



Universitat de Lleida

Fertilización con residuos ganaderos y compost urbano: mitigación de emisiones de amoníaco y calidad del suelo

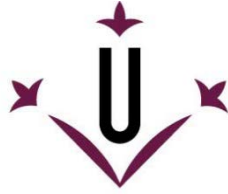
Alcira Sunilda Valdez Ibañez

<http://hdl.handle.net/10803/667465>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESIS DOCTORAL

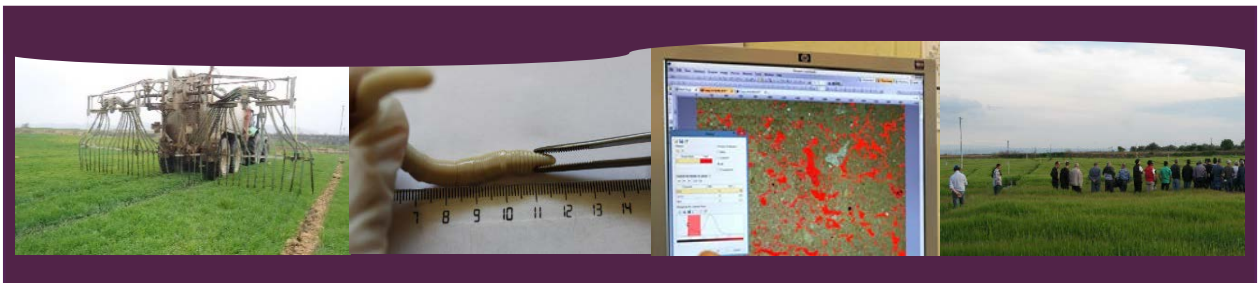
Fertilización con residuos ganaderos y compost urbano: mitigación de emisiones de amoníaco y calidad del suelo

Alcira Sunilda Valdez Ibañez

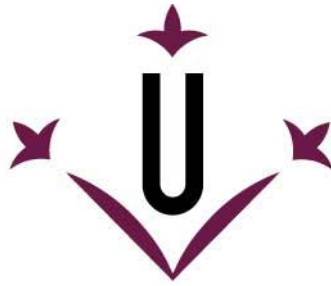
Memoria presentada para optar por el grado de Doctor por la Universitat de Lleida
Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria

Directoras

Dra. Ángela Dolores Bosch Serra
Dra. María Rosa Yagüe Carrasco



Lleida, junio 2019



Universitat de Lleida

TESIS DOCTORAL

Fertilización con residuos ganaderos y compost urbano: mitigación de emisiones de amoníaco y calidad del suelo

Alcira Sunilda Valdez Ibañez

Memoria presentada para optar por el grado de Doctor por la Universitat de Lleida
Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria

Directoras

Dra. Ángela Dolores Bosch Serra
Dra. María Rosa Yagüe Carrasco

Lleida, junio 2019

Fertilización con residuos ganaderos y compost urbano: mitigación de emisiones de amoníaco y calidad del suelo

Memoria presentada por:

Alcira Sunilda Valdez Ibañez

En satisfacción de los requisitos para optar por
el grado de Doctor

Directoras

Dra. Àngela Dolores Bosch Serra

Dra. María Rosa Yagüe Carrasco

Lleida, junio 2019

Soy una mujer muy afortunada que vive en el corazón de Sudamérica, Paraguay. Unas guerreras de la vida me han criado y educado con grandes sueños académicos y estuvieron a mi lado para realizarlos. Hoy con gran sentido de agradecimiento les dedico mi tesis doctoral.

Antonina († abuela), ***Isolina*** (mamá) y ***Erma*** (tía)

Agradecimientos

Tengo tanto que agradecer a *Dios* y a la *Virgen de Caacupé* y *María Auxiliadora*: por la vida y por poner a mucha gente maravillosa en mi camino que de alguna u otra manera me han ayudado a llegar a la meta.

Principalmente a las Dras. *Ángela D. Bosch Serra* y *María R. Yagüe Carrasco*, mis directoras. Por la excepcional ayuda constante, por las horas de dedicación y sobre todo por también ser la voz de aliento en momentos difíciles durante casi 4 años. Y sin exagerar en lo más mínimo, serán siempre para mí un modelo de investigadora organizada, perseverante y humilde, a seguir desde el otro lado del Atlántico.

A los *co-autores de los capítulos* de esta tesis. Sin ustedes sería imposible la obtención de la información y su interpretación contextual.

A la gente del *Departamento de Medio Ambiente y Ciencias del Suelo* de la UdL, en especial a *Montse Antúnez* y *Silvia Porras*, gracias por la paciencia y enseñanzas en el laboratorio. Aprendí mucho con ustedes. A *Clara Llana* y *Silvana Nacci*, las que siempre daban ánimos al pasar.

A la gente del *Departamento de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación*, en especial a *Carlos Ortiz*, *Elena Puigpinós* y *Josep M. Llop* por la ayuda en los trabajos de campo.

Stefanía y *Marta*, maravillosas chicas, con ustedes todo fue más llevadero. *Carlos*, *Lluïsa* y *Leyre* siempre les tendré como mi flia ilerdense. Y a *Elisa*, mi amiga italiana, siempre tendrá un lugar especial en mis recuerdos europeos.

A mi amiga coterránea *Felicina*, gracias por los cientos de mensajes de aliento y cariño.

A *mi familia* y *Cristhian Manuel*, por ser los apoyos a distancia fundamentales para este logro, gracias por tanto amor. Y a mi *mami Isolina*, mi heroína sin capa, un gran beso y abrazo de gratitud.

Además, un agradecimiento especial a la *Fundación Carolina (FC)*, quienes apuestan a la formación de jóvenes iberoamericanos en pos del desarrollo sostenible, y que conjuntamente con la *Universidad de Lleida* y la *Universidad Nacional de Asunción*, me

han otorgado la beca de doctorado. *Juan Torres* ha sido un excelente coordinador de becas de la FC.

La investigación presentada en esta tesis doctoral se realizó gracias al apoyo económico del proyecto europeo LIFE12 ENV/ES/000647 a través del subcontrato con la Universidad de Lleida AG-2016-466 y los proyectos RTA2013-57-C5-5 y RTA2017-88-C3-3 financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad de España y el Instituto Nacional de Investigación y Experimentación Agrícolas de España (MINECO-INIA).

Y finalmente, a mí querida *Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción*, gracias por la oportunidad de formarme en el exterior. Ahora estoy entusiasmada por compartir nuevas experiencias y retribuir la confianza brindada. A *Lorenzo Meza* (ex decano), *Miguel Ruiz Díaz* (ex vice-decano), *Luis Guillermo Maldonado* (Decano), *Gloria Ovelar* (Directora de Investigación) e *Ignacio Ozuna* (ex director) por ser el soporte institucional y personal necesario para este logro.

Con una inmensa felicidad.... Gracias!

Índice general

Índice general	i
Índice de tablas.....	iv
Índice de figuras	vi
Abreviaturas.....	viii
Resumen	xi
Abstract.....	xiii
Resum	xv
Capítulo 1: Introducción, objetivos generales y estructura de la tesis.....	1
1.1 Introducción.....	3
1.2 Objetivos de la tesis	8
1.3 Estructura de la tesis.....	9
Referencias.....	11
Capítulo 2: Mitigation of ammonia emissions: field strategies in semi-arid Mediterranean irrigated systems	15
Abstract.....	17
2.1 Introduction	18
2.2 Materials and methods	20
2.2.1 The site.....	20
2.2.2 Experimental setup	21
2.2.3 Quantification of volatilized ammonia and statistical analysis	23
2.3. Results	28
2.4 Discussion.....	30
2.5 Conclusions.....	31
Acknowledgments.....	32
References.....	33
Supplemental tables.....	37

Capítulo 3: Fertilización con purín porcino: impacto sobre las lombrices de tierra en agricultura de secano	43
Resumen	45
Abstract	46
3.1 Introducción	47
3.2 Materiales y métodos.....	48
3.3 Resultados y discusión	51
3.4 Conclusiones	57
Agradecimientos	57
Referencias	59
Capítulo 4: Earthworm community and soil microstructure changes with long-term organic fertilization.....	63
Abstract	65
4.1 Introduction.....	66
4.2 Materials and methods.....	69
4.2.1 Experimental framework.....	69
4.2.2 Description of the experiment.....	70
4.2.3 Earthworm sampling and community characterization	71
4.2.4 Earthworm bioturbation and micromorphological soil traits.....	72
4.2.5 Data analysis	73
4.3 Results	73
4.4 Discussion	79
4.5 Conclusions.....	82
Acknowledgments.....	82
References	83
Capítulo 5: Long-term fertilization with dairy cattle slurry in intensive production systems: effects on soil porosity and pore morphology	89
Abstract	91
Resumen	92
5.1 Introduction.....	93

5.2 Materials and methods	94
5.2.1 Soil and climatic characteristics	94
5.2.2 Experimental context	95
5.2.3 Soil sampling and soil porosity analysis: pore-size distribution and shape	96
5.2.4 Statistical analysis	97
5.3 Results	97
5.4 Discussion	101
5.5 Conclusions	103
Acknowledgments	103
References	104
Capítulo 6: Discusión general.....	107
6.1 Calidad ambiental: evaluación de las pérdidas de NH ₃ por volatilización y estrategias de mitigación	109
6.1.1 Fertilización con purín porcino en presiembra (suelo desnudo)	109
6.1.2 Fertilización con purín porcino en cobertura (cultivo).....	111
6.2 Efecto de diferentes fertilizantes orgánicos y sistemas agrarios en las propiedades biológicas y físicas del suelo	113
6.2.1 Implicaciones de la fertilización orgánica a largo plazo en las lombrices de tierra y bioturbación de lombrices de tierra	113
6.2.2 Implicaciones de la fertilización orgánica a largo plazo en la porosidad y forma de los poros del suelo.....	117
Referencias	119
Capítulo 7: Conclusiones generales y recomendaciones.....	125
7.1 Conclusiones generales	127
7.2 Recomendaciones para futuras investigaciones.....	129

Índice de tablas

Table 2.1. Dry matter and total-N content (ammonium-N and organic-N fractions are included) in slurries applied at different doses using splash-plate (-SP) and trail hoses (-TH) before sowing (S-) and at cereal tillering stage (T-).....	23
Table 2.2. Average of climate parameters ^a recorded during 24h after slurry application before sowing and at cereal tillering stage	23
Table 2.3. Average values of accumulated NH ₃ -N losses (TANL) and relative NH ₃ -N losses to total N applied (AL_Nt) and to NH ₄ ⁺ -N applied (AL_NH ₄ ⁺ -N) before sowing, for each method, and determined for molecular (Foam I) and turbulent (Foam II) diffusion. Standard error of the mean (n = 3) is included.....	25
Table 2.4. Average values of accumulated NH ₃ -N losses (TANL) and relative NH ₃ -N losses to total N applied (AL_Nt) and to NH ₄ ⁺ -N applied (AL_NH ₄ ⁺ -N) at cereal tillering, for each method, and determined for molecular (Foam I) and turbulent (Foam II) diffusion. Standard error of the mean (n = 3) is included.....	26
Table S1. Analysis of variance ^a of ammonia (g NH ₃ -N h ⁻¹ ha ⁻¹) trapped in Foam I (molecular diffusion) and in Foam II (turbulent diffusion) during different periods of time after slurry spreading over bare soil (before sowing) by two different methods (or treatments, TR): splash-plate and trail hoses	38
Table S2. Analysis of variance ^a of ammonia (g NH ₃ -N h ⁻¹ ha ⁻¹) trapped in Foam I (molecular diffusion) and in Foam II (turbulent diffusion) during different periods of time after slurry spreading at cereal tillering by two different methods (or treatments, TR): splash-plate and trail hoses	39
Table S3. Analysis of variance ^a of total accumulated (TANL, kg NH ₃ -N ha ⁻¹) and relative ammonia losses (AL_Nt%, NH ₃ -N losses to total N applied; AL_NH ₄ ⁺ -N%, NH ₃ -N losses to NH ₄ ⁺ -N applied) trapped in Foam I (molecular diffusion) and in Foam II (turbulent diffusion) during different periods of time after slurry spreading over bare soil (before sowing) by two different methods (or treatments, TR): splash-plate and trail hoses	40
Table S4. Analysis of variance ^a of total accumulated (TANL, kg NH ₃ -N ha ⁻¹) and relative ammonia losses (AL_Nt%, NH ₃ -N losses to total N applied; AL_NH ₄ ⁺ -N%, NH ₃ -N losses to NH ₄ ⁺ -N applied) trapped in Foam I (molecular diffusion) and in Foam II (turbulent diffusion) during different periods of time after slurry spreading at cereal tillering by two different methods (or treatments, TR): splash-plate and trail hoses	41
Tabla 3.1. Descripción de los diferentes tratamientos de fertilización mantenidos durante los 12 años del experimento y las dosis de N total aplicadas en la campaña 2015–2016 previa al muestreo.	50
Tabla 3.2. Análisis de varianza de los datos normalizados (transformación raíz cuadrada) de la abundancia (juveniles, adultos e individuos totales) y de la biomasa de lombrices de tierra para los diferentes tratamientos de fertilización.	53
Tabla 3.3. Valores medios y error estándar de la abundancia (juveniles, adultos e individuos totales) y biomasa de lombrices de tierra para los diferentes tratamientos de fertilización.	53

Table 4.1. Classification of the earthworm bioturbation and the micromorphological description of the associated soil structure	72
Table 4.2. Analysis of variance of earthworm bioindicators: total abundance (individuals m ⁻²); juvenile abundance (individuals m ⁻²), earthworm biomass (g m ⁻²), and earthworm bioturbation (% of total soil section area) classified in three types: Type 0 (absence), Type 1 (burrows) and Type 2 (casts)	76
Table 4.3. Average values (n = 3) of total and juvenile earthworm abundance (individuals m ⁻²), earthworm biomass (g m ⁻²) and distribution (%) of the earthworm community for the different fertilizer treatments	76
Table 4.4. Micromorphological description ^a of microstructures and morphological types of voids from different fertilizer treatments	78
Table 5.1. Analysis of variance (DF = degrees of freedom, MS = mean squares, <i>P</i> = probability value) of the porosity (> 30µm) and their pore apparent diameter (AD) distribution (%) according to the fertilization treatments (TR)	98
Table 5.2. Average porosity (> 30µm) values (%) ^a (n = 6) and its distribution in different pore apparent diameter ranges ^b for each fertilization treatment ^c	98
Table 5.3. Analysis of variance (DF = degrees of freedom, MS = mean square, <i>P</i> = probability value) of different shape descriptors for each fertilization treatment (TR) and for the different ranges of pore apparent diameters (AD).....	100
Table 5.4. Average values ^a of the pore shape descriptors for each fertilization treatment ^b and for the different ranges of apparent pore diameters.....	101

