest sentit, Folorunso i Rolston (1984) detecten autocorrelació espacial només en 1 dels 12 transectes realitzats.

En general, la complexa interrelació entre els diferents factors reguladors dels processos implicats en les emissions de N-gas és un *handicap* important a l'hora de poder aplicar amb èxit les tècniques geoestadístiques amb la finalitat última de la predicció de les taxes d'emissió de N-gas. Els centres d'elevada activitat desnitrificant (*hot spots*) sembla que van associats amb concentracions localment elevades de matèria orgànica particulada fàcilment oxidable distribuïdes a l'atzar (Parkin, 1987). És probable que en la natura la distribució d'aquests centres varïi en resposta a canvis del medi edàfic.

Tot i això, en alguns estudis realitzats en sòls de conreu s'ha evidenciat dependència espacial de la desnitrificació. Folorunso i Rolston (1985) observen un període de 4 a 5 m per a la taxa desnitrificant en un estudi en el què s'aplicava aigua de reg amb microaspersors; aquest període detectat per a la taxa desnitrificant anava lligat al caràcter cíclic del contingut hídric del sòl.

4.2.2.3 Relació de les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació amb alguns paràmetres edàfics

Tant en el sòl de Monte Amiata com de Pania el paràmetre més important que regulava les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació era el contingut de matèria orgànica. Tanmateix, mentre que en el sòl de Pania la matèria orgànica estimulava les emissions de N-gas, fet que pot fer suposar el caràcter heterotròfic dels microorganismes responsables, en el sòl de Monte Amiata es donava una relació inversa entre ambdós. Aquesta relació sorprèn donat que el contingut de matèria orgànica estava directament correlacionat tant amb el contingut d'aigua com de nitrats, els quals també afecten directament l'activitat dels microorganismes desntirificants. Tot i que en alguns casos això pot ser degut als efectes d'una major acumulació de matèria orgànica sobre el pH de la solució del medi edàfic, en el sòl de Monte Amiata no es va observar cap relació entre ambdues variables.

4.2.2.4 Taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en condicions d'anaerobiosi, i relació entre ambdues

En condicions d'anaerobiosi, les pèrdues de N-gas es donen bàsicament per desnitrificació. En general, les taxes d'emissió obtingudes en aquestes condicions eren molt superiors a les taxes actuals en ambdós sòls; només en el sòl de Pania les pèrdues de N_2O eren pràcticament idèntiques en ambdues condicions d'incubació. Aquests valors més elevats són lògics si es té en compte que en aquestes condicions d'incubació (anaerobiosi i portada a capacitat de camp) l'activitat desnitrificant s'estimulava no només per les condicions anòxiques de l'atmosfera d'incubació sinó també per l'efecte de l'increment del contingut hídric del sòl sobre l'activitat dels microorganismes i per la major facilitat en la difusió dels substrats fins als centres d'activitat desnitrificant que comporta. Les diferències obtingudes en els valors de taxa desnitrificant entre ambdós sòls estarien d'acord amb el diferent potencial desnitrificant determinat en cadascun d'ells.

Els resultats obtinguts en aquestes condicions d'incubació també mostren que en el sòl de Monte Amiata part del N_2O produït per desnitrificació era reduït a N_2. Això corrobora el que ja s'havia observat amb la incubació de nuclis intactes de sòl sense i amb acetilè.

4.2.2.4.1 Variabilitat espacial de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació determinades en anaerobiosi

En el sòl de Monte Amiata, la taxa desnitrificant determinada en condicions d'anaerobiosi era força constant al llarg del transecte; només en els punts 9 i 10 es donava una disminució considerable d'aquesta taxa lligada a un menor contingut d'aigua, de matèria orgànica i de nitrats. Per contra, la taxa d'emissió de N_2O presentava una major variació. Això pot reflexar la major complexitat en la seva regulació ja que no només depèn de la taxa del procés sinó de la proporció de N perduda en forma de N_2O. Tanmateix, globalment es pot parlar d'un cert paral.lelisme entre taxa d'emissió de N_2O i de desnitrificació en aquest sòl.

En el sòl de Pania, contràriament al que succeeix en el sòl de Monte Amiata, la taxa d'emissió de N_2O en condicions d'anaerobiosi era molt constant mentre que la taxa desnitrificant presentava una distribució molt heterogènia al llarg del transecte. Aquesta major heterogeneïtat no es va poder explicar en base a la variació al llarg del transecte dels altres paràmetres edàfics determinats. En aquest sòl les pèrdues de N per desnitrificació en aquells punts en què

s'estimulava el procés segurament es donarien quasi exclusivament en forma de N_2. La reducció de N_2O a N_2 estaria afavorida pel caràcter menys àcid de la solució del sòl. Altres processos diferents de la desnitrificació podrien estar implicats en les emissions de N_2O; podria ser que les pèrdues d'aquest compost en condicions anaeròbies siguin a través de respiradors de nitrats diferents dels desnitrificants o bé per desnitrificació de fongs, processos en els què el principal producte final és el N_2O.

Tot i que Parkin (1990) creu que no és la dispersió heterogènia de microorganismes amb capacitat desnitrificant la causa de l'elevada variabilitat en les taxes d'emissió sinó que més aviat és deguda als factors que regulen l'expressió dels enzims implicats, els resultats d'aquest estudi no aporten massa informació en aquest sentit. Hagués estat interessant determinar l'estructura espacial de l'activitat potencial dels enzims desnitrificants en ambdós sòls per tal d'anar aprofundint en l'estudi de la variabilitat espacial de les taxes d'emissió de N-gas. En general, la menor variació al llarg del transecte de les característiques fisíco-químiques determinades en el sòl de Monte Amiata podrien anar lligades a una menor variació de l'activitat desnitrificant.

4.2.2.5 Relació de les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació en anaerbiosi amb alguns paràmetres edàfics

L'anàlisi de les relacions entre les taxes d'emissió de N-gas determinades en condicions d'anaerobiosi i els diferents paràmetres edàfics determinats va mostrar que en el sòl de Monte Amiata tant la taxa d'emissió de N_2O com de desnitrificació estaven fonamentalment relacionades amb els continguts d'aigua, matèria orgànica i nitrats en els dos punts finals del transecte. Donada l'estreta interrelació entre elles en aquest sòl és difícil discernir quin paràmetre actua com a regulador principal. Tanmateix, en general sembla que en ecosistemes forestals la disponibilitat de N-mineral, més que la matèria orgànica, és el principal factor regulador de la desnitrificació. En la resta de punts, la taxa desnitrificant determinada en condicions d'anaerobiosi era força constant independentment dels valors d'aquests paràmetres. Això no estaria massa d'acord amb els resultats obtinguts al determinar l'activitat potencial desnitrificant sota diferents graus de potencialitat (Figura 5.5), que indicaven que tant el contingut de matèria orgànica fàcilment disponible com de nitrats actuaven com a factors limitants del procés desnitrificant en aquest sòl.

En el sòl de Pania, l'estreta relació entre la taxa de desnitrificació en condicions d'anaerobiosi i el pH de la solució del sòl podia indicar una poca adaptació de la població desnitrificant a baixos

valors de pH en relació a les característiques del material originari. D'altra banda, la diferent pauta de comportament entre emissió de N_2O i de desnitrificació en aquest sòl feia pensar realment que hi estaven implicats processos diferents.

CONCLUSIONS

Sòls agrícoles

1. L'estudi de la dinàmica anual de l'activitat potencial desnitrificant del sòl en dues plantacions de pomera ubicades en una zona de clima típicament mediterrani indica que les característiques del medi edàfic són un factor molt important en la regulació tant de la capacitat desnitrificant com de la seva pauta de variació temporal.

2. La textura més fina del sòl de la plantació adulta pot explicar parcialment que l'activitat potencial desnitrificant mitjana anual en aquesta plantació sigui aproximadament un ordre de magnitud superior a la del sòl del camp de pomeres joves.

3. En la plantació adulta el patró de variació anual de l'APD pot anar lligat a l'activitat dels arbres ja que els pics de màxima activitat es donen en periodes de demanda pràcticament nul.la per part de la planta i coincideixen amb un increment del contingut de matèria orgànica del sòl.

4. En la plantació de pomeres joves l'APD es manté pràcticament constant durant bona part de l'any. Els baixos continguts d'aigua i de matèria orgànica en el sòl són els principals factors limitants.

5. L'aplicació de diferents quantitats d'aigua al sòl (75, 100 i 150 % de l'ETc), a través d'un sistema de reg localitzat d'alta freqüència, no afecta significativament l'APD en cap de les dues plantacions.

6. En el camp de pomeres joves els valors d'APD són similars per a cadascuna de les tesis de reg assajades i per a qualsevol dels mostrejos realitzats.

7. A la plantació de pomeres adultes els valors mitjans i màxims d'APD per a cada mostreig es donen a la dosi de reg de 150% d'ETc; tanmateix l'elevada variabilitat entre repeticions no permet afirmar que l'efecte de la dosi sigui significatiu.

8. Cap dels principals factors reguladors de l'APD determinats paral.lelament durant el periode de reg (contingut hídric, de matèria orgànica i de nitrats) estan afectats per la quantitat d'aigua aplicada.

9. Malgrat que no s'hagi observat un efecte significatiu de la dosi de reg sobre l'APD, el contingut hídric del sòl és l'únic paràmetre significativament correlacionat amb aquella variable.

10. L'aplicació conjunta d'aigua i adob en forma de nitrat amònic o urea (100 ppm de N) ha comportat un increment significatiu i del mateix ordre en la taxa d'emissió de N_2O respecte el control després del pic de resposta inicial. Degut a la diferent disponibilitat de substrat nitrogenat que suposa l'aplicació d'un o altre adob s'han observat diferències pel què fa a la variabilitat obtinguda durant els primers dies d'incubació, més elevada en el cas del nitrat amònic. Per contra, el tractament amb 25 ppm de $N\text{-}NO_3NH_4$ no diferia significativament del control.

11. L'aplicació de 100 ppm de N-N32 disminueix significativament tant la resposta inicial com la taxa d'emissió posterior respecte al control. Els resultats de l'assaig amb diferents dosis de N32 i la incubació amb una solució no comercial de 100 ppm i amb la mateixa proporció de formes nitrogenades que aquest adob indiquen que la forma comercial presenta una substància inhibidora d'algun dels processos implicats directament o indirecta en les emissions de N_2O.

Sòls naturals

12. A una escala global, els models de regressió lineal obtinguts tant per a les taxes actuals d'emissió de N_2O com de desnitrificació mantenen com a variables independents els continguts hídric i de nitrats del sòl. Tanmateix en ambdós casos l'equació de la recta està bàsicament definida per les mostres corresponents a la zona dels Aiguamolls de Vilaüt i expliquen només una petita part de la variabilitat de les dades. Si s'utilitzen els valors mitjans dels diferents paràmetres millora la capacitat predictiva dels models però no el pes específic d'aquella zona.

13. Globalment, l'APD no ha resultat ser una bona predictora de les taxes d'emissió actuals de N_2O i de desnitrificació en sòls naturals.

14. El model de regressió lineal obtingut per explicar la variació de l'APD indica que aquest paràmetre està directament relacionat amb els continguts de matèria orgànica i de nitrats del sòl i inversament amb la relació C/N de la matèria orgànica.

15. Tot i que s'han determinat taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació molt similars en dos sòls de fageda desenvolupats sobre diferent material originari, els potencials nitrificant i desnitrificant de les dues zones difereixen considerablement. Els valors més elevats d'ambdós determinats en el sòl més àcid indiquen una adaptació dels microorganismes responsables d'aquests processos a valors baixos de pH.

16. L'estudi de la variabilitat espacial en les taxes actuals d'emissió de N_2O i de desnitrificació sembla indicar que la variació a petita escala contribueix de manera important a la variabilitat total.

17. S'ha constatat la dificultat d'establir relacions clares entre les taxes d'emissió de N_2O i de desnitrificació i els diferents factors reguladors, fet que evidencia la complexitat en les interrelacions que s'estableixen entre ells.

BIBLIOGRAFIA

Aasen, G.; Granli, T.; Hovland, J. i Røe, T.I. 1994. The significance of soil pH, moisture content and fertilizer type on nitrous oxide production. A: Book of Abstracts. 8th Nitrogen Workshop. Ghent.

Abou Seada, M.N.I. i Ottow, J.C.G. 1984. Effect of increasing oxygen concentration on total denitrification and nitrous oxide release from soil by different bacterial. Biol. Fertil. Soils, 1: 31-38.

Amato, M. i Ladd, J.N. 1992. Decomposition of ^{14}C-labelled glucose and legume materials in soils: properties influencing the accumulation of organic residue C and microbial biomass C. Soil Biol. Biochem. 24: 455-464.

Anderson, I.C. i Levine, J.S. 1986. Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers, and nitrate respirers. Appl. Environ. Microbiol. 51: 938-945.

Arah, J.R.M. i Smith, K.A. 1990. Factors influencing the fraction of the gaseous products of soil denitrification evolved to the atmosphere as nitrous oxide. A: Soils and the Greenhouse Effect. Ed: A.F. Bouwman. John Wiley i Sons. Chichester, Anglaterra. pp: 475-480.

Arah, J.R.M.; Smith, K.A.; Crichton, I.J. i Li, H.S. 1991. Nitrous oxide production and denitrification in Scottish arable soils. J. Soil Sci. 42: 351-367.

Arcara, P.G. 1988. La valutazione delle perdite di N_2O dal suolo. A: Giornate di Studio sull'Analisi del Suolo. Eds.: G. Pierluigi i M. Renzo. C.D.C. Verona. pp: 353-362.

Arcara, P.G.; Bidini, D. i Messana, L. 1979. Caratterizzazione microbiologica dei suoli su calcare. II - Attività microbiche ed enzimatiche di un suolo umo-calcico sotto bosco di faggio e loro variazioni stagionali. Annali Ist. Sper. Studio e Difesa Suolo - Firenze. Vol X: 195-209.

Arcara, P.G.; Gregori, E.; Miclaus, N. i Comellini, F. 1990. Denitrificazione e perdite di azoto (N_2O) da suoli coltivati a frumento (*Triticum vulgare* Vill. e *Triticum durum* Desf.) fertilizzati con urea, nitrato ammonico e letame. Riv. di Agron. 24: 19-27.

Arcara, P.G. i Sparvoli, E. 1982. Caratterizzazione dei suoli su calcare. III - L'attività nitrificante di alcuni suoli con diverso grado di evoluzione. Annali Ist. Sper. Studio e Difesa Suolo - Firenze. Vol XIII.

Arcara, P.G. i Sparvoli, E. 1989. Fertilizzazione azotata e dinamica dell'azoto in un prato polifita della Toscana centrale. Riv. di Agron. 23: 131-136.

Aulakh, M.S.; Doran, J.W.; Walters, D.T.; Mosier, A.R. i Francis, D.D. 1991. Crop residue type and placement effects on denitrification and mineralization. Soil Sci. Soc. Am. J. 55: 1020-1025.

Aulakh, M.S.; Rennie, D.A. i Paul, E.A. 1984. Acetylene and N-serve effects upon N_2O emissions from NH_4^+ and NO_3^- treated soils under aerobic and anaerobic conditions. Soil Biol. Biochem. 16: 351-356.

Bailey, L.D. 1976. Effects of temperature and root on denitrification in a soil. Can. J. Soil Sci. 56: 79-87.

Bailey, L.D. i Beauchamp, E.G. 1973. Effects of temperature on NO_3^- and NO_2^- reduction, nitrogenous gas production, and redox potential in a saturated soil. Can. J. Soil Sci. 53: 213-218.

Balderston, W.L.; Sherr, B. i Payne, W.J. 1976. Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. Appl. Environ. Microbiol. 31: 504-508.

Batjes, N.H. 1992. Nitrous oxide. A: A Review of Soil Factors and Processes that Control Fluxes of Heat, Moisture and Greenhouse Gases. Technical Paper 23. International Soil Reference and Information Centre. Wageningen. pp: 67-96.

Benckiser, G. 1994. Relationships between field-measured denitrification losses, CO_2 formation and diffusional constraints. Soil Biol. Biochem. 26: 891-899.

Bender, M. i Conrad, R. 1994. Microbial oxidation of methane, ammonium and carbon monoxide, and turnover of nitrous oxide and nitric oxide in soils. Biogeochem. J. 27: 97-112.

Berg, P.; Klemedtsson, L. i Rosswall, T. 1982. Inhibitory effect of low partial pressures of acetylene on nitrification. Soil Biol. Biochem. 14: 301-303.

Betlach, M.R. i Tiedje, J.M. 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide and nitrous oxide during bacterial denitrification. Appl. Environ. Microbiol. 42: 1074-1084.

Bijay-Singh; Ryden, J.C. i Whitehead, D.C. 1988. Some relationships between denitrification potential and fractions of organic carbon in air-dried and field-moist soils. Soil Biol. Biochem. 20: 737-741.

Blackmer, A.M. i Bremner, J.M. 1978. Inhibitory effect of nitrate on reduction of N_2O to N_2 by soil microorganisms. Soil Biol. Biochem. 10: 187-191.

Blackmer, A.M. i Cerrato, M.E. 1986. Soil properties affecting formation of nitric oxide by chemical reactions of nitrite. Soil Sci. Soc. Am. J. 50: 1215-1218.