Índice de figuras

- Figure 2.1.** Monthly time series of rainfall, reference crop evapotranspiration (ET_o, Allen et al., 1998) and minimum and maximum temperatures during the growing season (2015-2016) recorded nearby (8 km) the experimental field. (<http://www.Ruralcat.net>; Vallfogona de Balaguer) 20
- Figure 2.1.** Temperature (solid lines) and relative humidity (dashed lines) of the air, rainfall and wind speed in hourly basis measured after slurry application before sowing (A, B, C) and at cereal tillering stage (D, E, F). The soil water content (% w/w) is plotted taking as a reference the permanent wilting point (PWP) and the water filling capacity (WFC) 22
- Figure 2.3.** Molecular (A) and turbulent (B) diffused ammonia trapped over bare soil before sowing. Mean emission flux values (g NH₃-N h⁻¹ ha⁻¹) for the different periods are also shown in a table below the time-axis. In the graph, vertical bars indicate ± standard error of the mean (9 samples) and numbers upon the columns indicate the level of significance of the differences between methods (ANOVA analysis) 27
- Figure 2.4.** Molecular (A) and turbulent (B) diffused ammonia trapped at cereal tillering stage. Mean emission flux values (g NH₃-N h⁻¹ ha⁻¹) for each period of measurements are specified below the time-axis. In the graph, vertical bars indicate ± standard error of the mean (9 samples) and numbers upon the columns indicate the level of significance of the differences between methods (ANOVA analysis) 29
- Figura 3.1.** Características de diagnóstico (1) y generales (2) de la especie *Koinodrilus roseus*. (1) quetas pareadas (QP), poros masculinos (PM) en el segmento 15, pigmentación dorsal sin bandas, prostomio (P) epilóbico cerrado, clitelo (C) del 25–32, tubérculos pubertarios (TP) 29–31, primer poro dorsal en 4/5, coloración rosa en vivo (2) número de segmentos del cuerpo 120–165, longitud 25–70 mm, anchura 2–4 mm, poros nefridianos en la línea área B cerca de la línea b de quetas, poros de espermatecas en los surcos intersegmentarios 9/10 y 10/11 área D, poróforos en general sin rebasar el segmento 15. Fotos dorsales y ventrales fueron adaptadas de Pérez y Rodríguez (2008) 52
- Figura 3.2.** Características de diagnóstico (1) y generales (2) de la especie *Nicodrilus trapezoides*. (1) Quetas pareadas (QP), poros masculinos (PM) en el segmento 15, pigmentación dorsal sin bandas, prostomio (P) epilóbico cerrado, clitelo (C) del 25–34, tubérculos pubertarios (TP) 31–33 sin estrechamiento en 32, papilas mamelonares (PM) en los segmentos 9–11 (Pma), papilas clitelares (PC) en la quetas ab de 30, 32 y 33, primer poro dorsal en 7/8 o 8/9 o 9/10 pigmentación dorsal parda (2) número de segmentos del cuerpo 122–188, longitud 55–148 mm, anchura 3–5 mm, poróforos ½ 14–½ 16. Fotos dorsales y ventrales fueron adaptadas de Pérez y Rodríguez (2008) 52
- Figura 3.3.** Composición porcentual de las dos especies de lombrices de tierra según los distintos tratamientos de fertilización: FM, fertilización mineral; PE, purín de cerdo de engorde, los números indican las dosis teóricas en peso fresco aplicadas: 30 t ha⁻¹ año⁻¹ aplicado en pre-siembra, 40 y 60 t ha⁻¹ año⁻¹ aplicado en cobertera; PM, purín de cerdo de maternidad aplicado en cobertera, los números indican las dosis en peso fresco

aplicadas: 60 y 90 t ha ⁻¹ año ⁻¹ ; 30PE–90PM con aporte combinado de purín de cerdo de engorde (pre-siembra) y maternidad (cobertera) a dosis de 30 y 90 t ha ⁻¹ año ⁻¹ , respectivamente.	55
Figura 3.4. Relación entre la abundancia (individuos totales) y biomasa de lombrices de tierra y la dosis de N aplicada (* <i>P</i> < 0,05) cuando se fertiliza con purines. Se señalan las aplicaciones de N como fertilizante mineral (■), como purín de cerdo de engorde (●) en las que se incluye purín de madres reproductoras (▲) y las aplicación combinada de purín de engorde y madres (◆).....	56
Figure 4.1. Monthly rainfall, reference crop evapotranspiration (ET _o , FAO Penman–Monteith equation), and monthly average of air temperature during the cropping year (August 2015 – July 2016). Data were obtained from the Tàrrega meteorological station, located 15 km from the experimental site (UTMX, UTM Y: 347015.00, 4614430.00).	70
Figure 4.2. Scanned images of thin sections used for the description of the microstructure, types of voids and micromorphological earthworm bioturbation (Type 0, absence of bioturbation: anthropogenic and unidentified processes; Type 1, burrows; Type 2, cast) from different fertilizer treatments. Treatments were: CO, control; MF, mineral N fertilizer; SC, sludge compost, numbers indicate the applied rate of 4 or 8 t ha ⁻¹ ; PS, pig slurry applied at a rate of 27 t ha ⁻¹	74
Figure 4.3. Presence (%) of the different earthworms' bioturbation types in the different fertilization treatments. Mean values followed by different letter were significantly different at the 0.05 probability level based on the Fisher's Least Significant Difference test. Codes for bioturbation were: Type 0, absence of bioturbation: anthropogenic and indefinite processes; Type 1, burrows; Type 2, casts. Codes for treatments were: CO, control; MF, mineral N fertilizer; SC, sludge compost, numbers indicate the applied rate of 4 or 8 t ha ⁻¹ ; PS, pig slurry applied at a rate of 27 t ha ⁻¹	75
Figure 4.4. Fresh plant material in soil. a) fresh material in treatments with sewage compost (SC) attacked by soil organisms other than earthworms (oribatids). b) mixed soil materials due to earthworm bioturbation in pig slurry (PS) treatment.	77
Figure 5.1. Porosity images (black color) from thin sections, vertically orientated from the soil surface, and for the different fertilizer treatments: Control (without slurry addition). dairy cattle slurry at a rate of 170 kg N ha ⁻¹ (170DCS) or 250 kg N ha ⁻¹ (250DCS). Image size was 42.0 mm long and 31.5 mm width.....	99

Abreviaturas

AB: método de aplicación con abanico
AD: apparent diameter
AENOR: Asociación Española de Normalización y Certificación
AL: ammonia losses
AL_NH₄⁺-N: ammonia losses related to the ammonium N applied
AL_Nt: ammonia losses related to the total N applied
ANOVA: analysis of variance
APHA: American Public Health Association
C/N: relación carbono/nitrógeno
CEE: Comunidad Económica Europea
CM: cuadrado medio
CO: control
DF: degrees of freedom
DCS: dairy cattle slurry
DM: dry matter
EC: electrical conductivity
EDAR: lodos de estaciones de depuración de aguas residuales
ETo: evapotranspiración potencial
EU-28: European Union, 28 countries member
FAO: Food and Agriculture Organization
gl: grados de libertad
LSD: Least Significant Difference test
MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MF: mineral fertilizer
MO: materia orgánica
MS: mean square
NE: Noreste
NRC: National Research Council
NS: Not statistically significant
OM: organic matter
PE: purín de cerdo en engorde
PM: purín de madres reproductoras
PM10: material particulado de 10 micras
PM2,5: material particulado de 2,5 micras
PS: pig slurry

PWP: permanent wilting point
S-: sowing
SC: sewage compost
SD: standard deviation
SE: standard error of mean
SED: standard error of a difference
SP: splash-plate
SWC: soil water content
T-: tillering
TANL: total accumulated NH₃-N losses
TC: método de aplicación con tubos colgantes
TH: trail hose
UE: Unión Europea
USDA: United States Department of Agriculture
WFC: water filling capacity
WFPS: water-filled pore space.

Resumen

Los residuos orgánicos procedentes de la actividad ganadera y urbana, están en constante incremento, debido al crecimiento poblacional (v. g. compost de lodos urbanos) e intensificación de la producción ganadera (v. g. porcina y bovina). Su utilización como fertilizante en las tierras de cultivo permite el reciclado de nutrientes y fomenta la economía circular en el sistema agrícola. No obstante, su uso requiere un enfoque holístico que incluya estrategias sostenibles en relación a la mitigación de posibles impactos ambientales y en relación la calidad del suelo derivados de su uso continuo a largo plazo.

Los objetivos de la tesis fueron: i) evaluar técnicas de mitigación en la emisión de amoníaco tras la aplicación de purín porcino y, ii) evaluar el efecto en la calidad del suelo tras aplicaciones a medio-largo plazo de fertilizantes orgánicos. Se implementaron cuatro experimentos ubicados en diferentes sistemas agrarios representativos del noreste español. En uno de ellos se evaluó las pérdidas de N por emisiones de amoníaco tras la aplicación de purín de cerdo en bandas localizadas (tubos colgantes) respecto al método tradicional de abanico en aportes en presiembra y cobertera del cereal de invierno, mediante trampas semi-estáticas. En los otros tres experimentos, se evaluó la calidad biológica y/o física del suelo, en parcelas con un historial de fertilización orgánica con purín de cerdo (engorde y madres reproductoras), purín de vacas lecheras y compost de lodos, respecto a la fertilización mineral tras aplicaciones reiteradas a medio-largo plazo (9–19 años) mediante métodos cuantitativos (bioturbación de lombrices de tierra y otros bioindicadores asociados y porosidad del suelo) y métodos cualitativos (descripción de microestructura, tipos de poros y forma de los poros). Para ello, se utilizaron técnicas analíticas, visuales y micromorfométricas.

La aplicación de purín porcino mediante el método de tubos colgantes supone una reducción de las emisiones de amoníaco respecto al método de abanico, las bajas pérdidas de amoníaco detectadas (2–3% del N total aplicado), fueron favorecidas por factores que producen una la rápida infiltración del purín al suelo.

Se registraron dos especies de lombrices de tierra: *Koinodrilus roseus*, endógea y dominante en la comunidad (>80%) y *Nicodrilus trapezoides*, anécica. Esta última resulta ser indicadora de aportes al suelo de compost de lodos y condiciones de sobrefertilización con purín porcino de engorde. En sistemas intensivos (con doble cultivo anual) aplicando una dosis equivalente a 250 kg N ha⁻¹ año⁻¹ en forma de purín de vacas lecheras se incrementa significativamente la porosidad total respecto a una dosis de 170 kg N ha⁻¹ año⁻¹. Además, el aporte de purín de vacas lecheras, favorece la presencia de poros, más alargados y rugosos, lo que favorecería una mayor retención de agua en el suelo.

Los resultados muestran que la aplicación de purines, en dosis adecuada y acorde al sistema agrario, mejora la calidad del suelo en relación a las propiedades físicas y biológicas del mismo, garantizando su sostenibilidad en los planes de fertilización a largo plazo.

Abstract

Organic waste from livestock and urban activities are constantly increasing, due to population growth (e.g. sewage sludge compost) and intensification of livestock production (e.g. swine and cattle). Its use as fertilizer in agricultural land allows a recycling of nutrients and promotes the circular economy in the agricultural system. However, its use requires a holistic approach that includes sustainable strategies in relation to the mitigation of possible environmental impacts and in relation to the soil quality derived from its continuous long-term use.

The objectives of the thesis were: i) to evaluate mitigation techniques in the emission of ammonia after the application of pig slurry and, ii) to evaluate the effect on soil quality after medium-long term application of organic fertilizers. Four experiments located in different representative agricultural systems of Spain northeast were implemented. In one of them, the N losses were evaluated by ammonia emissions after the application of pig slurry in localized bands strips (trail hoses) with respect to the traditional splash-plate method (by splashing it over a plate) pre-sowing and top-dressing in winter cereal, through traps in semi-static chambers. In the other three experiments, the biological and/or physical soil quality was evaluated, in plots with a historical of organic fertilization with pig slurry (fattening pigs and sows-maternity), dairy cattle slurry and sludge compost regarding mineral fertilization after repeated applications in the medium-long term (9–19 years) using quantitative methods (earthworms bioturbation and other associated bioindicators and soil porosity) and qualitative methods (description of microstructure, types of pores and shape pores). For this, analytical, visual and micromorphometric techniques were used.

The application of pig slurry by trail hoses method supposes a reduction of the ammonia emissions with respect to the splash-plate method, the low ammonia losses are detected (2–3% of the total N applied), there were favored by factors that produce a rapid infiltration of slurry into the soil.

Two earthworm species were found: *Koinodrilus roseus*, endogeic and dominant species in the earthworm community (> 80%) and *Nicodrilus trapezoides*, anecic. The last turns out to be indicative of soils that have received sludge compost and over-fertilization with slurry pig fattening. For intensive production systems (with double annual cropping) applying a dose equivalent to 250 kg N ha⁻¹ year⁻¹ in the form of dairy cattle slurry increased significantly the total porosity with respect to a dose of 170 kg N ha⁻¹ year⁻¹. Further, the contribution of dairy cattle slurry, enhance the presence of elongated and rough pores, which would favour a greater water retention in the soil.

The results show that slurry application, in adequate doses and according to the agrarian system, improves the soil quality in relation to its physical and biological properties, guaranteeing its sustainability in the long-term fertilization plans.

Resum

Els residus orgànics procedents de l'activitat ramadera i urbana, estan en constant increment, a causa del creixement poblacional (v. g. compost de fangs urbans) i intensificació de la producció ramadera (v. g. porcina i bovina). La seva utilització com a fertilitzant a les terres de cultiu permet un reciclatge de nutrients i fomenta l'economia circular en el sistema agrari. No obstant això, el seu ús requereix un enfocament holístic que inclogui estratègies sostenibles en relació a la mitigació de possibles impactes ambientals i en relació la qualitat del sòl derivats del seu ús continu a llarg termini.

Els objectius de la tesi van ser: i) avaluar tècniques de mitigació en l'emissió d'amoníac després de l'aplicació de purí porcí i, ii) avaluar efecte en la qualitat del sòl després de l'aplicació a mig-llarg termini de fertilitzants orgànics. Es van implementar 4 experiments ubicats en diferents sistemes agraris representatius del nord-est espanyol. En un d'ells es va avaluar les pèrdues de N per emissions d'amoníac després de l'aplicació de purins de porc en bandes localitzades (tubs penjants) respecte al mètode tradicional de ventall en aportacions en pre-sembra i cobertura del cereal d'hivern, mitjançant trampes semi-estàtiques. En els altres tres experiments, es va avaluar la qualitat biològica i/o física del sòl, en parcel·les amb un historial de fertilització orgànica amb purí de porc (porcs en engreix i mares reproductores), purins de boví de llet i compost de fangs, respecte a la fertilització mineral després aplicacions reiterades a mig-llarg termini (9–19 anys) mitjançant mètodes quantitius (bioturbació de cucs de terra i altres bioindicadors associats i porositat del sòl) i mètodes qualitius (descripció de microestructura, tipus de porus i forma dels porus). Per a això, es van utilitzar tècniques analítiques, visuals i micromorfomètrics.

L'aplicació de purins de porcí mitjançant el mètode de tubs penjats suposa una reducció de les emissions d'amoníac respecte al mètode de ventall, les baixes pèrdues d'amoníac detectades (2–3% del N total aplicat), estan afavorides per factors que produeixen una ràpida infiltració del purí al sòl.

Es van registrar dues espècies de cucs de terra: *Koinodrillus roseus*, endògea i dominant en la comunitat (> 80%) i *Nicodrillus trapezoides*, anécica. Aquesta última resulta ser indicadora de sòls que han rebut compost de fangs i condicions de sobrefertilització amb purí porcí d'engreix. En sistemes intensius (amb doble cultiu anual) aplicant una dosi equivalent a 250 kg N ha⁻¹ any⁻¹ en forma de purí boví de llet s'incrementa significativament la porositat total respecte a una dosi de 170 kg N ha⁻¹ any⁻¹. A més, l'aportació de purins boví, afavoreix la presència de porus, més allargats i rugosos, que afavoriria una major retenció d'aigua en el sòl.

Els resultats mostren que l'aplicació de purins, a dosi adequada i d'acord al sistema agrari, millora la qualitat del sòl en relació a les seves propietats físiques i biològiques, garantint la seva sostenibilitat en els plans de fertilització a llarg termini.

Capítulo 1

Introducción, objetivos generales y estructura de la tesis

1.1 Introducción

Los fertilizantes orgánicos y minerales han contribuido en el incremento de los rendimientos de los productos vegetales necesarios para satisfacer las necesidades de una población creciente y cada vez más urbana. Paralelamente, también se incrementa el consumo de proteína animal, lo que conlleva el desarrollo de una ganadería intensiva y concentrada territorialmente. Lo anterior ocasiona un incremento de residuos orgánicos provenientes tanto del sector primario (agrícola y ganadero) como de origen urbano (entre ellos los lodos de estaciones de depuración de aguas residuales; EDAR).

Las políticas Europeas, en el marco de la economía circular, fomentan la reutilización como fertilizantes de las deyecciones ganaderas y los residuos orgánicos generados en las actividades urbanas, puesto que su aplicación al suelo, como vía de aporte de nutrientes, ha demostrado ser la opción más sostenible y económica frente al vertido o incineración. La fertilización con orgánicos puede sustituir parcial o totalmente la utilización de los fertilizantes minerales, sin comprometer el rendimiento de los cultivos. No obstante, los fertilizantes orgánicos presentan limitaciones al ser generalmente voluminosos, lo que comportan un incremento del coste de transporte, además de presentar variabilidad en su composición: formas de N presentes, concentración de nutrientes, relación C/N, materia seca, pH, conductividad eléctrica entre otros (Pomares y Canet, 2001; Yagüe et al., 2012a). En el caso particular de la eficiencia de uso del N aportado con fertilizantes orgánicos, ésta depende de las formas de N presentes en el fertilizante y del método y el momento de aplicación, por lo que se precisa evaluar tanto la pérdida de valor fertilizante como sus implicaciones ambientales inmediatas (v.g. emisiones de amoníaco). Por otra parte, es necesario considerar los efectos de la fertilización orgánica en la calidad del suelo, principalmente, derivados de su uso a largo plazo (v. g. cambios en las propiedades físicas y biológicas), para implementar técnicas o estrategias de mitigación de los potenciales impactos negativos. Por ello, para Boixadera y Teira (2001), el uso de fertilizantes orgánicos debe tener un enfoque holístico que considere las particularidades de los fertilizantes y de los sistemas agrarios a fin de contribuir con una agricultura sostenible a largo plazo.

España es el primer productor de porcino en la Unión Europea (30 millones de cabezas que suponen el 19% de la producción en la UE; Unión Europea, 2018a). Ello conlleva que estén disponibles elevados volúmenes de residuos ganaderos en forma de purín, que es el estiércol fluido mayoritario, aunque en algunas provincias predomina la presencia de

purín bovino de leche (6,5 millones de cabezas de bovinos que representan el 7,4 % de esta cabaña en la UE; Unión Europea, 2018a).