Blackmer, A.M.; Robins, S.G. i Bremner, J.M. 1982. Diurnal variability in rate of emission of nitrous oxide from soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 46:937-942.

Bleakley, B.H. i Tiedje, J.M. 1982. Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers and denitrifiers. Appl. Environ. Microbiol. 44: 1342-1348.

Bollmann, A. i Conrad, R. 1997. Acetylene blockage technique leads to underestimation of denitrification rates in oxic soils due to scavenging of intermediate nitric oxide. Soil Biol. Biochem. 29: 1067-1077.

Bonnefoy, V. i Demoss, J.A. 1994. Nitrate reductases in *Escherichia coli*. Antonie van Leeuwenhoek, 66: 47-56.

Bottner, P. 1985. Response of microbial biomassa to alternate moist and dry conditions in a soil incubated with ^{14}C- and ^{15}N-labelled plant material. Soil Biol. Biochem. 17: 329-337.

Bouwman, A.F. 1990a. Conclusions and recommendations of the conference working groups. A: Soils and the Greenhouse Effect. Ed: A.F. Bouwman. John Wiley i Sons. Anglaterra. pp: 1-21.

Bouwman, A.F. 1990b. Exchange of greenhouse gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. A: Soils and the Greenhouse Effect. Ed: A.F. Bouwman. John Wiley i Sons. Anglaterra. pp: 61-127.

Bouwman, A.F.; Fung, I.; Matthews, E. i John, J. 1993. Global analysis of the potential for N_2O production in natural soils. Global Biochem. Cycles. 7: 557-597.

Bowden, W. D. 1986. Gaseous nitrogen emissions from undisturbed terrestrial ecosystems: an assessment of their impacts on local and global nitrogen budgets. Biogeochem. 2: 249-279.

Brams, E.A.; Hutchinson, G.L.; Anthony, W.P. i Livingston, G.P. 1990. Seasonal nitrous oxide emissions from an intensively-managed, humid, subtropical grass pasture. A: Soil and the Greenhouse Effect. Ed.: A.F. Bouwman. John Wiley i Sons. Anglaterra. pp: 481-487.

Breitenbeck, G.A. i Bremner, J.M. 1987. Effects of storing soils at various temperatures on their capacity for denitrification. Soil Biol. Biochem. 19: 377-380.

Bremner, J.M. i Blackmer, A.M. 1978. Nitrous oxide: emission from soils during nitrification of fertilized nitrogen. Science, 199: 295-296.

Bremner, J.M. i McCarty, G.W. 1993. Inhibition of nitrification in soil by allelochemical derived from plants and plant residues. A: Soil Biochemistry. Vol. 8. Eds.: J.M. Bollag i G. Sotzky. Marcel Dekker, Inc. NY. pp: 181-218.

Brooks, M.H.; Smith, R.L. i Macalady, D.L. 1992. Inhibition of existing denitrification enzyme activity by chloramphenicol. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1746-1753.

Buresh, R.J. i Patrick Jr., W.H. 1978. Nitrate reduction to ammonium in anaerobic soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 42: 913-918.

Burford, J.R. i Bremner, J.M. 1975. Relationships between the denitrification capacities of soils and total water-soluble and readily decomposable soil organic matter. Soil Biol. Biochem. 7: 389-394.

Burton, D.L. i Beauchamp, E.G. 1985. Denitrification rate relationships with soil parameters in the field. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 16: 539-549.

Byrnes, B.H. 1990. Environmental effects of N fertilizer use - An overview. Fert. Res. 26: 209-215.

Byrnes, B.H.; Christianson, L.S.; Holt, L.S. i Austin, E.R. 1990. Nitrous oxide emissions from the nitrification of nitrogen fertilizers. A: Soils and the Greenhouse Effect. Ed.: A.F. Bouwman. John Wiley i Sons. Anglaterra. pp.: 489-495.

Camps, F. i Bonany, J. 1993. Avaluació de les necessitats de reg d'una plantació de pomeres. 1991-92. A: Resum d'Experimentacions de la Fundació Mas Badia. Vol. 4. Eds.: Fundació Mas Badia. La Tallada d'Empordà, Girona. pp 231-235.

Camps, F.; Bonany, J.; Montaner, J.; Teixidor, N.; Boixadera, J. i Danés, R. 1993. Validació del mètode de programació de regs basat en el balanç hídric en plantacions de pomera 'Golden" en el període 1990-1992. 1.- Evolució del contingut d'aigua del sòl. A: Resum d'Experimentacions de la Fundació Mas Badia. Vol 4. Eds.: Fundació Mas Badia. La Tallada d'Empordà, Girona. pp 220-225.

Castignetti, D. i Hollocher, T.C. 1984. Heterotrophic nitrification among denitrifiers. Appl. Environ. Microbiol. 47: 620-623.

Cates, R.L. i Keeney, D.R. 1987. Nitrous oxide production throughout the year fertilized and manured maize fields. J. Environ. Qual. 16: 443-447.

Cho, C. M. i Mills, J.G. 1979. Kinetic formulation of the denitrification process in soil. Can. J. Soil Sci. 59: 443-457.

Christensen, B.T. 1986. Barley straw decomposition under field conditions: effect of placement and initial nitrogen content on weight loss and nitrogen dynamics. Soil Biol. Biochem. 18: 523-529.

Christensen, B.T. 1987. Decomposability of organic matter in particle size fractions from field soils with straw incorporation. Soil Biol. Biochem. 19: 429-435.

Christensen, S.; Simkins, S. i Tiedje, J.M. 1990a. Spatial variation in denitrification: dependency of activity centers on the soil environment. Soil Sci. Soc. Am. J. 54: 1608-1613.

Christensen, S.; Simkins, S. i Tiedje, J.M. 1990b. Temporal patterns of soil denitrification: their stability and causes. Soil Sci. Soc. Am. J. 54: 1614-1618.

Christensen, B.T. i Sørensen, L.H. 1985. The distribution of native and labelled carbon between soil particle size fractions isolated from long-term incubation experiments. J. Soil Sci. 36: 219-229.

Christianson, C.B.; Hedlin, R.A. i Cho, C.M. 1979. Loss of nitrogen from soil during nitrification of urea. Can. J. Soil Sci. 59: 147-154.

Cicerone, R.J. 1987. Changes in stratospheric ozone. Science, 237:35-42.

Cicerone, R.J. 1989. Analysis of sources and sinks of atmospheric nitrous oxide (N_2O). J. Geophys. Res. 94: 18265-18271.

Colbourn, P. i Dowdell, R.J. 1984. Denitrification in field soils. Plant Soil, 76: 213-225.

Cole, J.A. 1990. Physiology, biochemistry and genetics of nitrate dissimilation to ammonia. A: Denitrification in Soil and Sediment. Eds: N.P. Revsbech i J.Sørensen. Plenum Press. N.Y. pp: 57-76.

Conrad, R. 1990. Flux of NO_x between soil and atmosphere: importance and soil microbial metabolism. A: Denitrification in Soil and Sediment. Eds: N.P. Revsbech i J.Sørensen. Plenum Press. N.Y. pp: 105-128.

Coyne, M.S. i Tiedje, J.M. 1990. Distribution and diversity of dissimilatory NO_2- reductases in denitrifying bacteria. A: Denitrification in Soil and Sediment. Eds.: N.P. Revsbech i J. Sørensen. Plenum Press. N.Y. pp: 21-35.

Crutzen, P.J. 1983. Atmospheric interactions - homogeneous gas reactions of C, N, i S containing compounds. A: The Major Biogeochemical Cycles and Their Interactions. Eds.: B. Bolin i R.B. Cook, SCOPE. John Wiley i Sons, NY. pp. 67-114.

Crutzen, P.J. 1994. Global budgets for non-CO_2 greenhouse gases. A: Non-CO_2 Greenhouse Gases. Why and How to Control?. Eds: J. van Ham, L.J.H.M. Janssen i R.J. Swart. Kluwer Academic Press. Holanda. pp 1-15.

Daniel, R.M.; Limmer, A.W.; Steele, K.W. i Smith, I.M. 1982. Anaerobic growth, nitrate reduction and denitrification in 46 *Rhizobium* strains. J. Gen. Microbiol. 128: 1811-1815.

Darrah, P.R.; Nye, P.H. i White, R.E. 1987. The effect of high solute concentrations on nitrification rates in soil. Plant and Soil. 97: 37-45.

Davidson, E.A. 1991. Fluxes of nitrous oxide and nitric oxide from terrestrial ecosystems. A: Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides and Halomethanes. Eds.: J.E. Rogers i W. B. Whitman. American Society for Microbiology. Washington. pp. 219-235.

Davidson, E.A. 1992a. Pulses of nitric and nitrous oxide flux following wetting of dry soil: an assessment of probable sources and importance relative to annual fluxes. Ecol. Bull. 42: 149-155.

Davidson, E.A. 1992b. Sources of nitric oxide and nitrous oxide following wetting of dry soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 56: 95-102.

Davidson, E.A.; Matson, P.A. i Brooks, P.D. 1996. Nitrous oxide emission controls and inorganic nitrogen dynamics in fertilized tropical agricultural soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 60: 1145-1152.

Davidson, E.A. i Swank, W.T. 1986. Environmental parameters regulating gaseous nitrogen losses from two forested ecosystems via nitrification and denitrification. Appl. Environ. Microbiol. 52: 1287-1292.

Davidson, E.A; Swank, W.T. i Perry, T.O. 1986. Distinguishing between nitrification and denitrification as sources of gaseous nitrogen production in soil. Appl. Environ. Microbiol. 52: 1280-1286.

De Boer, W.; Klein Gunnewiek, P.J.A.; Troelstra, S.R. i Laanbroek, H.J. 1989. Two types of chemolithotrophic nitrification in acid heatland humus. Plant Soil, 119: 229-235.

De Boer, W.; Klein Gunnewiek, P.J.A.; Veenhuis, M.; Bock, E. i Laanbroek, H.J. 1991. Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3600-3604.

De Groot, C.J.; Nollet, L.; Vermoesen, A.; Boecks, P. i Van Cleemplut, O. 1994a. The effect of nitrate and ammonium aplication on the emission of NO and N_2O out of 4 Belgian soils. A: Book of Abstracts. 8th Nitrogen Workshop. Ghent.

De Groot, C.J.; Vermoesen, A. i Van Cleemplut, O. 1994b. Laboratory study of the emission of NO and N_2O from some Belgian soils. A: Non-CO_2 Greenhouse Gases. Why and How to Control? Eds. J. van Ham, L.J.H.M. Janssen i R.J. Swart. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp.: 183-189.

De Klein, C.A.M. i Logtestijn, R.S.P. 1996. Denitrification in grassland soils in the Netherlands in relation to irrigation, N-application rate, soil water content and soil temperature. Soil Biol. Biochem. 28: 231-237.

Dendooven, L. i Anderson, J.M. 1994. Dynamics of reduction enzymes involved in the denitrification process in pasture soil. Soil Biol. Biochem. 26: 1501-1506.

Dendooven, L. i Anderson, J.M. 1995. Maintenance of denitrification potential in pasture soil following anaerobic events. Soil Biol. Biochem. 27: 1251-1260.

Dendooven, L.; Duchateau, L. i Anderson, J.M. 1996a. Gaseous products of the denitrification process as affected by the antecedent water regime of the soil. Soil Biol. Biochem. 28: 239-245.

Dendooven, L.; Pemberton, E. i Anderson, J.M. 1996b. Denitrification potential and reduction enzymes dynamics in a Norway Spruce plantation. Soil Biol. Biochem. 28: 151-157.

Dendooven, L.; Splatt, P. i Anderson, J.M. 1994a. The use of chloramphenicol in the study of the denitrification process: some side-effects. Soil Biol. Biochem. 26: 925-927.

Dendooven, L.; Splatt, P.; Anderson, J.M. i Scholefield, D. 1994b. Kinetics of the denitrification process in a soil under permanent pasture. Soil Biol. Biochem. 26: 361-370.

Dominguez Vivancos, A. 1993. Fertirrigación. Mundi-Prensa. Madrid.

Dorland, S. i Beauchamp, E.G. 1991. Denitrification and ammonification at low soil temperatures. Can. J. Soil Sci. 71: 293-303.

Drury, C.F.; McKenney, D.J. i Findlay, W.I. 1991. Relationships between denitrification, microbial biomass and indigenous soil properties. Soil Biol. Biochem. 23: 751-755.

Drury, C.F.; McKenney, D.J. i Findlay, W.I. 1992. Nitric oxide and nitrous oxide production from soil: water and oxygen effects. Soil Sci. Soc. Am. J., 56: 766-770.

Duxbury, J.M. 1986. Advantages of the acetylene method for measuring denitrification. A: Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Denitrification. Eds.: R.D. Hauck i R.W. Weaver. Soil Science Society of America. Wisconsin, USA. pp: 73-91.

Duxbury, J.M.; Bouldin, R.E.; Terry, R.E. i Tate, R.L. 1982. Emissions of nitrous oxide from soils. Nature, 298: 462-464.

Duxbury, J.M.; Harper, L.A. i Mosier, A.R. 1993. Contribution of agroecosystems to global climate change. A: Agricultural Ecosystems Effects on Trace Gases and global Climate Change. ASA Spec. Publ. 55. ASA. CSSA i SSA. Madison, WI. pp. 1-18.

Duxbury, J.M. i McConnaughey, P.K. 1986. Effect of fertilizer source on denitrification and nitrous oxide emissions in a maize-field. Soil Sci. Soc. Am. J. 50: 644-648.

Duxbury, J.M. i Voghel, S. 1982. Storage of nitrous oxide on molecular sieves. Soil Sci. Soc. Am. J. 46: 1336-1338.

Edwards, N.T. 1982. The use of soda-lime for measuring respiration rates in terrestrial systems. Pedobiologia, 28: 321-330.

Egginton, G.M. i Smith, K.A. 1986. Losses of nitrogen denitrification from a grassland soil fertilized with cattle slurry and calcium nitrate. J. Soil Sci. 37: 69-80.

Eichner, M.J. 1990. Nitrous oxide emissions from fertilized soils: summary of available data. J. Environ. Qual. 19: 272-280.

Elliott, J.A. i de Jong, E. 1992. Quantifying denitrification on a field scale in hummocky terrain. Can. J. Soil Sci. 72: 21-29.

Fazzolari, E. i Germon, J.C. 1991. Dissimilative nitrate reduction to ammonium in different soils in waterlogged conditions. A: Developments in Geochemistry Diversity of Environmental Biogeochemistry. Ed.: J. Berthelin. Elsevier. Amsterdam. 295-308.

Fazzolari, E.; Mariotti, A. i Germon, J.C. 1990a. Dissimilatory ammonia production *vs.* denitrification *in vitro* and in inoculated agricultural soil samples. Can. J. Microbiol. 36:786-793.

Fazzolari, E.; Mariotti, A. i Germon, J.C. 1990b. Nitrate reduction to ammonia: a dissimilatory process in *Enterobacter amnigenus*. Can. J. Microbiol. 36: 779-785.

Ferguson, S.J. 1994. Denitrification and its control. Antonie van Leeuwenhoek, 66: 89-110.

Firestone, M.K. 1982. Biological denitrification. A: Nitrogen in Agricultural Soils. Agron. Monogr. nº 22. ASA, CSSA i SSSA. Madison, WI. pp: 289-326.

Firestone, M.K. i Davidson, E.A. 1989. Microbiological basis of NO and N_2O production and consumption in soil. A: Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere. Eds.: M.O. Andreae i D.S. Schimel. Johns Wiley i Sons. Anglaterra. pp. 7-21.

Firestone, M.K.; Firestone, R.T. i Tiedje, J.M. 1980. Nitrous oxide from soil denitrification: Factors controlling its biological production. Science, 208: 749-751.

Firestone, M.K.; Smith, M.S.; Firestone, R.B. i Tiedje, J.M. 1979. The influence of nitrate, nitrite, and oxygen on the composition of the gaseous products of denitrification in soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 43: 1140-1144.

Firestone, M.K. i Tiedje, J.M. 1979. Temporal change in nitrous oxide and dinitrogen from denitrification following onset of anaerobiosis. Appl. Environ. Microbiol. 38: 673-679.

Flessa, H. i Beese, F. 1995. Effects of sugarbeet residues on soil redox potential and nitrous oxide emission. Soil Sci. Soc. Am. J. 59: 1044-1051.

Folorunso, O.A. i Rolston, D.E. 1984. Spatial variability of field-measured denitrification gas fluxes. Soil Sci. Soc. Am. J. 48: 1214-1219.

Folorunso, O.A. i Rolston, D.E. 1985. Spatial and spectral relationships between field-measured denitrification gas fluxes and soil properties. Soil Sci. Soc. Am. J. 49: 1087-1093.

Gamble, T.N.; Betlch, M.R. i Tiedje, J.M. 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. Appl. Environ. Microbiol. 33: 926-939.

García-Plazaola, J.I.; Becerril, J.M.; Arrese-Igor, C.; Hernandez, A.; Gonzalez-Murua, C. i Aparicio-Tejo, P.M. 1993. Denitrifying ability of thirteen *Rhizobium meliloti* strains. Plant Soil. 149: 43-50.

GEO-EAS (Geostatistical Environmental Assessment software). 1988. User's guide. Ed.: United States Environmental Protection Agency. Las Vegas.