El purín es utilizado mayoritariamente como fertilizante orgánico, y mejorar su eficiencia de aplicación pasa por reducir las pérdidas de N a la atmósfera, principalmente pérdidas por volatilización de amoníaco. Las pérdidas de N en forma de amoníaco tienen además un efecto nocivo sobre el medio ambiente por deposición ácida en suelos y plantas (lluvia ácida). El gas amoníaco se puede transportar con el viento y depositarse a kilómetros de la fuente original. Además tiene un efecto nocivo directo sobre la salud humana por su inhalación (NRC, 2003; Fertilizer Institute, 2010) y uno indirecto debido a que el amoníaco reacciona con otras sustancias químicas, creando una bruma atmosférica con materia particulada extremadamente pequeña (De Meij et al., 2009; Werner et al., 2014), entre 10 y 2,5 micras (PM10; PM2,5). El amoníaco puede representar hasta el 50% de la masa total de PM2,5 (Anderson et al., 2003) y tras exposiciones agudas o crónicas puede desencadenar enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y respiratorias. En el Noroeste de Europa gracias a las estrategias de mitigación de emisiones de amoníaco en el sector agrario (Backes et al., 2016), las reducciones de un 50% en las emisiones de amoníaco implican una reducción del 24% en las concentraciones totales de PM2,5.

En el sector agrario ocurren las mayores pérdidas de N en forma de amoníaco. Estas representaron el 94% del total en el año 2015 y equivalieron a 3760 kt de amoníaco, de los cuales el 54% están asociadas al manejo de estiércoles (Unión Europea, 2018b). Particularmente, el caso del purín porcino, ocurren en el periodo de post-aplicación sobre las tierras de cultivo (Häni et al., 2017). Una reciente revisión de estudios realizados con purines en Europa muestra que los rangos de pérdidas de N varían de 0–100% del N amoniacal aplicado (Hafner et al., 2018). Estos mismos autores remarcan lo observado por Bosch-Serra et al. (2014), es decir, que las emisiones están ligadas a las condiciones ambientales en el momento de aplicación, características y condiciones del suelo y del fertilizante orgánico (v.g. materia seca, concentración amonio) e incluyen la variabilidad en la cuantificación asociadas al empleo de diferentes técnicas de medida.

En la Directiva Europea 2016/2284 (Unión Europea, 2016), relativa a la reducción de las emisiones nacionales de determinados contaminantes atmosféricos, cada país miembro tiene compromisos de reducción de emisiones de amoníaco. El compromiso español es el de reducir anualmente el 3% en el periodo 2020-2029 y un 16% a partir de 2030 (con referencia a las del año 2005; de 500 kt). Las técnicas de mitigación incluidas en esta Directiva consisten, entre otras, en el enterrado del purín en las primeras 4h tras la

aplicación, y el uso de métodos de aplicación que reduzcan las emisiones, por ejemplo aplicaciones más localizadas.

En España el método habitual para la aplicación de purín ha sido el abanico (placa de salpicadura), por ser la aplicación más rápida y económica, pero comporta una aplicación en toda la superficie del suelo y por tanto de emisión de amoníaco. A finales del 2017 se aprobó el Real Decreto 980/2017 (Gobierno de España, 2017), en el que se prohibía a principios de 2018 el esparcimiento de purines con abanico, si bien las comunidades autónomas han establecido moratorias de hasta de 2–5 años para su implementación. No obstante, existe una falta de información cuantitativa sobre la efectividad de las técnicas de mitigación en condiciones Mediterráneas caracterizadas por altas temperaturas, baja humedad relativa del aire y suelos con presencia de carbonatos e incluso pedregosos. En estas condiciones mencionadas, la opción de aplicación con tubos colgantes podría ser más factible que la inyección que, por otra parte, es el método popular de mitigación en países del Norte de Europa.

Los efectos beneficiosos del uso de fertilizantes orgánicos dependen de si la valoración se realiza tras aplicaciones a corto o a largo plazo. A corto plazo, dependen más del equilibrio y la forma en que se presentan los nutrientes que contengan, variables que están directamente relacionados con el rendimiento del cultivo (Gómez-Muñoz et al., 2017). A largo plazo, se introducen los efectos residuales en la disponibilidad de nutrientes y también aspectos positivos ligados a la mejora de otras propiedades del suelo por el aporte de materia orgánica (Diacono y Montemurro, 2010; Yagüe et al., 2012b) o impactos negativos como la acumulación de metales pesados (Sharma et al., 2017; Berenguer et al., 2008).

Otro fertilizante orgánico, importante en la comunidad europea, es el aprovechamiento de los lodos de depuradora (Sharma et al., 2017). Para su uso, se parte del principio de prevención ante la contaminación de suelos por metales pesados regulado por la Directiva 86/278/CEE (Unión Europea, 1986) e incorporada en España mediante el Real Decreto 1310/1990 (Gobierno de España, 1990). Un punto importante relacionado con el uso agrícola de los lodos de depuradora es que estos deben ser tratados (estabilizados) por vías biológicas, químicas o físicas (térmica), es decir, reducir su poder de fermentación e inconvenientes sanitarios (Gobierno de España, 1990). Una de esas alternativas biológicas es el compostaje, que tiene además la ventaja de reciclar conjuntamente otros residuos orgánicos provenientes de agroindustrias así como de restos de podas utilizados como agentes voluminosos. Este co-compostaje reduce la

biodisponibilidad de los metales pesados y la cantidad de microorganismos patogénicos, lo que disminuye el riesgo de transferencia a la cadena alimentaria y a las aguas (Paré et al., 1999; Onwosi et al., 2017).

Los fertilizantes orgánicos cuando son aplicados a largo plazo, incrementan la materia orgánica (MO) del suelo y con ello mejoran las propiedades físicas, principalmente al mejorar la estabilidad estructural (Domingo-Olivé et al., 2016) y la porosidad del suelo (Pagliai et al., 2004). Además, la MO exógena beneficia a los organismos del suelo ya que es una fuente de energía directa para la biota del suelo. Los suelos de áreas del Mediterráneo están caracterizados por el bajo contenido de MO, alrededor del 74% tienen <2% de carbono en la capa superficial de suelo (Zdruli et al., 2004), por lo que su aporte es especialmente beneficioso. No obstante, la acumulación de MO y su influencia en el comportamiento del suelo depende del tipo fertilizante orgánico ya que por ejemplo los purines presentan un bajo contenido de MO (C/N bajo) frente a los estiércoles y lodos (C/N alto).

La calidad se evalúa mediante el análisis de los indicadores vinculados a la fertilidad física, química y biológica (propiedades del suelo y sus interacciones), como la porosidad y la fauna del suelo. Actualmente, en esta valoración se incluyen herramientas de diagnóstico visual, digital y analítica. El mantenimiento de la calidad del suelo para un uso agronómico e integrando los servicios ecosistémicos del suelo, constituye el principal desafío en la gestión sostenible del suelo (Kibblewhite et al., 2008).

La porosidad del suelo es un buen indicador de la calidad del suelo y su caracterización en términos de forma, tamaño y orientación de los poros permite comprender las modificaciones inducidas por las actividades/perturbaciones antropogénicas, como el uso de fertilizantes orgánicos (Pagliai y Vignozzi, 2006) o la compactación (Pagliai, 2003). Para la cuantificación de la porosidad se recurren a técnicas micromorfométricas que incluyen la preparación de láminas delgadas del suelo (Loaiza et al., 2014). Las láminas, además de ser útiles para el estudio de la porosidad y microestructura del suelo, también se utilizan para describir y cuantificar la bioturbación (Kooistra, 1991, Davidson et al., 2004; Sauzet et al., 2017; Dominguez-Haydar et al., 2018).

La bioturbación se define como la reelaboración biológica de suelos o sedimentos por organismos, incluidos microbios, plantas con raíces y la fauna del suelo (Meysman et al., 2006). En este proceso adquieren gran relevancia las lombrices del suelo, también llamadas “ingenieros del ecosistema del suelo”, por su rol fundamental a través de la

formación de estructuras biogénicas como los excrementos y túneles/orificios (Bhadauria y Saxena, 2010) que, a su vez, modifican la disponibilidad de recursos y crean hábitats para otros organismos del suelo (Blouin et al., 2013; Pulleman et al., 2012).

VandenBygaart et al. (2000) estimaron la influencia de las lombrices de tierra en la estructura del suelo (porosidad y formas de poros) mediante el estudio de láminas delgadas de suelo, mientras que estudios realizados por Pirón et al. (2012, 2017) desarrollaron el concepto de bioturbación de las lombrices para estudiar las estructuras biogénicas a escala de perfil del suelo. Los estudios morfomicrométricos y visuales, anteriormente citados, no incluyen la evaluación de bioindicadores relacionados a la comunidad de lombrices que es necesaria para entender las interacciones de las lombrices con las funciones del suelo (incluyendo las propiedades del suelo). Precisamente, las lombrices del suelo por su influencia en los procesos físicos, químicos y biológicos y viceversa (Pulleman et al., 2012; Römbke et al., 2016) son bien conocidas como bioindicadoras de un manejo sostenible (Paoletti et al., 1999).

La bioturbación del suelo por las lombrices influye en el mantenimiento o regeneración de una estructura edáfica favorable, puesto que desarrollan tanto bioporos pequeños (poros de empaquetamiento compuesto y cavidades en forma de estrella) como de gran tamaño (canales, cámaras y cavidades) (Oades, 1993; Pirón et al., 2012; Morrás, 2015). Como consecuencia, se favorecen los servicios ecosistémicos del suelo como son: la regulación de agua y gases, la retención de humedad y la protección contra procesos de degradación como la compactación y la erosión (Adhikari y Hartemink, 2016). El impacto funcional sobre la estructura varía según los grupos ecológicos de lombrices de tierra (epigeicas, endogeicas y anécicas, Bouché, 1972) y puede verse afectado por prácticas agrícolas (Piron et al., 2017), por lo que la inclusión del estudio a nivel de grupos ecológicos es clave para la interpretación de los cambios a nivel estructural. Esto es muy relevante cuando se evalúan residuos orgánicos, ya que los impactos sobre la calidad del suelo podrían estar condicionados por la calidad de los residuos aplicados (v.g. contenido de materiales fácilmente digeribles) (Leroy et al., 2008).

La utilización de orgánicos como fertilizantes en el NE español forma parte de la gestión mayoritaria en diferentes sistemas agrícolas que difieren en intensificación y diversificación de cultivos. Estos sistemas de cultivos dependen de la cantidad de agua disponible (secano, regadío). En las zonas semiáridas el sistema de cultivo en secano se basa principalmente, en cereales de invierno, trigo o cebada, en monocultivo anual o rotaciones con barbecho, y en condiciones de mayor precipitación (zonas subhúmedas) o

con disponibilidad de riego se incluyen rotaciones con leguminosas, maíz u otras especies forrajeras. Particularmente, en las zonas subhúmedas y con disponibilidad de riego para los cultivos de verano, además de otras condiciones climáticas adecuadas (v. g. temperatura) se intensifica la producción de forrajes (raigrás, maíz, avena o sorgo) con dos cultivos anuales. En cualquiera de los sistemas agrarios citados y en zonas consideradas vulnerables a la contaminación de aguas subsuperficiales por nitratos, la dosis de fertilización orgánica está limitada a la aplicación de $170 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, según la directiva 91/676/CEE (Unión Europea, 1991) traspuesta a la legislación de España por el Real Decreto 261/1996 (Gobierno de España, 1996).

Los ensayos a largo plazo brindan la mejor opción para evaluar variables de calidad del suelo, relacionadas a las propiedades del suelo, que garanticen la sostenibilidad del uso reiterado de fertilizantes (orgánicos y minerales) en los planes de fertilización, mientras que los estudios a corto plazo son más apropiados para evaluar efectos que ocurren inmediatamente tras la aplicación del fertilizante orgánico, como es la comparación entre técnicas o nuevas tecnologías de aplicación en relación a la emisión de amoníaco. Ambos son importantes para generar información y poder establecer recomendaciones en el uso de estos fertilizantes.

En el marco de esta tesis se plantearon las siguientes hipótesis, i) la aplicación superficial de purines con técnicas innovadoras pero sin llegar a enterrarlos, puede reducir las pérdidas de N por volatilización de amoníaco, aunque su efectividad dependerá del momento de aplicación, ii) la fertilización a largo plazo con purines y/o compost de lodos a dosis agronómicas (base N) puede tener un efecto positivo sobre la calidad del suelo, particularmente en variables relacionadas a las propiedades físicas y biológicas respecto la fertilización mineral, aunque puede depender de las condiciones edafoclimáticas y del manejo y iii) estos efectos sobre la calidad del suelo pueden ser detectados, antes que incluso repercutan en las producciones, mediante bioindicadores.

1.2 Objetivos de la tesis

El objetivo general de la tesis doctoral es evaluar las implicaciones del uso de residuos orgánicos de distintos orígenes (ganaderos y urbanos) como fertilizantes sobre la calidad del aire (asociados a las pérdidas de N por volatilización de amoníaco) y sobre la calidad del suelo (fertilidad biológica y física), en el marco de tres sistemas agrarios mediterráneos presentes en Cataluña (NE de España) en donde se ubicaban experimentos a largo plazo o bien que podían adaptarse para un estudio a corto plazo.

El objetivo general se subdivide en dos objetivos específicos:

1) Evaluar las pérdidas de N por emisiones de amoníaco cuando se fertiliza con purín porcino en cereal de invierno, utilizando dos métodos de aplicación: abanico o tubos colgantes, y en dos momentos del ciclo de cultivo del cereal de invierno: en pre-siembra (o abonado de fondo, suelo desnudo) y antes del encañado (o abonado de cobertera, presencia de cultivo). Se implementa en un sistema agrario de regadío.

2) Evaluar la influencia del uso a largo plazo de distintos fertilizantes de origen ganadero (purín vacuno y purín porcino de distintas características) y/o compost de lodos respecto la fertilización mineral en variables de calidad del suelo, que a su vez, en este trabajo, se subdividen en dos: variables relacionadas con la fertilidad biológica y variables relacionadas con la fertilidad física; todo ello en el marco de sistemas agrarios de secano bajo clima Mediterráneo semiárido y subhúmedo.

1.3 Estructura de la tesis

Los objetivos planteados se desarrollaron en un experimento a corto plazo (objetivo específico1) en un sistema agrícola de regadío y en tres experimentos (objetivo específico 2) ubicadas en dos sistemas agrarios de secano en zona semiárida y en un sistema agrario intensivo en zona Mediterránea subhúmeda. Estos tres últimos son representativos de distintas condiciones edafo-climáticas y de tecnologías de manejo principales en zonas con disponibilidad de deyecciones ganaderas y/o compost de lodos, y con historial de fertilización a medio y largo plazo monitorizada.

Los trabajos realizados se presentan en los distintos capítulos (capítulos 2 al 7) que conforman la tesis, además de la presente introducción general.

En el capítulo 2, con el título "*Mitigation of ammonia emissions: field strategies in semi-arid Mediterranean irrigated systems*" se presentan los resultados del experimento para implementar técnicas que reduzcan las emisiones de amoníaco y que se desarrolló durante la campaña agrícola 2015/16 en Castelló de Farfanya (Lleida, Cataluña, NE España). El sistema agrario fue representativo de las zonas de secano, transformadas a regadío, y que están expandiéndose en el NE español.

En los capítulos 3 y 4 se presentan las investigaciones desarrolladas en dos sistemas agrarios de secano, con monocultivo de cereal de invierno (trigo y cebada). Se ubicaron en las localidades de Oliola y Agramunt (Lleida, Cataluña, NE España), donde existían líneas de investigación a largo plazo para evaluar la sostenibilidad de la aplicación de diferentes tipos de fertilizantes orgánicos y minerales.

En el capítulo 3 “*Fertilización con purín porcino: impacto sobre las lombrices de tierra en agricultura de secano*” se presenta la investigación desarrollada en Oliola en donde el estudio de la comunidad de lombrices de tierra a nivel global (abundancia de adultos y formas juveniles y biomasa) y a nivel taxonómico (número de especies) se usa como bioindicador de potenciales impactos de la aplicación de purines durante los 12 años previos al estudio.

En el capítulo 4 con el título “*Earthworm community and soil microstructure changes with long-term organic fertilization*” se presenta la investigación desarrollada en Agramunt. Este ensayo se estableció en 1997/98 y tras 19 años de uso de fertilizantes orgánicos (purín de cerdo y compost de lodos) y minerales, en la campaña 2015/16 se cuantificaron distintas variables para evaluar potenciales impactos de la fertilización. Para ello, se combinaron métodos cuantitativos (bioturbación de lombrices de tierra y otros bioindicadores asociados), y métodos cualitativos (descripción de microestructura y tipos de bioporos).

El capítulo 5 se enmarca en una zona subhúmeda con disponibilidad de riego, concretamente en La Tallada d'Empordá (Girona, Cataluña, NE España), donde se intensifica el sistema productivo, introduciendo más de un cultivo anual. Una gran parte de este sistema agrario se encuentra declarado como zona vulnerable a la contaminación de las aguas subsuperficiales por nitratos. Considerando estas condiciones, se desarrolló un estudio sobre porosidad edáfica y morfología de poros dentro de un ensayo establecido hace 9 años con distintas estrategias de fertilización mineral y orgánica y que se presenta con el título “*Long-term fertilization with dairy cattle slurry in intensive production systems: effects on soil porosity and pore morphology*”

El capítulo 6 corresponde a la “*Discusión general*”, donde se discuten los principales resultados obtenidos en esta tesis.

En el capítulo 7 se presentan las conclusiones de la investigación realizada y las recomendaciones.

Referencias

- Adhikari, K., Hartemink, A.E., 2016. Linking soils to ecosystem services - A global review. *Geoderma* 262, 101–111.
- Anderson, N., Strader, R., Davidson, C., 2003. Airborne reduced nitrogen: ammonia emissions from agriculture and other sources. *Environ. Int.* 29, 277–286.
- Backes, A.M., Aulinger, A., Bieser, J., Matthias, V., Quante, M., 2016. Ammonia emissions in Europe, part II: How ammonia emission abatement strategies affect secondary aerosols. *Atmos. Environ.* 126, 153–161.
- Berenguer, P., Cela, S., Santiveri, F., Boixadera, J., Lloveras, J., 2008. Copper and zinc soil accumulation and plant concentration in irrigated maize fertilized with liquid swine manure. *Agron. J.* 100, 1056–1061.
- Bhadoria, T., Saxena, K.G., 2010. Role of earthworms in soil fertility maintenance through the production of biogenic structures. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2010, 1–7.
- Blouin, M., Hodson, M.E., Delgado, E.A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K.R., Dai, J., Dendooven, L., Peres, G., Tondoh, J.E., Cluzeau, D., Brun, J.J., 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Eur. J. Soil Sci.* 64, 161–182.
- Boixadeira, J., Teira, M.R., 2001. Aplicación agrícola de residuos orgánicos. España (ES): Edicions de la Universitat de Lleida.
- Bosch-Serra, À.D., Yagüe, M.R., Teira-Esmatges, M.R., 2014. Ammonia emissions from different fertilizing strategies in Mediterranean rainfed winter cereals. *Atmos. Environ.* 84, 204–212.
- Bouché, M.B., 1972. *Lombriciens de France. Ecologie et systématique.* Paris (FR): INRA
- Davidson, D.A., Bruneau, P.M.C., Grieve, I.C., Wilson, C.A., 2004. Micromorphological assessment of the effect of liming on faunal excrement in an upland grassland soil. *Appl. Soil Ecol.* 26, 169–177.
- De Meij, A., Thunis, P., Bessagnet, B., Cuvelier, C., 2009. The sensitivity of the CHIMERE model to emissions reduction scenarios on air quality in Northern Italy. *Atmos. Environ.* 43, 1897–1907.
- Diacono, M., Montemurro, F., 2010. Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 401–422.
- Domingo-Olivé, F., Bosch-Serra, A.D., Yagüe, M.R., Poch, R.M., Boixadera, J., 2016. Long term dairy cattle manure and pig slurry fertilization of winter cereal affects the improve soil quality. *Nutr Cycl Agroecosys.* 104, 39-51.
- Domínguez-Haydar, Y., Castañeda, C., Rodríguez-Ochoa, R., Jiménez, J.J., 2018. Assessment of soil fauna footprints at a rehabilitated coal mine using micromorphology and near infrared spectroscopy (NIRS). *Geoderma* 313, 135–145.
- Fertilizers Institute, 2010. Health effects of ammonia. Whashington, D.C. (US). [accessed 2018 Dec 20] https://www.tfi.org/sites/default/files/documents/HealthAmmonia_FINAL.pdf .

- Gobierno de España, 1990. Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. BOE. 262, 32339–32340.
- Gobierno de España, 1996. Real Decreto 261/1996, de 16 de febrero, sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias. BOE. 61, 9734–9737.
- Gobierno de España, 2017. Real Decreto 980/2017, de 10 de noviembre, por el que se modifican los Reales Decretos 1075/2014, 1076/2014, 1077/2014 y 1078/2014, todos ellos de 19 de diciembre, dictados para la aplicación en España de la Política Agrícola Común. BOE. 274, 108523–108542.
- Gómez-Muñoz, B., Magid, J., Jensen, L.S., 2017. Nitrogen turnover, crop use efficiency and soil fertility in a long-term field experiment amended with different qualities of urban and agricultural waste. *Agric. Ecosyst. Environ.* 240, 300–313.
- Hafner, S.D., Pacholski, A., Bittman, S., Burchill, W., Bussink, W., Chantigny, M., Carozzi, M., Géniermont, S., Häni, C., Hansen, M.N., Huijsmans, J., Hunt, D., Kupper, T., Lanigan, G., Loubet, B., Misselbrook, T., Meisinger, J.J., Neftel, A., Nyord, T., Pedersen, S. V., Sintermann, J., Thompson, R.B., Vermeulen, B., Vestergaard, A. V., Voylokov, P., Williams, J.R., Sommer, S.G., 2018. The ALFAM2 database on ammonia emission from field-applied manure: Description and illustrative analysis. *Agric. For. Meteorol.* 258, 66–79.
- Häni, C., Sintermann, J., Kupper, T., Jocher, M., Neftel, A., 2016. Ammonia emission after slurry application to grassland in Switzerland. *Atmos. Environ.* 125, 92–99.
- Johnston, A.E., 1999. Organic manures and mineral fertilizers. In: Anac, D., Martín-Prével, P., editors. *Improved Crop Quality by Nutrient Management*. Dordrecht (NL): Kluwer Academic Publishers; p. 7–10.
- Kibblewhite, M., Ritz, K., Swift, M., 2008. Soil health in agricultural systems. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 685–701.
- Kooistra, M.J., 1991. A micromorphological approach to the interactions between soil structure and soil biota. *Agric. Ecosyst. Environ.* 34, 315–328.
- Leroy, B.L.M., De Sutter, N., Ferris, H., Moens, M., Reheul, D., 2009. Short-term nematode population dynamics as influenced by the quality of exogenous organic matter. *Nematology* 11, 23–38.
- Loaiza, J. C., Stoops, G., Poch, R. M., Casamitjana, M., 2015. *Manual de Micromorfología de Suelos y Técnicas Complementarias*. Medellín (CO): Ed. Pascual Bravo Fondo Editorial.
- Meysman, F.J.R., Middelburg, J.J., Heip, C.H.R., 2006. Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. *Trends Ecol. Evol.* 21, 688–695.
- Morrás, H. J. M., 2015. Porosidad y microestructura de suelos. In: Loaiza, J. C., Stoops, G., Poch, R. M., Casamitjana, M. editores. *Manual de Micromorfología de Suelos y Técnicas Complementarias*. Medellín (CO): Ed. Pascual Bravo Fondo Editorial; p. 205–260.
- NRC, 2003. *Air Emissions from Animal Feeding Operations: Current Knowledge, Future Needs*. Washington, D.C. (US): National Research Council.

- Oades, J.M., 1993. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma* 56, 377-400.
- Onwosi, C.O., Igbokwe, V.C., Odimba, J.N., Eke, I.E., Nwankwoala, M.O., Iroh, I.N., Ezeogu, L.I., 2017. Composting technology in waste stabilization: On the methods, challenges and future prospects. *J. Environ. Manage.* 190, 140–157.
- Pagliai, M., Vignozzi, N., 2006. Soil porosity as an indicator of soil health. *Annals of Arid Zone* 45, 259–286.
- Pagliai, M., Vignozzi, N., Pellegrini, S., 2004. Soil structure and the effect of management practices. *Soil Tillage Res.* 79, 131–143.
- Pagliai, M., 2003. Changes of pore system following soil compaction. Paper presented at: Collage on Soil physics; Mar. 3–21; Miramare, Trieste, (IT) [accessed 2018 Nov 20]. <http://indico.ictp.it/event/a0261/session/17/contribution/12/material/0/2.pdf>.
- Paoletti, M.G., 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agric. Ecosyst. Environ.* 74, 137–155.
- Paré, T., Diné, H., Schnitzer, M., 1999. Extractability of trace metals during co-composting of biosolids and municipal solid wastes. *Biol. Fertil. Soils* 29, 31–37.
- Piron, D., Boizard, H., Heddadj, D., Pérès, G., Hallaire, V., Cluzeau, D., 2017. Indicators of earthworm bioturbation to improve visual assessment of soil structure. *Soil Tillage Res.* 173, 53–63.
- Piron, D., Pérès, G., Hallaire, V., Cluzeau, D., 2012. Morphological description of soil structure patterns produced by earthworm bioturbation at the profile scale. *Eur. J. Soil Biol.* 50, 83–90.
- Pomares, F., Canet, R., 2001. Los residuos orgánicos utilizables en agricultura: origen, composición y características. In: Boixadera, J., Teira, M.R. editores. *Aplicación agrícola de residuos orgánicos*. España (ES): Edicions de la Universitat de Lleida; p. 1–15.
- Pulleman, M., Creamer, R., Hamer, U., Helder, J., Pelosi, C., Pérès, G., Rutgers, M., 2012. Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services-an overview of European approaches. *Environ. Sustain.* 4, 529–538.
- Römbke, J., Gardi, C., Creamer, R., Miko, L., 2016. Soil biodiversity data: Actual and potential use in European and national legislation. *Appl. Soil Ecol.* 97, 125–133.
- Sauzet, O., Cammas, C., Gilliot, J.M., Bajard, M., Montagne, D., 2017. Development of a novel image analysis procedure to quantify biological porosity and illuvial clay in large soil thin sections. *Geoderma* 292, 135–148.
- Sharma, B., Sarkar, A., Singh, P., Singh, R.P., 2017. Agricultural utilization of biosolids: A review on potential effects on soil and plant grown. *Waste Manag.* 64, 117–132.
- Unión Europea, 1986. Directiva del Consejo, de 12 de junio de 1986, relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura (86/278/CEE). DOCE. L181, 6–12.
- Unión Europea, 2016. Directiva 2016/2284 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 14 de diciembre de 2016, relativa a la reducción de las emisiones nacionales de determinados contaminantes atmosféricos, por la que se modifica la Directiva 2003/35/CE y se deroga la Directiva 2001/81/CE. DOCE. L344, 1–31.

- Unión Europea, 2018a. Eurostat. Base de datos. Agricultura. [accessed 2018 Nov 21]. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/data/database>
- Unión Europea, 2018b. Agri-environmental indicator - ammonia emissions. [accessed 2018 Nov 21] https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agri-environmental_indicator_-_ammonia_emissions.
- Unión Europea, 1991. Directiva del Consejo (91 / 676 / CEE), de 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura. DOCE. L375, 1–8.
- VandenBygaert, A.J., Fox, C.A., Fallow, D.J., Protz, R., 2000. Estimating Earthworm-Influenced soil structure by morphometric image analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 982–988.
- Werner, M, Kryza, M, Dore, A. J., 2014. Differences in the spatial distribution and chemical composition of PM10 between the UK and Poland. *Environ. Model. Assess.* 19, 179–192.
- Yagüe, M.R., Bosch-Serra, À.D., Boixadera, J., 2012a. Measurement and estimation of the fertiliser value of pig slurry by physicochemical models: Usefulness and constraints. *Biosyst. Eng.* 111, 206–216.
- Yagüe, M.R., Bosch-Serra, À.D., Antúnez, M., Boixadera, J., 2012b. Pig slurry and mineral fertilization strategies' effects on soil quality: Macroaggregate stability and organic matter fractions. *Sci. Total Environ.* 438, 218–224.
- Zdruli, P., Jones, R.J.A., Montanarella, L., 2004. Organic matter in the soils of Southern Europe. Luxembourg (LU): European Soil Bureau Technical Report EUR 21083. Office for Off. J. Eur. Communities [accessed 2018 Dec 16]. https://esdac.jrc.ec.europa.eu/ESDB_Archive/eusoils_docs/doc_ESBN.html.

Capítulo 2

Mitigation of ammonia emissions: field strategies in semi-arid Mediterranean irrigated systems

Parte de este capítulo está publicado como artículo en el Journal of Environmental Quality

Yagüe, M.R., Valdez, A.S., Bosch-Serra, À.D., Ortiz, C., Castellví, F., 2019. A short-term study to compare field strategies for ammonia emission mitigation. J. Environ. Qual. 48, 179–184. DOI: 10.2134/jeq2018.05.0218

Mitigation of ammonia emissions: field strategies in semi-arid Mediterranean irrigated systems

Abstract

Abatement of NH_3 emissions is crucial in calcareous soils under semiarid Mediterranean climate. The objective of the study was to compare NH_3 emission abatement using different methods of slurry application. An experiment was carried out to evaluate NH_3 emissions before sowing (S-) and at winter cereal tillering (T-) when pig slurry was applied using two methods. One method applied the slurry by splashing it over a plate (SP) and the other placed the slurry in strips using trail hoses (TH). The emissions were measured using semi-static chambers. Measurements were carried out at intervals for 315.5h (S-) and 287h (T-). Treatments were replicated in three randomized blocks. Maximum NH_3 flux emissions were always observed during the earliest period of measurements after slurry spreading (3.5–5h). Before sowing, regardless of the method, the accumulated NH_3 losses (during 315.5h) ranged between 2–3 $\text{kg NH}_3\text{-N ha}^{-1}$ because of the low dry matter (DM) of the slurry content (<2%) which enhanced its infiltration into the soil. Losses represent about 2–3% of the total N applied (82–87 kg N ha^{-1}). At cereal tillering, the maximum accumulated losses of NH_3 (during a 287h period of measurements) were 1.7 kg N ha^{-1} using TH (1.1% of total N applied), and were as high as 5.4 kg N ha^{-1} (3.2% of total N applied) using SP. Because N top-dressing is recommended as a measure to increase its efficiency, TH is recommended vs. SP. Thus, this study concludes that TH should be promoted in semi-arid environments to reduce NH_3 emissions.

Keywords: agricultural gas emissions, nitrogen, pig slurry, splash-plate, trail hose.

Abbreviations: AL, ammonia losses; DM, dry matter; PS, pig slurry; S-, sowing; SP, splash-plate; SWC: soil water content; PWP, permanent wilting point; T-, tillering; TH, trail hose; WFC, water filling capacity; WFPS: water-filled pore space.

2.1 Introduction

Agricultural activities in the EU-28 resulted in an emission of 3.6 million t of ammonia (NH_3) in 2013. They contributed 93.3% to the total ammonia emissions with manure management being the main source (European Commission, 2016).

Livestock slurry used as fertilizer is a source of ammonia emissions that contributes between 30% and 50% of total emissions in European countries for liquid manure systems (Reidy et al., 2008). These systems represent more than half of the manure production in most central European countries (Menzi, 2002). It is crucial to reduce these emissions because of their highly negative effects on the environment and health (Krupa, 2003) and because losses of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ via NH_3 reduce the value of animal slurries as fertilizer (Sørensen and Amato, 2002). Ammonia volatilization rates depend on the concentration of ammonium nitrogen in the soil solution and the resistance of NH_3 to movement from the soil matrix (Sommer et al., 2004). Pig (*Scrofa domestica*) slurry (PS) composition has its nitrogen mainly as ammonium, at around 70% of the total (Yagüe et al., 2012). Consequently, PS is susceptible to NH_3 losses to the atmosphere and nitrate leaching to underground water. In Spain, the splash-plate (SP) method is the most popular system of slurry application because it is affordable and requires low maintenance. Slurry applications using trailing hoses (TH) are presumed to reduce NH_3 emissions in comparison with SP (Hafner et al., 2018), but the cost of the machinery doubles and maintenance of grinders is costly. While TH applies the slurry in strips over the ground, the SP method forces the slurry to splash over an inclined plate to uniformly spread the slurry over the soil/crop surface. Thus, the TH method reduces the area of the NH_3 source at the soil surface. Slurry injection within the soil is rarely used in semiarid areas because it is very expensive, difficult to apply (i.e. because soils are dry) and the advantages in preventing N emissions are limited (Yagüe and Bosch-Serra, 2013).

Acquisition of materials, field management and post-field processing requirements to measure emissions of NH_3 make it costly (Harper and Sharpe, 1998; Smith et al., 2007; Sintermann et al., 2012). Accurate techniques are available, such as those based on micrometeorological methods (Denmead, 1983; Misselbrook et al., 2005) and the ^{15}N balance method (Lara-Cabezas et al., 1999), but they are complex and rarely affordable. However, semi-static chambers (Nõmmik, 1973) are affordable (Grant et al., 1996), allowing monitoring different treatments in the same crop season as they can be adapted to small flux-footprint areas. In general, the accuracy is suitable for operational field applications (Shigaki and Dell, 2015) and they are used to compare NH_3 losses from

different treatments, although it was found that they underestimate NH₃ emissions compared with the integrated horizontal flux method or with the inverse dispersion method (Yang et al., 2017).

A wide range of emissions, ranging from 0 to 100% of the ammonium N applied, has been reported (Hafner et al., 2018). Local weather and soil conditions partly explain these differences. Ammonia volatilization also depends on slurry composition (Bosch-Serra et al., 2014) and the distribution of its particle sizes (Misselbrook et al., 2000; Sommer et al., 2006). Field management practices play a role (Webb et al., 2010). In grasslands, flux rates of NH₃ significantly decrease (Mattila and Joki-Tokola, 2003) one day after slurry application. According to Huijsmans et al. (2001), they also tend to decrease as the canopy height increases.