Germon, J.C. 1980. Étude quantitative de la dénitrification biologique dans le sol à l'aide de l'acétyléne. II. Evolution de l'effet inhibiteur de l'acétyléne sur la N_2O-reductase; incidence de l'acétyléne sur la vitesse de dénitrification et sur la réorganisation de l'azote nitrique. Ann. Microbiol. (Ins. Pasteur) 131B: 81.

Goodroad, L.L. i Keeney, D.R. 1984. Nitrous oxide production in aerobic soils under varying pH, temperature and water content. Soil Biol. Biochem. 16: 39-43.

Groffman, P.M. 1985. Nitrification and denitrification in conventional and no-tillage soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 49: 329-334.

Groffman, P.M. 1987. Nitrification and denitrification in soil: A comparison of enzyme assay, incubation and enumeration methods. Plant Soil. 97: 445-450.

Groffman, P.M. i Tiedje, J.M. 1988. Denitrification hysteresis during wetting and drying cycles in soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 52: 1626-1629.

Groffman, P.M. i Tiedje, J.M. 1989a. Denitrification in north temperate forest soils: spatial and temporal patterns at the landscape and seasonal scales. Soil Biol. Biochem. 21: 613-620.

Groffman, P.M. i Tiedje, J.M. 1989b. Denitrification in north temperate forest soils: relationships between denitrification and environmental factors at the landscape scale. Soil Biol. Biochem. 21: 621-626.

Groffman, P.M.; Tiedje, J.M.; Robertson, G.P. i Christensen, S. 1988. Denitrification at different temporal and geographical scales: proximal and distal controls. A: Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems. Ed: J.R. Wilson. C.A.B. International. Oxon, Anglaterra. pp. 174-192.

Haider, K.; Mosier, A. i Heinemeyer, O. 1985. Phytotron experiments to evaluate the effect of growing plants on denitrification. Soil Sci. Soc. Am. J. 49: 636-641.

Haider, K.; Mosier, A. i Heinemeyer, O. 1987. Effect of growing plants on denitrification at high soil nitrate concentrations. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 91-102.

Haider, K. i Schneider, U. 1992. Denitrification in a wheat cropped field - comparison of methods. Ecol. Bull. 42: 109-115.

Hallmark, S.L. i Terry, R.E. 1985. Field measurement of denitrification in irrigated soils. Soil Sci. 140: 35-44.

Hankinson, T.R. i Schmidt, E.L. 1984. Examination of an acid forest soil for ammonia- and nitrite-oxidizing autotrophic bacteria. Can. J. Microbiol. 30: 1125-1132.

Hankinson, T.R. i Schmidt, E.L. 1988. An acidophilic and a neutrophilic *Nitrobacter* strain isolated from the numerically predominant nitrite-oxidizing population of an acid forest soil. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1536-1540.

Harris, R.F. 1982. Energetics of nitrogen transformations. A: Nitrogen in Agricultural Soils. Agron. Monogr. nº 22. Ed.: F.J. Stevenson. ASA-CSSA-SSSA. Madison. pp: 833-890.

Heiss, B.; Frunzke, K. i Zumft, W.G. 1989. Formation of the N-N bond from nitric oxide by a membrane-bound cytochrome bc complex of nitrate-respiring (denitrifying) *Pseudomonas stutzeri*. J. Bacteriol. 171: 3288-3297.

Horn, R. 1990. Aggregate characterization as compared to soil bulk properties. Soil Till. Res. 17: 265-289.

Hutchinson, G.L.; Guenzi, W.D. i Livingston, G.P. 1993. Soil water controls on aerobic soil emission of gaseous nitrogen oxides. Soil Biol. Biochem. 25: 1-9.

Hynes, R.K. i Knowles, R. 1978. Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. FEMS Microbiol. Lett. 4: 319-321.

Hynes, R.K. i Knowles, R. 1982. Effect of acetylene on autotrophic and heterotrophic nitrification. Can. J. Microbiol. 28: 334-340.

Hynes, R.K. i Knowles, R. 1984. Production of nitrous oxide by *Nitrosomonas europaea*: effects of acetylene, pH, and oxigen. Can. J. Microbiol. 30: 1397-1404.

Jacobson, S.N. i Alexander, M. 1980. Nitrate losses from soil in relation to temperature, carbon source and denitrifier populations. Soil Biol. Biochem. 12: 501-505.

Jarvis, S.C.; Barraclough, D.; Williams, J. i Rook, A.J. 1991. Patterns of denitrification loss from grazed grassland: effects of N fertilizer inputs at different sites. Plant Soil, 131: 77-88.

Jensen, B.B. i Burris, R.H. 1986. N_2O as a substrate and as a competitive inhibitor of nitrogenase. Biochem. 25: 1083-1088.

Johansson, C.; Rodhe, H. i Sanhueza, E. 1988. Emission of NO in a tropical savanna and a cloud forest during the dry season. J. Geophys. Res. 93: 7180-7192.

Kaiser, E.-A.; Eiland, F.; Germon, J.C.; Gispert, M.A.; Heinemeyer, O.; Henault, C.; Lind, A.M.; Maag, M.; Saguer, E.; Van Cleemput, O.; Vermoesen, A. i Webster, C. 1996. What predicts nitrous oxide emissions and denitrification N-loss from European soils?. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., 159: 541-547.

Kaiser, E.A. i Heinemeyer, O. 1996. Temporal changes in N_2O-losses from two arable soils. Plant Soil, 181: 57-63.

Kaplan, W.A.; Teal, J.M. i Valiella, I. 1977. Denitrification in salt marsh sediments: Evidence for seasonal temperature selection among populations of denitrifiers. Microbiol. Ecol. 3: 193-204.

Keller, M.T.; Goreau, T.J. i Wofsy, S.C. 1986. Emission of N_2O, CH_4, and CO_2 from tropical forest soils. J. Geophys. Res. 91: 11791-11802.

Killham, K. 1990. Nitrification in coniferous forest soils. Plant Soil, 128: 31-44.

King, D. i Nedwell, D.B. 1984. Changes in the nitrate reducing community of an anaerobic salt marsh sediment in response to seasonal selection by temperature. J. Gen. Microbiol. 130: 343-348.

Klemedtsson, L.; Svensson, B.H. i Rosswall, T. 1987. Dinitrogen and nitrous oxide produced by denitrification and nitrification in soil with and without barley plants. Plant Soil 99: 303-319.

Knowles, R. 1981. Denitrification. A: Soil Biochemistry Vol 5. Eds.: E.A. Paul i J.N. Ladd. Marcel Dekker. NY. pp: 323-369.

Knowles, R. 1990 Acetylene inhibition technique: development, advantages, and potential problems. A: Denitrification in Soil and Sediment. Eds.: N.P. Revsbech i J. Sørensen. Plenum Press. N.Y. pp: 151-166.

Koike, I. i Hattori, A. 1975. Growth yield of a denitrificant bacterium *Pseudomonas denitrificans* under aerobic and denitrifying conditions. J. Gen. Microbial. 88: 1-10.

Körner, H. i Zumft, W.G. 1989. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1670-1676.

Kroeckel, L. i Stolp, H. 1985. Influence of oxygen on denitrification and aerobic respiration in soil. Biol. Fert. Soils. 1: 189-193.

Kroeze, C. i Bouwman, A.F. 1994. Emissions of nitrous oxide (N_2O). A: Non-CO_2 Greenhouse Gases: Why and How to Control?. Eds: J. van Ham, L.J.H.M. Janssen i R.J. Swart. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp: 427-432.

Kroneck, P.M.H. i Zumft, W.G. 1990. Bio-inorganic aspects of denitrification: structures and reactions of N_xO_y compounds and their interaction with iron and copper proteins. A: Denitrification in Soil and Sediment. Eds.: N.P. Revsbech i J. Sørensen. Plenum Press. N.Y. pp: 1-35.

Ladd, J.N.; Jocteur-Monrozier, L. i Amato, M. 1992. Carbon turnover and nitrogen transformations in an Alfisol and Vertisol amended with (U-^{14}C) glucose and (^{15}N) ammonium sulphate. Soil Biol. Biochem. 24: 359-371.

Langeveld, C.A. i Hofman, J.E. 1994. Nitrous oxide production and consumption in peat soils. A: Non-CO_2 Greenhouse Gases: Why and How to Control?. Eds: J. van Ham, L.J.H.M. Janssen i R.J. Swart. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp: 433-438.

Lashof, D.A. i Ahuja, D.R. 1990. Relative contributions of greenhouse gas emissions to global warming. Nature, 344: 529-531.

Lensi, R.; Clays-Josserand, A.; Lescure, C. i Gourbière, F. 1991. Study of spatial distribution of nitrification and denitrification in an acid forest soil. A: Denitrification in Forest Soils. Summaries from a Workshop in Copenhaguen. Dinamarca,1989. Eds.: P. Ineson, A. Kjøller i S. Struwe. Brusel.les.