In Mediterranean agricultural systems, integrated knowledge of field management practices linked to abatement of NH₃ emission is rather limited. Most research has focused on related issues such as animal diet (Beccaccia et al., 2015), meta-analysis of solid waste management (Pardo et al., 2015) and spatial modelling for allocating NH₃ emissions (Rebolledo et al., 2013). Little is known about the actual emissions from slurry applied over bare soils (Sanz et al., 2010; Yagüe and Bosch-Serra, 2013; Bosch-Serra et al., 2014). Probably the lack of research may partly explain the recent (2013–15) Spanish NH₃ emissions increment (by 4.6%). As a consequence of this, the European Environmental Agency (2017) ranked Spain in the last place for abatement achievement. Supplementary efforts must be implemented to fulfil commitments that the Spanish government has made, like the other EU-28 countries (European Union, 2016).

In semi-arid Mediterranean areas, slurry application at the winter cereal tillering stage (February–March) is advisable as it reduces the cost of mineral fertilizers and prevents slurry accumulation in pits throughout the year. It also increases N efficiency in winter cereals (Bosch-Serra et al., 2015). Thus, in these agricultural systems, the control of ammonia emissions is a response to an environmental threat but it must also be matched with maximum slurry reuse as fertilizer throughout the cropping season. Measurements of NH₃ potential abatement following different slurry field management practices are crucial. The objective of the study described here was to compare NH₃ emission abatement using TH vs. SP methods when pig slurry was applied before sowing (over bare soil) and when the crop (winter cereal) was at the tillering stage.

2.2 Materials and methods

2.2.1 The site

The experiment was carried out over a winter barley crop (*Hordeum vulgare* L. cv. Gustav) in Castelló de Farfanya (Lleida, Spain, 41° 47' 41"N, 0° 43' 42"E; 267 m a.s.l.) during the 2015–2016 cropping season. Soil classification was Xeric Torriorthent (Soil Survey Staff, 2014). The topsoil sub-layer (0.2 m depth) had a clay loam texture (291 g clay kg⁻¹, 477 g silt kg⁻¹, 232 g sand kg⁻¹). The soil water content (SWC) at –33 kPa (water filling capacity, WFC) and at –1500 kPa (permanent wilting point, PWP) was 24% and 14% over soil weight (w/w), respectively. The water-filled pore space (WFPS) was 44% (w/w). The electrical conductivity was 0.19 dS m⁻¹ (soil:water, 1:5) and cation exchange capacity was 12.4 cmol⁺ kg⁻¹, the organic matter content was 27.9 g kg⁻¹, the pH was 8.2 (soil:water, 1:2.5) and the carbonate content was 327 g kg⁻¹.

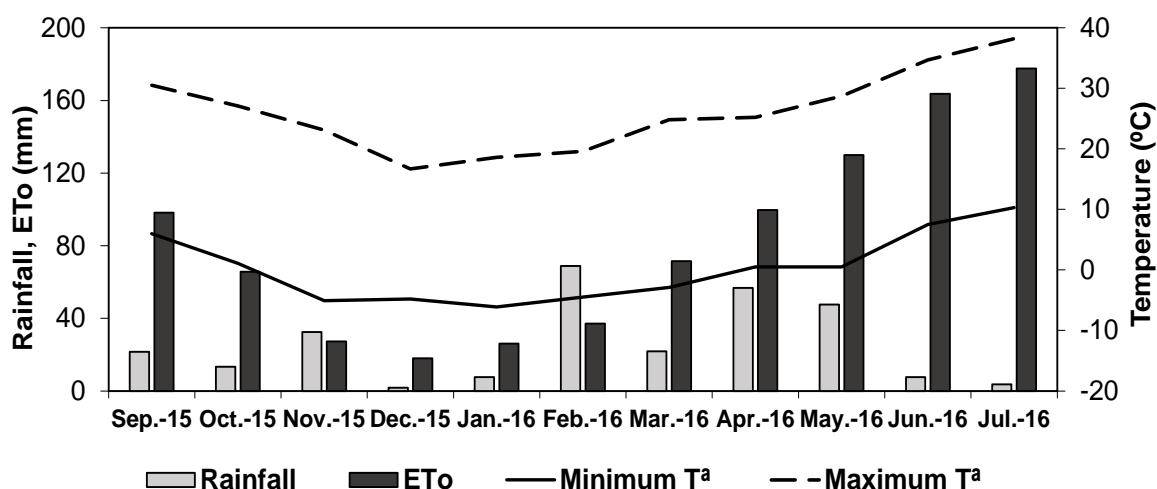


Figure 2.1 Monthly time series of rainfall, reference crop evapotranspiration (ETo, Allen et al., 1998) and minimum and maximum temperatures during the growing season (2015-2016) recorded nearby (8 km) the experimental field. (<http://www.Ruralcat.net>; Vallfogona de Balaguer).

The climate is semi-arid Mediterranean. The annual rainfall ranged between 250 and 450 mm during the last 40 years. Seasons in 2015–2016 were within the general climate patterns (Figure 2.1) which are characterized by high evapotranspiration rates, low precipitation mainly distributed in two periods (spring and autumn) of the cropping season and minimum temperatures of the air above freezing because the site is foggy. Irrigation is

required to reach a potential high yield, which for winter barley (in the experimental campaign) was close to 8 Mg ha⁻¹.

2.2.2 Experimental setup

Pig slurry application treatments (SP and TH) were applied before sowing over bare soil, and at cereal tillering (in different plots) when the crop canopy covered the soil surface. The control treatment did not receive any N fertilization (no slurry, no mineral N). Three replicates (blocks) were used. The five treatments in each block were randomly distributed. Each plot was of identical size (225 m²).

The amount of slurry applied was determined by the difference between tank weights at the start and the end of application. Samples of slurry from each tank were taken and refrigerated for post-analysis composition (Table 2.1). The dry matter content was obtained by a gravimetric method at 105°C, the organic nitrogen was determined using the Kjeldahl method, and the ammonium nitrogen by distillation and titration according to methods 4500-NH₃B-C from APHA (2012).

Slurry was applied just before sowing (S-) to the winter barley crop (*Hordeum vulgare*, L.). Before application, the stubble of the previous crop (*Zea mays*, L.) was buried by superficial tillage. The amount of slurry applied at S- was 87.8 kg total-N ha⁻¹ (68.9 kg NH₄⁺-N ha⁻¹) using the splash-plate (S-SP), and 82.1 kg total-N ha⁻¹ (61.1 kg NH₄⁺-N ha⁻¹) using trail hoses (S-TH). At cereal tillering (T-), 168.1 kg total-N ha⁻¹ (123.0 kg NH₄⁺-N ha⁻¹) was applied using splash-plate (T-SP), and 155.8 kg total-N ha⁻¹ (98.8 kg NH₄⁺-N ha⁻¹) using trail hoses (T-TH).

Slurries were applied on December 1, 2015 (S-) and March 14, 2016 (T-). Winter barley was sown on December 15, 2015. For the SP method, the plate was adjusted close to the minimum inclination to uniformly spread the slurry and to avoid dispersive fluxes out of the experimental plot. For the TH method, tubes (4.5 cm diameter) separated 26 cm apart deployed the slurry over the ground. In December the slurry was buried (~0.20–0.25 m) using disc-harrowing 27.5h (approx.) after application. In March, slurries were not buried because vegetation was established.

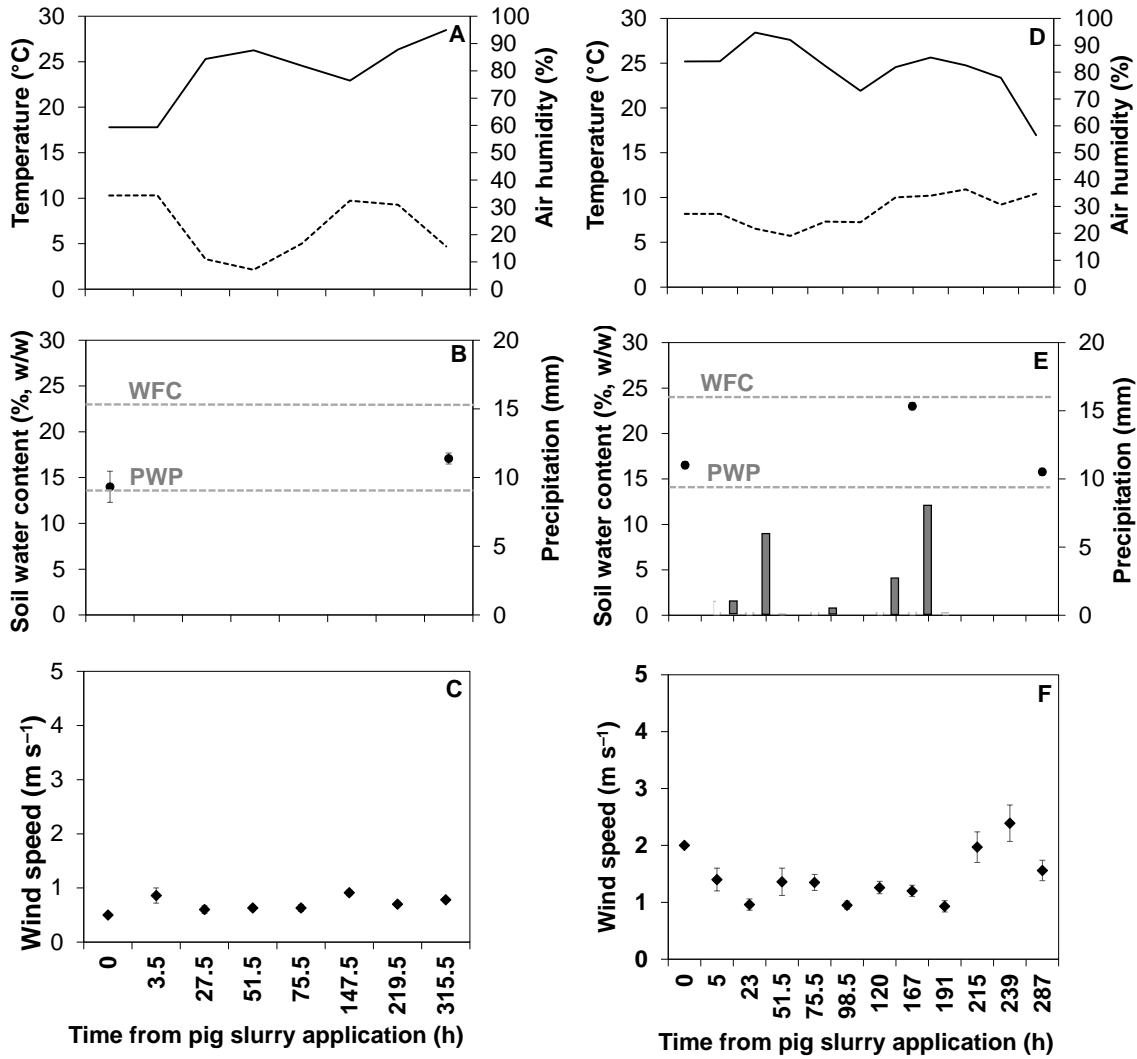


Figure 2.1. Temperature (solid lines) and relative humidity (dashed lines) of the air, rainfall and wind speed in hourly basis measured after slurry application before sowing (A, B, C) and at cereal tillering stage (D, E, F). The soil water content (% w/w) is plotted taking as a reference the permanent wilting point (PWP) and the water filling capacity (WFC).

The temperature and relative humidity of the air (Testo 175H1 Testo Inc. USA) were measured half-hourly at 2 m above the ground in the middle of the field. Rainfall and wind speed measurements were available nearby (Figure 2.2). During 24 h after slurry application, mean temperature of the air was about 5°C higher at tillering than at sowing (Figure 2.2 A, D). Before sowing, fog maintained the humidity of the air around 80%, i.e. no rainy events were observed (Figure 2.2 B) and the field was not irrigated. At tillering, the humidity of the air was around 90% for a period starting 5h after slurry application up to 167h because drizzle events (a total of five events) occurred. The total rain was 18.4 mm (Figure 2.2 E). Calm predominated at sowing but at tillering mean wind speed oscillated between 1–2.5 m s⁻¹ (Figure 2.2 C, F).

Table 2.1. Dry matter and total-N content (ammonium-N and organic-N fractions are included) in slurries applied at different doses using splash-plate (-SP) and trail hoses (-TH) before sowing (S) and at cereal tillering stage (T-).

Parameter	S-SP	S-TH	T-SP	T-TH
Dry matter (%)	1.58	1.81	3.27	4.91
Total-N (kg Total N m ⁻³)	2.15	2.23	4.10	4.10
Ammonium-N (kg NH ₄ ⁺ - N m ⁻³)	1.64	1.65	3.00	2.60
Organic-N (kg Org-N m ⁻³)	0.51	0.58	1.10	1.50
Dose applied (Mg ha ⁻¹)	42	37	41	38

Table 2.2. Average of climate parameters^a recorded during 24h after slurry application before sowing and at cereal tillering stage.

Parameter	Before sowing	At tillering
Mean temperature (°C)	2.0±5.2	7.1±1.5
Maximum temperature (°C)	2.8±5.2	7.4±1.6
Minimum temperature (°C)	1.4±5.0	6.7±1.4
Mean soil temperature down to 5 cm depth (°C)	8.3±0.5	9.7±0.4
Mean relative humidity (%)	82.3±15.3	87.3±9.2
Wind speed (2m; m s ⁻¹)	0.6±0.3 (0.9±0.3) ^b	1.1±0.5 (1.4±0.5) ^c
Rainfall (mm)	0.1	7.2
Reference evapotranspiration (mm h ⁻¹)	0.03±0.06	0.03±0.03

± Standard deviation

^a Vallfogona de Balaguer meteorological station (UTM X, UTM Y: 319626, 4628169). Data available at: www.Ruralcat.net

^b Wind speed average during the first 3.5h after slurry application

^c Wind speed average during the first 5h after slurry application

The soil water content within a layer 0.1m depth was determined gravimetrically before each fertilizer application, at the end of measurements, and after the rainy period at tillage. Before sowing (Figure 2.2 B), the SWC (0-0.1m) was at the permanent wilting point (14%, w/w) and it increased up to 17% (w/w) at the end of the experiment. At tillering, the SWC was 16% (w/w), it increased up to 23% 167h after slurry application and reached the initial value (16%) 360h after application (Figure 2.2 E). Thus, SWC ranged between 36–52% WFPS.

2.2.3 Quantification of volatilized ammonia and statistical analysis

Accumulated ammonia losses were determined using semi-open static chambers adapted from Nômmik (1973) and Alves et al. (2011) designs. The chambers made each consisted of a cylinder (19.5 cm diameter and 19.5 cm height) made of low density polyethylene terephthalate. Three chambers were placed per plot. Thus, a total of nine chambers were

set per treatment. Chambers were settled 2.5 cm deep in the soil. Two discs of polyurethane plastic foam ($0.021 \pm 0.001 \text{SD g cm}^{-3}$), previously soaked with a fixed volume (80 mL) of an acid solution containing oxalic acid in acetone (3% w/v) and dried in a ventilated hood, were deployed inside the chamber. Their diameter was 19.5 cm and their thickness 2.0 cm. At the top (17 cm above the ground), a foam (foam II) was fixed using a mesh of plastic tissue to carefully place it 5.5 cm up from the foam deployed below (foam I). The latter was deployed 7.5 cm above the ground using crossed steel wires and, therefore, it was above the canopy level (5 cm tall) at tillering stage. Thus, while foam I acted as a sink of NH_3 transferred by molecular diffusion from the soil, foam II acted as a sink of NH_3 emitted by the surrounding sources.

At tillering, during a rain period lasting from 5h up to 167h after slurry application, chambers were protected with plastic bags (volume 250 L). During this period, data obtained from Foam II were removed from the study. The replaced foams were kept in zip lock freezer bags to transport them to the laboratory. Each foam disc was soaked four times by a hand double cylinder wringer with 100 mL distilled water each time. The extract collected was diluted with water up to 500 mL. Next, NaOH (40% w/v) was added for pH adjustment and ammonia was quantified using a selective electrode (Crison, micropH 2002). The electrode was calibrated daily. A total of 810 foams were analysed, 378 before sowing and 432 at tillering. Ammonia concentration (mg L^{-1}) was calculated by subtracting the threshold determined from foams of the control treatment (one per block).

Before sowing, ammonia concentration was calculated at 3.5, 27.5, 51.5, 75.5, 147.5, 219.5 and 315.5h after slurry application. At tillering (close to the stem elongation stage), the chambers operated up to 287h after slurry application to obtain stable amounts of accumulated NH_3 . At the beginning, for a period of three days after slurry application, the sampling frequency was daily. Afterwards, samples were taken every two-three days (Figures 2.3, 2.4). The cumulative NH_3 volatilization was calculated. Total ammonia-nitrogen losses were related to the total N (N_t) and ammonium N applied with PS (N applied), to express the NH_3 losses (AL) as a relative percentage (AL_{N_t} and $AL_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$, respectively). To assess the abatement in NH_3 emissions (reduction efficiency) from the trail hose vs. splash-plate, the reduction efficiency was calculated (Eq. 1).

$$\text{Reduction efficiency} = 1 - [(NH_3 - N_{TH}) / (NH_3 - N_{SP})] \quad (1)$$

where $\text{NH}_3 - N_{TH}$ and $\text{NH}_3 - N_{SP}$ are the accumulative NH_3 -N losses calculated from trail hoses or splash-plate, respectively.