Letey, J.; Valoras, N.; Focht, D.D. i Ryden, J.C. 1981. Nitrous oxide production and reduction during denitrification as affected by redox potential. Soil Sci. Soc. Am. J. 45: 727-730.

Limmer, A.W. i Steele, K.W. 1982. Denitrification potentials: measurement of seasonal variation using a short-term anaerobic incubation technique. Soil Biol. Biochem. 14: 179-184.

Linn, D.M. i Doran, J.W. 1984. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 48: 1267-1272.

Lipschultz, F.; Zafiriou, O.C.; Wofsy, S.C.; McElroy, M.B.; Valois, F.W. i Watson, S.W. 1981. Production of NO and N_2O by soil nitrifying bacteria. Nature, 294: 641-643.

Livingston, G.P.; Vitousek, P.M. i Matson, P.M. 1988. Nitrous oxide flux and nitrogen transformations across a landscape gradient in Amazonia. J. Geophys. Res. 93: 1593-1599.

Luo, J.; White, R.E.; Ball, P.R. i Tillman, R.W. 1996. Measuring denitrification activity in soils under pasture: optimizing conditions for the short-term denitrification enzyme assay and effects of soil storage on denitrification activity. Soil Biol. Biochem. 28: 409-417.

Malhi, S.S.; McGill, W.B. i Nyborg, M. 1990. Nitrate losses in soils: effect of temperature, moisture and substrate concentration. Soil Biol. Biochem. 22: 733-737.

Mallants, D.; Mohanty, B.P.; Jacques, D. i Feyen, J. 1996. Spatial variability of hydraulic properties in a multi-layered soil profile. Soil Sci. 161: 167-181.

M.A.P.A. 1986. Métodos oficiales de análisis. Tomo III. Ed.: Secretaria General Técnica Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. pp: 532.

Martikainen, P.J. 1985a. Nitrous oxide emission associated with autotrophic ammonium oxidation in acid coniferous forest soil. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1519.

Martikainen, P.J. 1985b. Numbers of autotrophic nitrifiers and nitrification in fertilized forest soil. Soil Biol. Biochem. 17: 245-248.

Martin, K.; Parsons, L.L.; Murray, R.E. i Smith, M.S. 1988. Dynamics of soil denitrifier populations: relationships between enzyme activity, most-probable-number counts, and actual N gas loss. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2711-2716.

McTaggart, I.; Clayton, H. i Smith, K. 1994. Nitrous oxide flux from fertilized grassland: strategies for reducing emissions. A: Non-CO_2 Greenhouse Gases. Why and How to Control? Eds. J. van Ham, L.J.H.M. Janssen i R.J. Swart. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp.: 421-426.

Minami, K. i Ohsawa, A. 1990. Emission of nitrous oxide dissolved in drainage water from agricultural land. A: Soils and the Greenhouse Effects. Ed: A.F. Bouwman. John Wiley i Sons. pp: 503-509. Anglaterra.

Moraghan, T.J. i Buresh, R. 1977. Correction for dissolved nitrous oxide in nitrogen studies. Soil Sci. Soc. Am. J. 41:1201-1202.

Mosier, A.R. 1980. Acetylene inhibition of ammonium oxidation in soil. Soil Biol. Biochem. 12: 443-444.

Mosier, A.R. 1989. Chamber and isotope techniques. A: Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere. Eds: M.O. Andreae i D.S. Schimel. Johns Wiley i Sons. Anglaterra. pp. 175-187.

Mosier, A.R. 1994. Soil-atmosphere exchange of N_2O. A: Book of Abstracts. 8th Nitrogen Workshop. Ghent.

Mosier, A.R.; Guenzi, W.D. i Schweizer, E.E. 1986. Soil losses of dinitrogen and nitrous oxide from irrigated crops in Northeastern Colorado. Soil Sci. Soc. Am. J. 50: 344-348.

Mosier, A.R. i Hutchinson, G.L. 1981. Nitrous oxide emissions from cropped fields. J. Environ. Qual. 10: 169-173.

Mosier, A.R.; Hutchinson, G.L.; Sabey, B.R. i Baxter, J. 1982. Nitrous oxide emissions from barley plots treated with ammonium nitrate or sewage sludge. J. Environ. Qual. 11: 78-81.

Mosier, A.R.; Stillwell, M.; Parton, W.J. i Woodmansee, R.G. 1981. Nitrous oxide emissions from a native shortgrass prairie. Soil Sci. Soc. Am. J. 45: 617-619.

Mummey, D.L.; Smith, J.L. i Bolton, H. Jr. 1994. Nitrous oxide flux from a shrub-steppe ecosystem: sources and regulation. Soil Biol. Biochem. 26: 279-286.

Murray, R.E.; Feig, Y.S. i Tiedje, J.M. 1995. Spatial heterogeneity in the distribution of denitrifying bacteria associated with denitrification activity zones. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2791-2793.

Murray, R.E.; Parsons, L.L. i Smith, M.S. 1989. Kinetics of nitrate utilization by mixed populations of denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 55: 717-721.

Muzio, L.J. i Kramlich, J.C. 1988. An artifact in the measurement of N_2O from combustion sources. Geophys. Res. Lett. 15: 1369-1372.

Myrold, D.D. 1988. Denitrification in ryegrass and winter wheat cropping systems in western Oregon. Soil Sci. Soc. Am. J. 52: 412.

Myrold, D.D. i Tiedje, J.M. 1985. Establishment of denitrification capacity in soil: effects of carbon, nitrate and moisture. Soil Biol. Biochem. 17: 819-822.

Nakahara, K.; Tanimoto, T.; Hatano, K.; Usuda, K. i Shoun, H. 1993. Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNir) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. J. Biol. Chem. 268: 8350-8355.

Nelson, D.W. 1982. Gaseous losses of nitrogen other than through denitrification. A: Nitrogen in Agricultural Soils. Agron. Monogr. nº 22. Ed.: F.J. Stevenson. ASA-CSSA-SSSA. Madison. pp 327-363.

Nelson, S.D. i Terry, R.E. 1996. The effect of soil physical properties and irrigation method on denitrification. Soil Sci. 161: 242-249.

Neyra, C.A.; Dobereiner, J.; Lalande, R. i Knowles, R. 1977. Denitrification by nitrogen-fixing *Spirillum lipoferum*. Can J. Microbiol. 23: 300-305.

Neyra, C.A. i Van Berkum, P. 1977. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum liposferum*. Can. J. Microbiol. 306-310.

Pagan, J.D.; Scowcroft, W.R.; Dudman, W.F. i Gibson, A.H. 1977. Nitrogen fixation in nitrate reductase deficient mutants of cultured *Rhizobia*. J. Bacteriol. 129: 718-723.

Papen, H.; von Berg, R.; Hinkel, I.; Thoene, B. i Rennenberg, H. 1989. Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO_2^-, NO_3^-, N_2O, and NO production in exponentially growing cultures. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2068-2072.

Parkin, T.B. 1987. Soil microsites as a source of denitrification variability. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 1194-1199.

Parkin, T.B. 1990. Characterizing the variability of soil denitrification. A: Denitrification in Soil and Sediment. Eds.: N.P. Revsbech i J. Sørensen. Plenum Press. NY. pp: 213-228.

Parkin, T.B.; Kaspar, H.F.; Sexstone, A.J. i Tiedje, J.M. 1984. A gas-flow soil core method to measure field denitrification rates. Soil Biol. Biochem. 16: 323-330.

Parkin, T.B. i Robinson, J.A. 1989. Stochastic models of soil denitrification. Appl. Environ. Microbiol. 55: 72-77.

Parkin, T.B.; Sexstone, A.J. i Tiedje, J.M. 1985. Adaptation of denitrifying populations to low soil pH. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1053-1056.

Parkin, T.B.; Starr, J.L. i Meisenger, J.J. 1987. Influence of sample size on measurement of soil denitrification. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 1492-1501.

Parkin, T.B. i Tiedje, J.M. 1984. Application of a soil core method to investigate the effect of oxygen concentration on denitrification. Soil Biol. Biochem. 16: 331-334.

Parsons, L.L.; Murray, R.E. i Smith, M.S. 1991. Soil denitrification dynamics: spatial and temporal variations of enzyme activity, populations, and nitrogen gas loss. Soil Sci. Soc. Am. J. 55: 90-95.

Payne, W.J. 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriol. Rev. 37: 409-452.

Payne, W.J. i Balderston, W.L. 1978. Denitrification. A: Microbiology. Ed.: D. Schlessinger. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp.: 339-345.

Pearman, G.I.; Etheridge, D.; de Silva, F. i Fraser, P.J. 1986. Evidence of changing concentrations of atmospheric CO_2, N_2O and CH_4 from air bubbles in Antarctic ice. Nature, 320:248-250.

Pell, M.; Stenberg, B.; Stenström, J. i Torstensson, L. 1996. Potential denitrification activity assay in soil - with o without chloramphenicol?. Soil Biol. Biochem. 28: 393-398.

Pennock, D.J.; van Kessel, C.; Farrell, R.E. i Sutherland, R.A. 1992. Landscape-Scale variations in denitrification. Soil Sci. Soc. Am. J. 56: 770-776.

Peterjohn, W.T. 1991. Denitrification: enzyme content and activity in desert soils. Soil Biol. Biochem. 23: 845-855.

Peterjohn, W.T. i Schlesinger, W.H. 1991. Factors controlling denitrification in a Chihuahuan desert ecosystem. Soil Sci. Soc. Am. J. 55: 1694-1701.

Poth, M. i Focht, D.D. 1985. ^{15}N kinetic analysis of N_2O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1134-1141.

Reddy, K.R.; Rao, P.S.C. i Jessup, R.E. 1982. The effect of carbon mineralization on denitrification kinetics in mineral and organic soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 46: 62-68.

Reinertsen, S.A.; Elliot, L.F.; Cochran, V.L. i Campbell, G.S. 1984. Role of available carbon and nitrogen in determining the rate of wheat straw decomposition. Soil Biol. Biochem. 16: 459-464.

Ritchie, G.A.F. i Nicholas, D.J.D. 1972. Identification of the sources of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. Biochem. J. 126: 1181-1191.

Robert, M. i Chenu, C. 1992. Interactions between soil minerals and microorganisms. A: Soil Biochemistry. Vol 7. Eds.: G. Stotzky i J.M. Bollag. Marcel Dekker. NY. pp: 307-404.

Robertson, G.P.; Andreae, M.O.; Bingemer, H.G.; Crutzen, P.J.; Delmas, R.A.; Duyzer, J.H.; Fung, I.; Harriss, R.C.; Kanikidou, M.; Melillo, J.M. i Zavarzin, G.A. 1989b. Trace gas exchange and the chemical and physical climate: critical interactions. A: Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere. Eds.: M.O. Andreae i D.S. Schimel. John Wiley i Sons Ltd. S. Bernhard. pp 303-320.

Robertson, G.P.; Huston, M.A,; Evans, F.C. i Tiedje, J.M. 1988. Spatial variability in a successional plant community: patters of nitrogen availability. Ecology, 69: 1517-1524.

Robertson, G.P. i Tiedje, J.M. 1984. Denitrification and nitrous oxide production in old growth and successional Michigan forests. Soil Sci. Soc. Am. J. 48: 383-389

Robertson, G.P. i Tiedje, J.M. 1987. Nitrous oxide sources in aerobic soils: nitrification, denitrification and other biological processes. Soil Biol. Bicohem. 19: 187-193.

Robertson, G.P.; Vitousek, P.M.; Matson, P. i Tiedje, J.M. 1987. Denitrification in a clearcut Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) plantation in the southeastern US. Plant Soil, 97: 119-129.

Robertson, L.A.; Cornelisse, R.; de Vos, P.; Hadioetomo, R. i Kuenen, J.G. 1989a. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. Antonie van Leeuwenhoek, 56: 289-299

Robertson, L.A. i Kuenen, J.G. 1990a. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 57: 139-152.

Robertson, L.A. i Kuenen, J.G. 1990b. Physiological and ecological aspects of aerobic denitrification, a link with heterotrophic nitrification?. A: Denitrification in Soil and Sediment. Eds: N.P. Revsbech i J.Sørensen. Plenum Press. N.Y. pp: 91-104.

Robertson, L.A. i Kuenen, J.G. 1991. Physiology of nitrifying and denitrifying bacteria. A: Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides, and Halomethanes. Eds: J.E. Rogers i W.B. Whitman. American Society for Microbiology. Washington, USA. pp: 189-199.

Rolston, D. E.; Rao, P.S.C.; Davidson, J.M. i Jessup, R.E. 1984. Simulation of denitrification losses of nitrate fertilizer applied to uncropped, cropped and manure-amended field plots. Soil Science. 137: 270-279.

Rolston, D.E.; Sharpley, A.N.; Toy, D.W. i Broadbent, F.E. 1982. Field measurement of denitrification: III. Rates during irrigation cycles. Soil Sci. Soc. Am. J. 46: 289-296.

Ronen, P.; Magaritz, M. i Almon, E. 1988. Contaminated aquifers are a forgotten component of the global N_2O budget. Nature. 335: 57-59.

Rossi, R.E.; Mulla, D.J.; Journel, A.G. i Franz, E.H. 1992. Geostatistical tools for modelling and interpreting ecological spatial dependence. Ecol. Monogr. 62: 277-314.

Rosswall, T.; Bak, F.; Baldocchi, D.; Cicerone, R.J.; Conrad, R.; Ehhalt, D.H.; Firestone, M.K.; Galbally, I.E.; Galchenko, V.F.; Groffman, P.M.; Papen, H.; Reeburgh, W.S.; Sanhueza, E. 1989. What regulates production and consumption of trace gases in ecosystems: biology or physicochemistry?. A: Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere. Eds.: M.O. Andreae i D.S. Schimel. John Wiley i Sons Ltd. S. Bernhard. pp 73-95.

Ryden, J.C. 1981. N_2O exchange between a grassland soil and the atmosphere. Nature, 292: 235-237.

Ryden, J.C. 1982. Effects of acetylene on nitrification and denitrification in two soils during incubation with ammonium nitrate. J. Soil Sci. 33: 263-270.

Ryden, J.C. i Lund, L.J. 1980. Nature and extent of directly measured denitrification losses from some irrigated vegetable crop production units. Soil Sci. Soc. Am. J. 44: 505-511.

Ryden, J.C.; Lund, L.J. i Focht, D.D. 1979. Direct in-field measurement of nitrous oxide flux from soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 42: 731-737.

Samuelsson, M.-O.; Cadez, P. i Gustafsson, L. 1988. Heat production by the denitrifying bacterium *Pseudomonas fluorescens* and the dissimilatory ammonium-producing bacterium *Pseudomonas putrefaciens* during anaerobic growth with nitrate as the electron acceptor. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2220-2225.

SAS Institute Inc. 1990. SAS/STAT User's guide, Version 6. Fourth Ed.: SAS Institute. Cary, NC. pp: 889.

Schimel, J.; Robertson, G.P; Baldocchi, D.; Bogner, J.; Davidson, E.; Duyzer, J.; Ehhalt, D.; Fowler, D.; Groffman, P.; Haider, K.; Isadorov, V.; Klemedtsson, L.; Melillo, J.; Smith, K.; Su, W.H. i Wieprecht, W. 1992. Impacts of trace gas fluxes in mid-latitude ecosystems. Ecol. Bull. 42: 124-132.

Schimel, J.P.; Firestone, M.K. i Killham, K.S. 1984. Identification of heterotrophic nitrification in a Sierran forest soil. Appl. Environ. Microbiol. 48: 802-806.

Schmidt, E.L. 1982. Nitrification in soil. A: Nitrogen in Agricultural Soils. Agron. Monogr. nº 22. Ed.: F.J. Stevenson. ASA-CSSA-SSSA. Madison, USA. pp: 253-288.

Sexstone, A.J.; Parkin, T.B. i Tiedje, J.M. 1985. Temporal response of soil denitrification rates to rainfall and irrigation. Soil Sci. Soc. Am. J. 49: 99-103.

Sexstone, A.J.; Parkin, T.B. i Tiedje, J.M. 1988. Denitrification response to soil wetting in aggregated and unaggregated soil. Soil Biol. Biochem. 20: 767-769.

Shoun, H.; Kim, D.H.; Uchiyama. H. i Sugiyama, J. 1992. Denitrification by fungi. FEMS Microbiol. Lett. 94: 277-282.

Skiba, U; Fowler, D. i Smith, K. 1994. Emissions of NO and N_2O from soils. A: Non-CO_2 Greenhouse Gases. Why and How to Control?. Eds.: J. van Ham, L.J.H.M. Janssen i R.J. Swart. Kluwer Academic Press. Holanda. pp 153-158.

Skiba, U.; Smith, K.A. i Fowler, D. 1993. Nitrification and denitrification as sources of nitric oxide and nitrous oxide in a sandy loam soil. Soil Biol. Biochem. 25: 1527-1536.

Smid, A.E. i Beauchamp, E.G. 1976. Effects of temperature and organic matter on denitrification in soil. Can. J. Soil Sci. 56: 385-391.

Smith, C.J. i Patrick, W.H. 1983. Nitrous oxide emission as affected by alternate anaerobic and aerobic conditions from soil suspensions enriched with ammonium sulfate. Soil Biol. Biochem. 15: 693-697.