Table 2.3. Average values of accumulated NH₃-N losses (TANL) and relative NH₃-N losses to total N applied (AL_Nt) and to NH₄⁺-N applied (AL_NH₄⁺-N) before sowing, for each method, and determined for molecular (Foam I) and turbulent (Foam II) diffusion. Standard error of the mean.

Traps/Method of slurry application	TANL (kg NH ₃ -N ha ⁻¹)			AL_Nt (%)	AL_NH ₄ ⁺ -N (%)
	0-3.5 h	0-27.5h	0-51.5h		
Foam I				0-315.5 h	0-315.5 h
Trail hoses	0.70±0.28	1.12±0.39	1.21±0.35	2.14±0.51	2.87±0.70
Splash-plate	1.10±0.16	1.99±0.32	2.12±0.32	3.12±0.55	3.98±0.69
Significance	0.20	0.13	0.13	0.33	0.39
Foam II					
Trail hoses	0.53±0.10	0.86±0.08	0.90±0.09	1.90±0.14	2.55±0.56
Splash-plate	0.87±0.12	1.48±0.15	1.57±0.16	2.75±0.44	3.50±0.19
Significance	0.18	0.060	0.059	0.19	0.23

(n = 3) is included.

Table 2.4. Average values of accumulated NH₃-N losses (TANL) and relative NH₃-N losses to total N applied (AL_Nt) and to NH₄⁺-N applied (AL_NH₄⁺-N) at cereal tillering, for each method, and determined for molecular (Foam I) and turbulent (Foam II) diffusion. Standard error of the mean (n=3) is included.

Traps/method of slurry application	TANL (kg NH ₃ -N ha ⁻¹)			AL_Nt (%)		AL_NH ₄ ⁺ -N (%)	
	0-5 h	0-23h	0-287 h	0-287 h	167-287h	0-287 h	167-287h
Foam I							
Trail hoses	0.17±0.09	0.65±0.25	1.72±0.46	0.40±0.11	0.26±0.07	1.74±0.47	0.41±0.11
Splash-plate	2.11±0.27	3.48±0.54	5.37±0.88	0.48±0.15	0.29±0.09	4.36±0.72	0.39±0.12
Significance	0.030	0.049	0.089	0.33	0.49	0.12	0.78
Foam II							
Trail hoses	0.31±0.11	ND	ND	0.26±0.08	0.17±0.06	ND	0.26±0.08
Splash-plate	0.77±0.06	ND	ND	0.26±0.07	0.16±0.05	ND	0.22±0.07
Significance	0.095	ND	ND	0.97	0.85	ND	0.59

ND: no data .The chambers were covered during a rainy period.(n = 3) is included.

The package SAS V8.2 (SAS Institute, 2001) was used to perform an analysis of variance to compare values of total and relative $\text{NH}_3\text{-N}$ emissions recorded before sowing and at cereal tillering stage, for each slurry application method (Tables S1, S2, S3, S4). Separation of means was done applying the Duncan multiple range test ($\alpha = 0.05$).

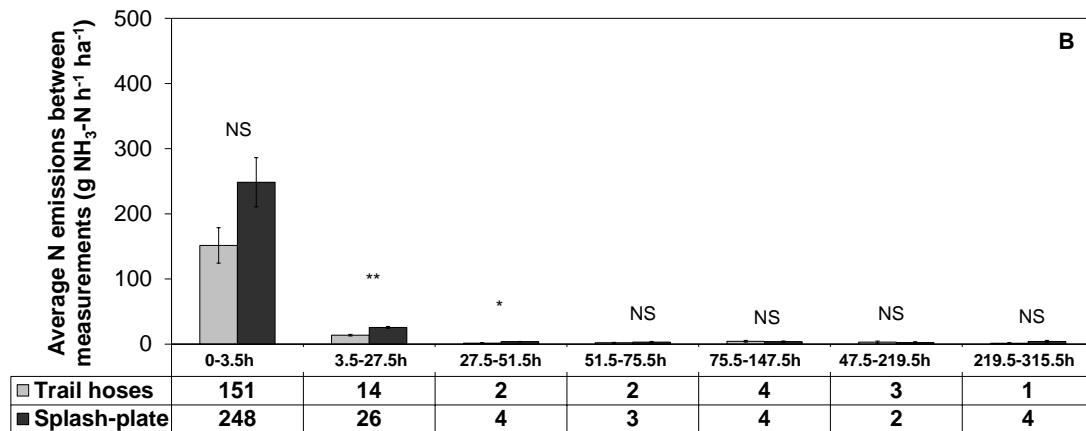
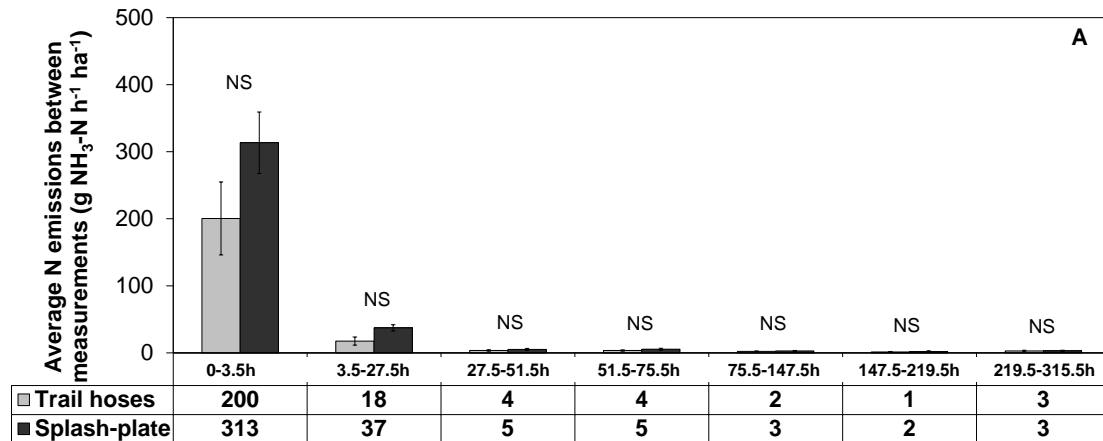


Figure 2.3. Molecular (A) and turbulent (B) diffused ammonia trapped over bare soil before sowing. Mean emission flux values ($\text{g NH}_3\text{-N h}^{-1} \text{ha}^{-1}$) for the different periods are also shown in a table below the time-axis. In the graph, vertical bars indicate \pm standard error of the mean (9 samples) and numbers upon the columns indicate the level of significance of the differences between methods (ANOVA analysis).

2.3 Results

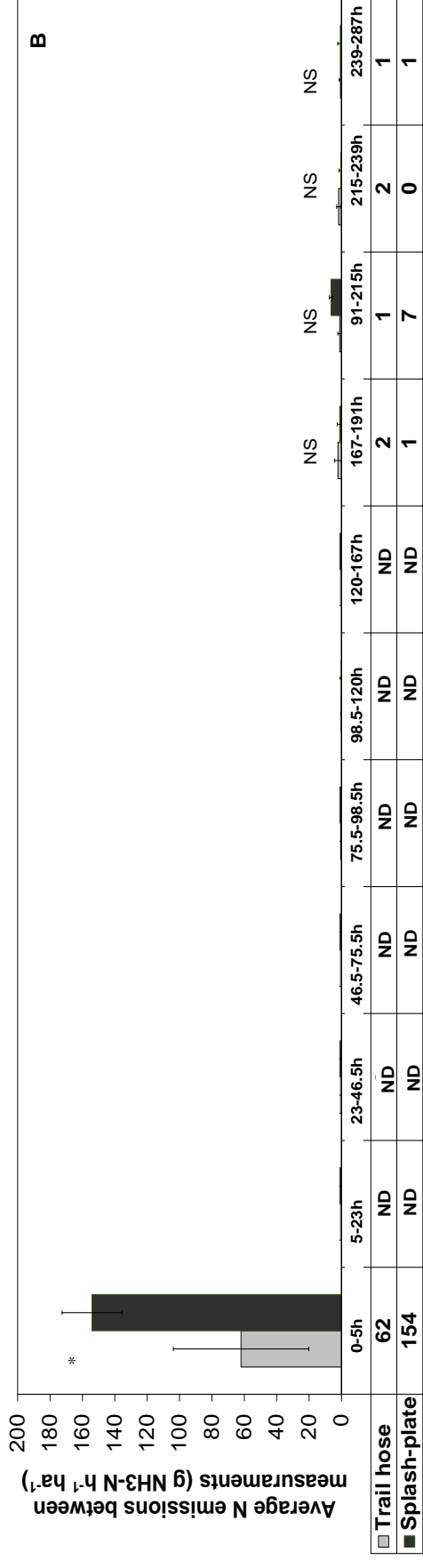
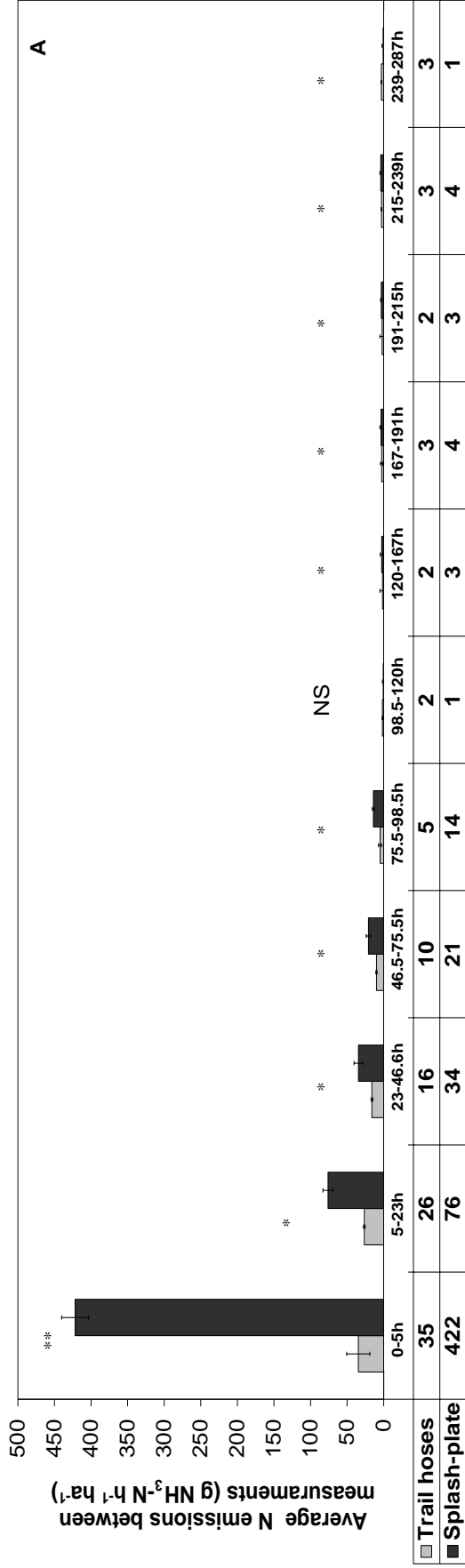
During the 24h after slurry application, the mean temperature of the air was $\sim 5^{\circ}\text{C}$ higher at tillering than at sowing (Figure 2.1 A, D). Before sowing, fog maintained the humidity of the air $\sim 80\%$ (i.e., no rainy events were observed, Figure 2.1 B) and the field was not irrigated. At tillering, the humidity of the air was $\sim 90\%$ for a period starting 5h after slurry application up to 167h because drizzle events (a total of five events) occurred. The total rain was 18.4 mm (Figure 2.1 E). Calm predominated at sowing, but at tillering, mean wind speed ranged between 1 and 2.5 m s^{-1} (Figure 2.1 C, F).

Before sowing (Figure 2.1 B), the SWC (0–0.1 m) was at the permanent wilting point (14% [w/w]), and it increased up to 17% (w/w) at the end of the experiment. At tillering, the SWC was 16% (w/w); it increased up to 23% (167h after slurry application) and reached the initial value (16%) 360h after application (Figure 2.1 E). Thus, SWC ranged between 36 and 52% of WFPS at saturation.

Before sowing, maximum estimated fluxes from measured NH_3 concentrations were recorded just after slurry application (0–3.5h), regardless of which foam was measured and the application method. For Foam I, the maximum estimated fluxes were $313\text{ g NH}_3\text{-N h}^{-1}\text{ ha}^{-1}$ for SP and $200\text{ g NH}_3\text{-N h}^{-1}\text{ ha}^{-1}$ for TH. For Foam II, the estimates were $248\text{ g NH}_3\text{-N h}^{-1}\text{ ha}^{-1}$ for SP and $151\text{ g NH}_3\text{-N h}^{-1}\text{ ha}^{-1}$ for TH. During this period (3.5h), AL_Nt was 40% (Foam I) regardless of the dispersal method. Before slurry burying (0–27.5h), AL_Nt increased up to 73 and 64% using SP and TH, respectively.

At the end of the experiment (315.5h after slurry application), no differences between methods were found for AL_Nt and $\text{AL_NH}_4^+\text{-N}$. Regardless of which foam was measured, the reduction efficiency was 0.31. However, the total accumulated $\text{NH}_3\text{-N}$ losses were lower than 3 and $2\text{ kg NH}_3\text{-N ha}^{-1}$ for SP and TH respectively (Table 2.1), which led to non significant differences in NH_3 abatement between methods.

At cereal tillering, maximum estimated fluxes were also recorded immediately after slurry application (0–5h). For Foam I, maximum estimated fluxes were $422\text{ g NH}_3\text{-N h}^{-1}\text{ ha}^{-1}$ for SP, which was significantly higher than using TH ($35\text{ g NH}_3\text{-N h}^{-1}\text{ ha}^{-1}$). Later in the experiment, significant differences between methods (Foam I) were not observed. For Foam II, and the tendency of TH to reduce emissions ($62\text{ g NH}_3\text{-N h}^{-1}\text{ ha}^{-1}$) over SP ($154\text{ g NH}_3\text{-N h}^{-1}\text{ ha}^{-1}$) was also initially (0–5 h) observed ($p = 0.09$, Table 1).



ND: no data-The chambers were covered during a rainy period.

Figure 2.4. Molecular (A) and turbulent (B) diffused ammonia trapped at cereal tillering stage. Mean emission flux values ($\text{g NH}_3\text{-N h}^{-1} \text{ha}^{-1}$) for each period of measurements are specified below the time-axis. In the graph, vertical bars indicate \pm standard error of the mean (9 samples) and numbers upon the columns indicate the level of significance of the differences between methods (ANOVA analysis).

The initial losses (period of 5h) calculated using Foam I results led to AL_{Nt} values of 10 and 39% using TH and SP, respectively (Table 2.1). Losses rose 65 (SP) and 38% (TH) in the initial 23h period (Table 2.1). At the end of the experiment (287h after slurry application), no differences between methods were found for AL_{Nt} and AL_{NH₄⁺-N}. The reduction efficiency was 0.68 (Foam I). The total accumulated NH₃-N losses were 5.4 and 1.7 kg NH₃-N ha⁻¹ for SP and TH respectively (Table 2.1), with no differences between methods ($p = 0.089$). After the rainy period (from 167 to 287h), no significant difference was also found using Foam II.

2.4 Discussion

Measurements were taken under climatic conditions and SWC (Figure 2.2) representative of semiarid agricultural systems (Morell et al., 2011). Slurries were applied when the SWC equalled 31% and 37% (w/w) of WFPS at S- and T-, respectively. Thus, slurry infiltration rates were favoured and microbial processes related to other N losses than NH₃ volatilization (e.g. denitrification) were limited (Linn and Doran, 1984).

Before sowing, the ammonia losses from bare soil (Table 2.3; Figure 2.3 A, B), were lower than those reported for similar areas (Sanz et al., 2010; Yagüe and Bosch-Serra, 2013; Bosch-Serra et al., 2014). The buried residues from the previous crop (maize) increased superficial roughness which combined with low slurry DM content (<2%; Table 2.1) favored slurry infiltration in the first 3.5h. Thus, the source area exposure to the air was reduced (Van der Molen et al., 1989; Sommer et al., 2003; Zhao et al., 2013; Bosch-Serra et al., 2014; Häni et al., 2016). Quick infiltration also strengthens ammonia sorption by soil colloids, mainly as the cation exchange capacity of soil increases (Fenn and Kissel, 1976). Ammonia absorption reduces ammonia concentration in the solution and, therefore, the ammonia transfer to the atmosphere is minimized (Sommer, 1992; Sommer et al., 2004). Prompt infiltration kept the maximum AL_{NH₄⁺-N} losses below 3% and 4% for TH and SP, respectively (Foam I, Table 3). Overall, in semi-arid environments, it masked the presumed potential TH advantage vs. SP (Figure 2.3 A, B).

Lack of differences between methods was consistent regardless of the foam. The results obtained support the European Directive (European Union, 2016) which emphasizes the need to bury slurries before 4h after spreading because maximum fluxes were observed within such periods (Figure 2.3 A, B).

At cereal tillering and during the first day after slurry application, emissions observed with Foam I (Table 2.4, Figure 2.4 A) after using SP were consistently higher than after using TH because of the larger slurry exposure (ground and leaves). For this case, the slurry DM content (3.3%; T-SP, Table 2.1) favoured impregnation and permanence within the canopy. Hoses deposited the slurry directly onto the ground, favouring infiltration. Though, the canopy could act as sink of ammonia (Rochette et al., 2008; Sommer and Hutchings, 2001) in our case it did not play a role because plants were in the dark.

Measurements obtained using Foam II during the initial period (0-5h) led to non-significant differences between methods (Table 2.4) as a consequence of the high standard error of the mean in TH (Figure 2.4 B). The latter could be explained by the windy conditions (Figure 2.2 F), before the first rain event, which led to an erratic contamination.

Rainfall washed slurry from the leaves and favoured infiltration. However, after the rainy period no effect on emissions was observed because maximum losses took place during the first day after application. The latter is shown in Figure 2.4 because both foams showed no differences between methods and Foam I was not affected by rainfall.

2.5 Conclusions

At cereal sowing, no significant advantages of TH versus SP on NH_3 emission abatement were found when slurries with a low DM content were applied over a bare soil. When soils are usually below 40% of WFPS at saturation, quick slurry infiltration is enhanced, which may explain the absence of differences between the two methods. Nevertheless, as 40% of total N losses were observed during the first 3.5h after spreading (0.7 and 1.1 $\text{kg NH}_3\text{-N ha}^{-1}$ for TH and SP, respectively), slurry burying as soon as possible after application is recommended.

At cereal tillering, TH improved initial NH_3 emission abatement versus SP because the source was displaced above the ground by SP application. The final emission difference between methods was 3.7 $\text{kg NH}_3\text{-N ha}^{-1}$, and maximum losses using TH were 1.7 $\text{kg NH}_3\text{-N ha}^{-1}$. Despite the level of significance, which was 0.089, TH might be recommended over SP because the difference mainly corresponds to the initial period.

Because N topdressing is recommended, it is concluded that TH improves the NH_3 abatement versus SP. This short-term study supports some of the recommended NH_3 abatement practices in the European Union.

Acknowledgments

This work was supported by European funds (Grant N° LIFE12 ENV/ES/000647) through a subcontract with Lleida University (AG-2016-466).

References

- Alves, A.C., Oliveira, P.P.A., Herling, V.R., Trivelin, P.C.O., Luz, P.H. de C., Alves, T.C., Rochetti, R.C., Barioni Júnior, W., 2011. New methods to quantify NH₃ volatilization from fertilized surface soil with urea. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 35, 133–140.
- Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M., 1998. *Crop Evapotranspiration. Guidelines for Computing Crop Water Requirements*. FAO Irrig. and Drain. 56, 65–77.
- APHA, 2012. 4500-NH₃: Nitrogen (ammonia)*. In: Rice, E.W., Bridgewater, L., editors, *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 2nd ed. Am. Washington, DC. (EE. UU): Public Health Assoc., Am. Water Works Assoc., Water Environ. Fed.; p. 4-108–4-117.
- Beccaccia, A., Ferrer, P., Ibáñez, M.A., Estellés, F., Rodríguez, C., Moset, V., de Blas, C., Calvet, S., García-Rebollar, P., 2015. Relationships among slurry characteristics and gaseous emissions at different types of commercial Spanish pig farms. *Spanish J. Agric. Res.* 13, 1–15.
- Bosch-Serra, À.D., Ortiz, C., Yagüe, M.R., Boixadera, J., 2015. Strategies to optimize nitrogen efficiency when fertilizing with pig slurries in dryland agricultural systems. *Eur. J. Agron.* 67, 27–36.
- Bosch-Serra, À.D., Yagüe, M.R., Teira-Esmatges, M.R., 2014. Ammonia emissions from different fertilizing strategies in Mediterranean rainfed winter cereals. *Atmos. Environ.* 84, 204–212.
- Denmead, O.T., 1983. Micrometeorological methods for measuring gaseous losses of nitrogen in the field. In: Freney, J.R., Simpson, J.R., editors, *Gaseous Loss of Nitrogen from Plant-Soil Systems*. Dordrecht (NL): Springer; p. 133-157.
- European Commission. 2016. *Agriculture – ammonia emission statistics*. [accessed 30 May 2018]. <http://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/index.php/Archive>:
- European Environmental Agency, 2017. *European Union emission inventory report 1990–2015 under the UNECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (LRTAP)*. EEA-Report 9/2017. [accessed 30 May 2018]. <https://www.eea.europa.eu/publications/annual-eu-emissions-inventory-report>.
- European Union, 2016. Directive (EU) 2016/2284 of the European Parliament and of the Council of 14 December 2016 on the reduction of national emissions of certain atmospheric pollutants, amending Directive 2003/35/EC and repealing Directive 2001/81/EC. *Off. J. Eur. Commun.* L 344, 1–31.
- Fenn, L.B., Kissel, D.E., 1976. The influence of cation exchange capacity and depth of incorporation on ammonia volatilization from ammonium compounds applied to calcareous soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 40, 394–398.
- Grant, C.A., Brown, K.R., Bailey, L.D., Jia, S., 1996. Volatile losses of NH₃ from surface-applied urea and urea ammonium nitrate with and without the urease inhibitors NBPT or ammonium thiosulphate. *Can. J. Soil Sci.* 76, 417–419.
- Hafner, S.D., Pacholski, A., Bittman, S., Burchill, W., Bussink, W., Chantigny, M., Carozzi, M., Générmont, S., Häni, C., Hansen, M.N., Huijsmans, J., Hunt, D., Kupper, T., Lanigan, G., Loubet, B., Misselbrook, T., Meisinger, J.J., Neftel, A., Nyord, T., Pedersen, S. V., Sintermann, J., Thompson, R.B., Vermeulen, B., Vestergaard, A.

- V., Voylokov, P., Williams, J.R., Sommer, S.G., 2018. The ALFAM2 database on ammonia emission from field-applied manure: Description and illustrative analysis. *Agric. For. Meteorol.* 258, 66–79.
- Häni, C., Sintermann, J., Kupper, T., Jocher, M., Neftel, A., 2016. Ammonia emission after slurry application to grassland in Switzerland. *Atmos. Environ.* 125, 92–99.
- Harper, L.A., Sharpe, R.R., 1998. Atmospheric ammonia: Issues on transport and nitrogen isotope measurement. *Atmos. Environ.* 32, 273–277.
- Huijsmans, J.F.M., Hol, J.M.G., Hendriks, M.M.W.B., 2001. Effect of application technique, manure characteristics, weather and field conditions on ammonia volatilization from manure applied to grassland. *NJAS Wagening. J. Life Sci.* 49, 323–342.
- Krupa, S. V., 2003. Effects of atmospheric ammonia (NH₃) on terrestrial vegetation: A review. *Environ. Pollut.* 124, 179–221.
- Lara-Cabezas, A.R.L., Trivelin, P.C.O., Bendassolli, J.A., de Santana, D.G., Gascho, G.J., 1999. Calibration of a semi-open static collector for determination of ammonia volatilization from nitrogen fertilizers. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30, 389–406.
- Linn, D.M., 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.
- Mattila, P.K., Joki-Tokola, E., 2003. Effect of treatment and application technique of cattle slurry on its utilization by ley: I. Slurry properties and ammonia volatilization. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 65(3): 221–230.
- Menzi, H., 2002. Manure management in Europe: Results of a recent survey. In: Venglovsky, J. and G. Gréserová, editors, *Proceedings of the 10th International Conference of the RAMIRAN Network on Recycling of Agricultural, Municipal and Industrial Residues in Agriculture*, 14–18 May, Košice, (SK): RAMIRAN. University of Veterinary Medicine, Research Institute of Veterinary Medicine. p. 93–102.
- Misselbrook, T.H., Nicholson, F.A., Chambers, B.J., 2005. Predicting ammonia losses following the application of livestock manure to land. *Bioresour. Technol.* 96, 159–168.
- Misselbrook, T.H., Van Der Weerden, T.J., Pain, B.F., Jarvis, S.C., Chambers, B.J., Smith, K.A., Phillips, V.R., Demmers, T.G.M., 2000. Ammonia emission factors for UK agriculture. *Atmos. Environ.* 34, 871–880.
- Morell, F.J., Lampurlanés, J., 2011. Yield and water use efficiency of barley in a semiarid Mediterranean agroecosystem: Long-term effects of tillage and N fertilization. *Soil Tillage Res.* 117, 76–84.
- Nõmmik, H., 1973. The effect of pellet size on the ammonia loss from urea applied to forest soil. *Plant Soil* 39, 309–318.
- Pardo, G., Moral, R., Aguilera, E., del Prado, A., 2015. Gaseous emissions from management of solid waste: a systematic review. *Glob. Chang. Biol.* 21, 1313–1327.
- Rebolledo, B., Gil, A., Pallarés, J., 2013. A spatial ammonia emission inventory for pig farming. *Atmos. Environ.* 64, 125–131.

- Reidy, B., Dämmgen, U., Döhler, H., Eurich-Menden, B., van Evert, F.K., Hutchings, N.J., Luesink, H.H., Menzi, H., Misselbrook, T.H., Monteny, G.-J., Webb, J., 2008. Comparison of models used for national agricultural ammonia emission inventories in Europe: Liquid manure systems. *Atmos. Environ.* 42, 3452–3464.
- Rochette, P., Guilmette, D., Chantigny, M.H., Angers, D.A., MacDonald, J.D., Bertrand, N., Parent, L.É., Côté, D., Gasser, M.O., 2008. Ammonia volatilization following application of pig slurry increases with slurry interception by grass foliage. *Can. J. Soil Sci.* 88, 585–593.
- Sanz, A., Misselbrook, T., Sanz, M.J., Vallejo, A., 2010. Use of an inverse dispersion technique for estimating ammonia emission from surface-applied slurry. *Atmos. Environ.* 44, 999–1002.
- SAS Institute, 2001. The SAS/TAT system for Windows. Release 8.2. SAS Inst., Cary, NC.
- Shigaki, F., Dell, C.J., 2015. Comparison of low-cost methods for measuring ammonia volatilization. *Agron. J.* 107, 1392–1400.
- Sintermann, J., Neftel, A., Ammann, C., Häni, C., Hensen, A., Loubet, B., Flechard, C.R., 2012. Are ammonia emissions from field-applied slurry substantially over-estimated in European emission inventories? *Biogeosciences* 9, 1611–1632.
- Smith, K.A., 2017. Changing views of nitrous oxide emissions from agricultural soil: Key controlling processes and assessment at different spatial scales. *Eur. J. Soil Sci.* 68, 137–155.
- Soil Survey Staff, 2014. Keys to soil taxonomy. 12th ed. Washington, DC. (US): U. S. Gov. Print. Office
- Sommer, S. G., 1992. Ammonia volatilization from cattle and pig slurry during storage and after application in the field. [Ph.D. diss.], Copenhagen (DK): Royal Veterinary and Agricultural Univ.
- Sommer, S., Hutchings, N., 2001. Ammonia emission from field applied manure and its reduction—invited paper. *Eur. J. Agron.* 15, 1–15.
- Sommer, S.G., Géniermont, S., Cellier, P., Hutchings, N.J., Olesen, J.E., Morvan, T., 2003. Processes controlling ammonia emission from livestock slurry in the field. *Eur. J. Agron.* 19, 465–486.
- Sommer, S.G., Jensen, L.S., Clausen, S.B., Søgaard, H.T., 2006. Ammonia volatilization from surface-applied livestock slurry as affected by slurry composition and slurry infiltration depth. *J. Agric. Sci.* 144, 229–235.
- Sommer, S.G., Schjoerring, J.K., Denmead, O.T., 2004. Ammonia emission from mineral fertilizers and fertilized crops. *Adv. Agron.* 82, 557–622.
- Sørensen, P., Amato, M., 2002. Remineralisation and residual effects of N after application of pig slurry to soil. *Eur. J. Agron.* 16, 81–95.
- Van Der Molen J., Bussink, D.W., Vertregt, N., Van Faassen, G.H., Den Boer, D.J., 1989. Ammonia Volatilization from Arable and Grassland Soils. In: Hansen J.A. and Henriksen, K., editors, Nitrogen in Organic Wastes. Applied on Soils. Academic Press, London. p. 185-201.

- Webb, J., Pain, B., Bittman, S., Morgan, J., 2010. The impacts of manure application methods on emissions of ammonia, nitrous oxide and on crop response: A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 137, 39–46.
- Yagüe, M.R., Bosch-Serra, À.D., 2013. Slurry field management and ammonia emissions under Mediterranean conditions. *Soil Use Manage.* 29, 397–400.
- Yagüe, M.R., Bosch-Serra, À.D., Boixadera, J., 2012. Measurement and estimation of the fertiliser value of pig slurry by physicochemical models: Usefulness and constraints. *Biosyst. Eng.* 111, 206–216.
- Yang, W., Zhu, A., Zhang, J., Xin, X., Zhang, X., 2017. Evaluation of a backward Lagrangian stochastic model for determining surface ammonia emissions. *Agric. For. Meteorol.* 234–235, 196–202.
- Zhao, L., Wang, L., Liang, X., Wang, J., Wu, F., 2013. Soil Surface Roughness Effects on Infiltration Process of a Cultivated Slopes on the Loess Plateau of China. *Water Resour. Manag.* 27, 4759–4771.

Supplemental tables

Table S1. Analysis of variance^a of ammonia (g NH₃-N h⁻¹ ha⁻¹) trapped in Foam I (molecular diffusion) and in Foam II (turbulent diffusion) during different periods of time after slurry spreading over bare soil (before sowing) by two different methods (or treatments, TR): splash-plate and trail hoses.

Traps	Period	Source	DF	0-3.5h		3.5-27.5h		27.5-51.5h		51.5-75.5h		75.5-147.5h		147.5-219.5h		219.5-315.5h		
				MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	
Foam I	Between TR	1	19128.7	0.2	583.5	0.09	3.8	0.07	5.5	0.5	0.8	0.7	0.4	0.7	0.4	0.7	0.1	0.9
	Between blocks	2	13570.4	0.3	90.7	0.4	19.32	0.02	12.5	0.4	0.3	0.9	3.9	0.3	0.4	0.3	0.4	0.9
	Within TR (residual)	2	5468.5		61.6		0.3		9.0		3.0		1.5		7.9			
Foam II	Between TR	1	14099	0.2	214.3	0.002	6.7	0.06	2.0	0.5	0.9	0.8	1.1	0.3	10.2	0.3	0.3	0.3
	Between blocks	2	1047.2	0.8	8.2	0.05	0.2	0.7	3.5	0.4	1.9	0.8	3.9	0.2	2.6	0.2	2.6	0.6
	Within TR (residual)	2	3557.7		0.4		0.4		2.7		8.8		0.7		4.2			

^a DF: degrees of freedom. MS: mean square. P: probability level.

Table S2. Analysis of variance^a of ammonia ($\text{g NH}_3\text{-N h}^{-1} \text{ha}^{-1}$) trapped in Foam I (molecular diffusion) and in Foam II (turbulent diffusion) during different periods of time after slurry spreading at cereal tillering by two different methods (or treatments, TR): splash-plate and trail hoses.

Traps	Period	0-5h		5-23h		23-46.5h		46.5-75.5h		75.5-98.5h		98.5-120h		120-167h		167-191h		191-215h		215-239h		239-287h	
		Source	DF	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P
Foam I	Between TR	1	224758.0	0.03	3702.2	0.1	505.6	0.3184	0.4	127.9	0.1	1.93	0.6	2.0	0.6	0.9	0.08	1.9	0.6	1.5	0.3	8.8	0.1
	Between blocks	2	2295.9	0.8	27.5	0.9	194	0.5113	0.5	31.7	0.3	5.17	0.4	5.2	0.6	50.9	0.002	7.8	0.4	6.81	0.1	2.2	0.4
	Within TR (residual)	2	7088.9		445.9		222.0		136.6		14.5		4.05		6.7		0.1		5.2		0.89		1.2
Foam II	Between TR	1	12706.1	0.09											1.8	0.3	45.1	0	3.0	0.02	0.02	0.9	
	Between blocks	2	181.9	0.9											7.0	0.1	22.3	0	0.2	0.3	1.3	0.3	
	Within TR (residual)	2	1356.3																				0.07

^a DF: degrees of freedom. MS: mean square. P: probability level

Table S3. Analysis of variance^a of total accumulated (TANL, kg NH₃-N ha⁻¹) and relative ammonia losses (AL_Nit%, NH₃-N losses to total N applied; AL_NH₄⁺-N%, NH₃-N losses to NH₄⁺-N applied) trapped in Foam I (molecular diffusion) and in Foam II (turbulent diffusion) during different periods of time after slurry spreading over bare soil (before sowing) by two different methods (or treatments, TR): splash-plate and trail hoses.