Smith, K.A. 1990. Anaerobic zones and denitrification in soil: modelling and measurement. A: Denitrification in Soil and Sediment. Eds.: N.P. Revsbech i J. Sørensen. Plenum Press. NY. pp 229-244.

Smith, K.A. i Arah, J.R.M. 1990. Losses of Nitrogen by Denitrification and Emissions of Nitrogen Oxides from Soils.The Fertilizer Society, London. 34 pp.

Smith, M.S. 1983. Nitrous oxide production by *Escherichia coli* is correlated with nitrate reductase activity. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1545-1547.

Smith, M.S.; Firestone, M.K. i Tiedje, J.M. 1978. The acetylene inhibiton method for short-term measurement of soil denitrification and its evaluation using Nitrogen-13. Soil Sci. Soc. Am. J. 42: 611-615.

Smith, M.S. i Parsons, L.L. 1985. Persistence of denitrifying enzyme activity in dried soils. Appl. Environ. Microbiol. 49: 316-320.

Smith, M.S. i Tiedje, J.M. 1979. Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. Soil Biol. Biochem. 11: 261-267.

Smith, M.S. i Zimmerman, K. 1981. Nitrous oxide production by nondenitrifying soil nitrate reducers. Soil Sci. Soc. Am. J. 45: 865-871.

Smith, R.V.; Doyle, R.M.; Burns, L.C. i Stevens, R.J. 1997. A model for nitrite accumulation in soils. Soil Biol. Biochem. 29: 1241-1247.

Soil Survey Staff. 1992. Keys to Soil Taxonomy, 5ena Edició. SMSS Technical Monogr. nº 19. Pocahontas Press, Inc. Blacksburg, Virginia. pp: 556.

Sorokin, Y.D. 1989. Heterotrophic nitrification of *Alcaligenes* bacteria. Microbiology. 58: 1-14

Stanford, G.; Legg, J.O.; Dzienia, S. i Simpson Jr., E.C. 1975a. Denitrification and associated nitrogen transformations in soils. Soil Sci. 120: 147-152.

Stanford, G.; Stanislaw, D. i Vander Pol, R.A. 1975b. Effect of temperature on denitrification rate in soils. Soils Sci. Soc. Am. Proc. 39: 867-870.

Stevenson, F.J. 1982. Origin and distribution of nitrogen in soil. A: Nitrogen in Agricultural Soils. Agron. Monogr. nº 22. ASA, CSSA i SSSA. Madison, USA. pp: 1-42.

Stevenson, F.J. 1986. Cycles of Soil. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. John Wiley i Sons. N.Y. pp.: 380.

Stolarski, R.; Bojkov, R.; Bishop, L.; Zerefos, C.; Staehelin, J. i Zawodny, J. 1992. Measured trends in stratospheric ozone. Science, 26:342-349.

Stroo, H.F.; Klein, T.M. i Alexander, M. 1986. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil and by and acid-tolerant fungus. Appl. Environ. Microbiol. 52: 1107- 1111.

Tamm, C.O. 1991. Nitrogen in Terrestrial Ecosystems. Questions of Productivity, Vegetational Changes, and Ecosystem Stability. Ecological Stuides, Vol. 81. Eds.: W.D. Billings, F. Golley, O.L. Lange, J.S. Olson i H. Remmert. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemanya. pp: 115.

Terry, R.E. i Duxbury, J.M. 1985. Acetylene decomposition in soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 49: 90-94.

Terry, R.E.; Jellen, E.N. i Breakwell, D.P. 1986. Effect of irrigation method and acetylene exposure on field denitrification measurements. Soil Sci. Soc. Am. J. 50: 115-120.

Terry, R.E.; Tate III, R.L. i Duxbury, J.M. 1981. The effect of flooding on nitrous oxide emissions from an organic soil. Soil Sci. 132: 228-232.

Tiedje, J.M.; Sexstone, A.J.; Parkin, T.B. i Revsbech, N.P. 1984. Anaerobic processes in soil. Plant Soil, 76: 197-212.

Tiedje, J.M.; Simkins, S. i Groffman, P.M. 1989. Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods. Plant Soil, 115: 261-284.

Tortoso, A.C. i Hutchinson, G.L. 1990. Contributions of autotrophic and heterotrophic nitrifiers to soil NO and N_2O emissions. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1799-1805.

Trangmar, B.B.; Yost, R.S. i Vehara, G. 1985. Application of geostatistics to spatial studies of soil properties. Adv. Agronom. 38: 45-94.

Umarov, M.M. 1990. Biotic sources of nitrous oxide (N_2O) in the context of the global budget of nitrous oxide. A: Soils and the Greenhouse Effect. Ed: A.F. Bouwman. John Wiley i Sons. Anglaterra. pp: 263-268.

Usuda, K.; Toritsuka, N.; Matsuo, Y.; Kim, D.H. i Shoun, H. 1995. Denitrification by the fungus *Cylindrocarpon tonkinense*: anaerobic cell growth and two isozyme forms of cytochrome P-450nor. Appl. Environ. Microbiol. 61: 883-889.

Van Cleemput, O. 1984. Study of nitrogen reduction phenomena in soil. Academiae Analecta, 1: 56-75.

Van Cleemput, O.; Abboud, S. i Baert, L. 1988. Denitrification and interaction between its intermediate compounds. A: Nitrogen Efficiency in Agricultural Soils. Eds.: D.S. Jenkinson i K.A. Smith. Elsevier Applied Science. London. pp: 302-311.

Van Cleemput, O. i Baert, L. 1984. Nitrite: a key compound in N loss processes under acid conditions. Plant Soil, 76: 233-241.

Van Cleemput, O.; Vermoesen, A.; De Groot, C.J. i Van Ryckeghem, K. 1994. Nitrous oxide emission out of grassland. A: Non-CO_2 Greenhouse Gases. Why and How to Control? Eds. J. van Ham, L.J.H.M. Janssen i R.J. Swart. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp.: 145-152.

Van Kessel, C; Pennock, D.J. i Farrell, R.E. 1993. Seasonal variations in denitrification and nitrous oxide evolution at the landscape scale. Soil Sci. Soc. Am. J. 57: 988-995.

Van Niel, , E.W.J.; Braber, K.J.; Robertson, L.A. i Kuenen, J.G. 1992. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD. Antonie van Leeuwenhoek, 62: 231-237.

Velthof, G.L. i Oenema, O. 1994a. Effects of type of fertilizer nitrogen on nitrous oxide fluxes from grassland. A: Book of Abstracts. 8th Nitrogen Workshop. Ghent.

Velthof, G.L. i Oenema, O. 1994b. Nitrous oxide emission from grasslands on sand, clay and peat soils in The Netherlands. A: Non-CO_2 Greenhouse Gases. Why and How to Control? Eds. J. van Ham, L.J.H.M. Janssen i R.J. Swart. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp.: 439-444.

Vinther, F.P. 1984. Total denitrification and the ratio between N_2O and N_2 during the growth of spring barley. Plant Soil, 76: 227-232.

Vitousek, P.M.; Gosz, J.R.; Grier, C.C.; Melillo, J.M.; Reiners, W.A. i Todd, R.L. 1979. Nitrate losses from disturbed ecosystems. Science, 204: 469-474.

Volk, B.G. i Loeppert, R.H. 1982. Soil Organic Matter. A: Handbook of Soils and Climate in Agriculture. Ed.: V.J. Kilmer. CRC Press, Florida. pp: 211-268.

Weier, K.L.; Doran, J.W.; Power, J.F. i Walters, D.T. 1993. Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate. Soil Sci. Soc. Am. J. 57: 66-72.

Weiss, R.F. i Craig, H. 1976. Production of atmospheric nitrous oxide by combustion. Geophys. Res. Lett. 3: 751-753.

Wu, Q. i Knowles, R. 1995. Effect of chloramfhenicol on denitrification in *Flexibacter canadiensis* and *Pseudomonas denitrificans*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 434-437.

Wu, Q.; Knowles, R. i Niven, D.F. 1994. O_2 regulation of denitrification in *Flexibacter canadiensis*. Can. J. Microbiol. 40: 916-921.

Yoshinari, T. 1990. Emissions of N_2O from various environments - the use of stable isotope composition of N_2O as tracer for the studies of N_2O biogeochemical cycling. A: Denitrification in Soil and Sediment. Eds: N.P. Revsbech i J.Sørensen. Plenum Press. N.Y. pp: 129-150.

Yoshinari, T.; Hynes, R. i Knowles, R. 1977. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. Soil Biol. Biochem. 9: 177-183.

Yoshinari, T. i Knowles, R. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. Biochem. Biophys. Res. Com. 69: 705-710.

Zablotowicz, R.M.; Eskew, D.L. i Focht, D.D. 1978. Denitrification in *Rhizobium*. Can. J. Microbiol. 24: 757-760.