Traps	N losses														
	Period	Source	DF	TANL			AL_Nit%			AL_NH ₄ ⁺ -N%					
				0-3.5h	0-27.5h	0-51.5h	0-315.5h	0-315.5h	0-315.5h	0-315.5h	0-315.5h	0-315.5h			
Foam I				MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P
	Between TR	1	0.24	0.2	1.13	0.1	1.23	0.1	1.47	0.3	1.48	0.3	1.85	0.4	0.4
	Between blocks	2	0.16	0.3	0.38	0.3	0.31	0.4	0.27	0.7	0.36	0.7	0.63	0.7	0.7
	Within TR	2	0.07		0.18		0.19		0.66		0.91		1.56		
	(residual)														
Foam II				MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P
	Between TR	1	0.17	0.2	0.59	0.06	0.69	0.06	1.10	0.2	1.08	0.2	1.37	0.2	0.2
	Between block	2	0.01	0.8	0.02	0.6	0.03	0.6	0.15	0.6	0.19	0.6	0.31	0.6	0.6
	Within TR	2	0.04		0.04		0.04		0.22		0.29		0.48		
	(residual)														

^a DF: ddegrees of freedom. MS: mean square. P: probability level.

Table S4. Analysis of variance^a of total accumulated (TANL, kg NH₃-N ha⁻¹) and relative ammonia losses (AL_Nt%, NH₃-N losses to total N applied; AL_NH₄⁺-N%, NH₃-N losses to NH₄⁺-N applied) trapped in Foam I (molecular diffusion) and in Foam II (turbulent diffusion) during different periods of time after slurry spreading at cereal tillering by two different methods (or treatments, TR): splash-plate and trail hoses.

Traps	N losses	Period	Source	DF	TANL												AL_Nt%						AL_NH ₄ ⁺ -N%											
					0-5			0-23			0-287			167-287			0-287			167-287			0-287			167-287			0-287			167-287		
					MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P	MS	P		
Foam I	Between TR	1	5.63	0.03	12.01	0.05	19.95	0.09	0.01	0.3	6.53	0.1	0.001	0.5	10.35	0.1	2.67E ⁻⁴	0.8	0.06	0.8	0.10	0.9	0.76	0.7	0.09	0.07	0.07	0.7	0.03	0.06	0.49	0.8	0.07	0.04
		2	0.06	0.8	0.10	0.9	0.76	0.7	0.09	0.07	0.07	0.07	0.7	0.03	0.06	0.49	0.8	0.07	0.04	0.06	0.8	0.07	0.04	0.06	0.49	0.8	0.07	0.04	0.06	0.49	0.8	0.07	0.04	
		Within TR (residual)	2	0.18		0.63		2.04		0.006		0.76		0.002		1.54		0.003																
Foam II	Between TR	1	0.31	0.1					1.67E ⁻⁵	0.9			1.5E ⁻⁴	0.9			0.003	0.6	0.005	0.9	0.04	0.2	0.01	0.2	0.01	0.2	0.01	0.2	0.01	0.2	0.03	0.2	0.03	0.2
		2	0.005	0.9					0.04	0.2			0.01	0.2			0.003	0.008																
		Within TR (residual)	2	0.04					0.009					0.003																				

^aDF: degrees of freedom. MS: mean square. P: probability level.

Capítulo 3

Fertilización con purín porcino: impacto sobre las lombrices de tierra en agricultura de secano

Este capítulo está publicado como artículo en la revista Investigación Agraria

Valdez-Ibañez, A.S., Bosch-Serra, À.D., Yagüe, M.R., 2019. Fertilización con purín porcino: impacto sobre las lombrices de tierra en agricultura de secano. Investig. Agrar. 21, 1–10. DOI: 10.18004/investig.agrar.2019.junio.1-10

Fertilización con purín porcino: impacto sobre las lombrices de tierra en agricultura de secano

Resumen

Las lombrices de tierra participan en el mantenimiento de los servicios ecosistémicos del suelo. Su presencia y actividad están influenciadas por las prácticas de manejo, entre ellas la fertilización. El objetivo de esta investigación fue cuantificar en un año bajo barbecho, la abundancia, biomasa y diversidad de especies de lombrices de tierra en respuesta a distintas estrategias de fertilización mantenidas durante 12 años en un agrosistema cerealístico de secano, bajo clima Mediterráneo semiárido. Esta fertilización se basó en purín de cerdo de engorde (PE) y de maternidad (PM), a distintas dosis de peso en fresco y distribuidas en seis tratamientos: tres tratamientos con PE (uno de 30 t ha⁻¹ año⁻¹ aplicado en pre-siembra y otros de 40 y 60 t ha⁻¹ año⁻¹ aplicados en cobertera), dos tratamientos con PM (60 y 90 t ha⁻¹ año⁻¹ aplicados en cobertera) y uno combinando PE y PM (30 t ha⁻¹ año⁻¹ de PE en pre-siembra más 90 t ha⁻¹ año⁻¹ de PM en cobertera). Se incluyó un tratamiento con fertilización mineral (0-FM) que actuaba como control. No hubo variaciones en la abundancia y la biomasa de lombrices registradas según el tipo de fertilización. Se identificaron dos especies de lombrices. La especie endogeica *Koinodrilus roseus* predominó en cuanto a abundancia (80-100%). La especie anécica *Nicodrilus trapezoides* no se detectó en las parcelas que habían recibido en cobertera las dos dosis más elevadas de PE, por lo que la ausencia de esta especie puede considerarse como un bioindicador de situaciones de sobrefertilización con PE.

Palabras claves: bioindicador, calidad de suelo, cereales de invierno, fertilizante orgánico, lumbrícidos.

Abreviaciones: MO, materia orgánica; PE, purín de cerdo en engorde; PM, purín de madres reproductoras

Abstract

Earthworms play an important role in the maintenance of soil ecosystem services. Their presence and activity are influenced by agricultural practices as fertilization. The objective of this research was to identify earthworm species and to quantify its abundance and biomass in a field experiment where different fertilization strategies were applied for a period of 12 years. The experiment was carried out under a semiarid Mediterranean climate, and in a fallow year of a rainfed cereal system. Fertilization strategies were based on pig slurries from fattening pigs (PE) and from sows (PM) at different fresh doses distributed in six treatments: three treatments only included PE (one rate was 30 t ha⁻¹ yr⁻¹ applied at pre-sowing, and other two treatments received 40 y 60 t ha⁻¹ yr⁻¹ applied at cereal tillering), two treatments only included PM (60 and 90 t ha⁻¹ yr⁻¹ applied at cereal tillering) and the last, it combined PE and PM (30 t ha⁻¹ yr⁻¹ of PE at pre-sowing plus 90 t ha⁻¹ yr⁻¹ of PM at cereal tillering). Fertilization included a mineral fertilization treatment (0-FM) acting as a control, with a N:P:K rate of 120:42:89 kg ha⁻¹ yr⁻¹. There were no variations in the abundance and biomass of earthworms registered according to the type of fertilization. Two earthworm species were identified. The endogeic species *Koinodrilus roseus* was the most abundant (80%–100%). The anecic species *Nicodrilus trapezoides* was not detected in plots receiving, at cereal tillering, the two highest doses of PE, that is, the absence of this species can be considered as an over-fertilization bioindicator.

Keywords: bioindicator, Lumbricidae, organic fertilizer, soil quality, winter cereal.

3.1 Introducción

España es el primer productor de porcino en Europa. Los 30 millones de cerdos cebados en 2017 equivalen al 20% de la producción europea (Unión Europea, 2018). Las deyecciones ganaderas generadas, mayoritariamente en forma de purines, se usan como fertilizante para la producción de grano y forraje, siendo la aplicación directa en campo la más común por ser la opción más económica. Las dosis aplicadas suelen basarse en la demanda de N de los cultivos. El uso de purín como fertilizante permite al agricultor acoplarse a las exigencias de la Política Agrícola Común establecida en la Unión Europea (2013) que incluye, entre otros, el mantenimiento de la materia orgánica (MO) y la estructura del suelo, y el evitar el deterioro de los hábitats. Sin embargo, debido a la gran disponibilidad de purín y la necesidad de vaciar las balsas de almacenamiento mediante aplicaciones en las fincas cercanas, no se puede descartar que en determinadas situaciones pueda existir una sobrefertilización. Los purines, además de aportar macro y micronutrientes, suelen incluir insumos de alimentación y sanidad animal (aditivos y productos zoonosológicos y farmacológicos) y sus derivados metabólicos y de degradación (De la Torre et al., 2000), por lo que las aplicaciones excesivas al suelo constituyen un riesgo ambiental. Adicionalmente, Murchie et al. (2015) mencionan que son de particular preocupación las acumulaciones de metales pesados.

Los purines de cerdo, según el tipo de granja de la que provienen: cerdos en engorde (PE), madres reproductoras (PM) o en ciclo cerrado presentan composiciones diferentes (Sánchez y González, 2005; Yagüe et al., 2012). Por ello, las aplicaciones de PE y PM a largo plazo podrían incidir sobre las propiedades del suelo de manera diferenciada, cambios a los que podrían ser sensibles determinados organismos del suelo, como las lombrices de tierra (Renaud et al., 2017).

Las lombrices de tierra juegan un papel importante en la regulación de los servicios ecosistémicos del suelo que dan soporte a la agricultura, principalmente en la descomposición de la MO, ciclo de nutrientes y actividades de bioturbación como la mezcla de materiales y formación de bioporos. Según Manono (2016), las lombrices de tierra son muy sensibles a prácticas de manejo del suelo afectándoles a nivel taxonómico (diversidad de especies), de grupos funcionales y globalmente (abundancia y biomasa). Así, las lombrices de tierra se consideran bioindicadoras de impactos ambientales en entornos rurales asociados al laboreo o a la contaminación del suelo (Paoletti et al., 1999).

El tipo y la cantidad de fertilizante orgánico aplicado también puede afectar a la comunidad de lombrices de tierra (Koblentz et al., 2005; Murchie et al., 2015), por lo que la evaluación de los impactos sobre esta comunidad tras un uso continuado resulta ser de interés. En estudios previos, principalmente en pastizales, se ha observado que los purines: (i) tienen efectos tóxicos transitorios (por su contenido en N amoniacal y otras sales) sobre las lombrices de tierra de hábito superficial (Curry, 1976), (ii) tienen un efecto positivo pero inferior al del estiércol debido a su menor contenido en MO (Timmerman et al., 2006), (iii) con aplicaciones a dosis elevadas, podrían reducir la biomasa y abundancia de lombrices de tierra (Edwards y Lofty, 1982; Hansen y Engelstad, 1999; Paoletti et al., 1999), (iv) impactan de manera diferencial según el método de aplicación (superficial o inyección) utilizado (De Goede et al., 2003), (v) aplicados en dosis crecientes (tanto de bovino como de porcino) afectan de manera distinta a las comunidades de lombrices de tierra (Koblentz et al., 2015; Murchie et al., 2015), (vi) pueden afectar al crecimiento de la población de lombrices de tierra y éste puede estar limitado por el enriquecimiento de Cu y Zn (Murchie et al., 2015).

Por lo tanto, el estudio de distintos variables asociados a la presencia de lombrices de tierra podría ser interesante para detectar zonas donde la calidad del suelo esté en riesgo debido a la sobrefertilización. Este estudio se desarrolló bajo un ambiente Mediterráneo semiárido, en un sistema cerealístico de agricultura de secano y en una campaña en barbecho. El objetivo fue evaluar el efecto de la fertilización precedente (mantenida 12 años) con purín porcino de diferentes orígenes (PE y PM) sobre la población de lombrices de tierra, tanto a nivel taxonómico (composición de especies) como global (abundancia y biomasa).

La hipótesis de investigación es que la abundancia, biomasa y diversidad de especies de lombrices de tierra podrían ser bioindicadoras de prácticas de sobrefertilización con purines y que además, la afectación sería diferente según el origen del purín porcino (cerdo de engorde o de madres reproductoras).

3.2 Materiales y métodos

El estudio se ubicó en el NE de España, en una zona caracterizada por un clima Mediterráneo semiárido (MAPA, 1989) y con precipitaciones y temperatura medias anual de 370 mm y 13°C, respectivamente. La altitud es 443 m s. n. m. y las coordenadas del ensayo son 41°52'29"N, 1°09'10"E. El suelo se clasifica como Typic Xerofluvent (Soil

Survey Staff, 2014). El horizonte superficial (0-0,30 m) presenta un pH (potenciometría, 1:2,5; suelo: agua destilada) de 8,2; una conductividad eléctrica (1:5; suelo: agua destilada, 25°C) de 0,18 dS m⁻¹; un contenido de materia orgánica medio de 20,1 g kg⁻¹ (método de Walkley y Black) y de carbonato de calcio equivalente de 300 g kg⁻¹ (método de calcímetro de Bernard). La textura (clasificación USDA) es franco limosa: 131 g kg⁻¹ arena, 609 g kg⁻¹ limo y 260 g kg⁻¹ arcilla (método de la pipeta).

El campo experimental se dedica al cultivo de cereales de invierno en rotación: cebada (*Hordeum vulgare* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.), en condiciones de secano con algún año en barbecho, como en el año del presente estudio (campaña 2016–2017). La paja se recolecta y empaca tras la cosecha (julio), y el rastrojo se entierra a final del verano (septiembre) mediante laboreo con rastras de discos (~0,15 m). Las diferentes estrategias de abonado previas a este estudio incluyeron, durante doce años, purín de cerdo de engorde (PE), de madres reproductoras (PM) y la de fertilización mineral (FM). El presente estudio se centra en siete tratamientos (se incluyen las equivalencias en cantidad de N aplicado durante la campaña 2015–16): un tratamiento con fertilización mineral que actúa como control (0–FM, en cobertera como nitrato amónico cálcico); tres dosis de PE (en peso fresco) que fueron de 30 t ha⁻¹ año⁻¹ (30PE–0 aplicado en pre-siembra), 40 y 60 t ha⁻¹ año⁻¹ (0–40PE y 0–60PE respectivamente, aplicados en macollaje de cereales 21–24 de la escala decimal Zadoks et al., 1974), dos dosis de PM (en peso fresco) que fueron de 60 y 90 t ha⁻¹ año⁻¹ (0–60PM y 0–90PM respectivamente), aplicados en cobertera y un tratamiento donde se combinó la aplicación de PE en pre-siembra a dosis de 30 t ha⁻¹ año⁻¹ con PM en cobertera a dosis de 90 t ha⁻¹ año⁻¹ (30PE–90PM). Las equivalencias de las dosis en cantidad de N aplicado durante la campaña 2015–2016, previa al muestreo, se describen en la Tabla 3.1. Esta campaña las producciones (grano sobre materia seca) oscilaron entre 5217 kg ha⁻¹ (FM) y 6062 kg ha⁻¹ (30PE–90PM) con un promedio de 5730 kg ha⁻¹ (±314, desviación estándar) en las aplicaciones con purines. Los purines se aplicaron mediante el método habitual de placa de salpicadura (en abanico).

El diseño experimental consistió en bloques completos de parcelas al azar, con tres repeticiones para cada tratamiento de fertilización. Las parcelas tenían una superficie de 274 m² (11 m de ancho y 25 m de largo) excepto el tratamiento mineral que contaba con una superficie de 174 m² (7 m de ancho y 25 m de largo).

El muestreo de lombrices de tierra se realizó el 16 de marzo de 2017, tras 13 y 17 meses después de la última aplicación de fertilizante en cobertera y pre-siembra,

respectivamente. El último laboreo de suelo se realizó con un pase de grada de discos en octubre de 2016 para el control de las malas hierbas. La elección de la época de muestreo, final de invierno e inicio de primavera, se basó en las recomendaciones de Pérès et al. (2014), por considerarse el periodo activo de esta población. El contenido medio de agua en el suelo se cuantificó en el muestras y fue igual al 16% (p/p, humedad gravimétrica). Las lombrices de tierra se extrajeron siguiendo el protocolo de muestreo de la norma española UNE-ISO 23611-1 (AENOR, 2009). El procedimiento técnico consistió en la excavación de monolitos de suelo (0,25 m x 0,25 m) hasta una profundidad de 0,20 m. Las lombrices se recogieron manualmente, se lavaron con agua y conservaron inmediatamente en etanol (70%) previa la fijación con formaldehído (AENOR, 2009). Se obtuvieron un total de 21 muestras de suelo.

Tabla 3.1. Descripción de los diferentes tratamientos de fertilización mantenidos durante los 12 años del experimento y las dosis de N total aplicadas en la campaña 2015–2016 previa al muestreo.

Tratamientos ^a	Aplicación anual de fertilizantes		N total aplicado kg N ha ⁻¹ año ⁻¹
	Pre-siembra	Cobertera	
0-FM	0	FM	120
0-40PE	0	40PE	265
0-60PE	0	60PE	506
0-60PM	0	60PM	177
0-90PM	0	90PM	259
30PE-0	30PE	0	103
30PE-90PM	30PE	90PM	355

^a FM, fertilización mineral; PE, purín de cerdo de engorde, los números indican las dosis teóricas de aplicación en peso fresco: 30 t purín ha⁻¹ año⁻¹ aplicado en pre-siembra, 40 y 60 t purín ha⁻¹ año⁻¹ aplicado en cobertera; PM, purín de cerdo de maternidad aplicado en cobertera, los números indican las dosis de aplicación en peso fresco: 60 y 90 t purín ha⁻¹ año⁻¹; 30PE-90PM con aporte combinado de purín de cerdo de engorde (pre-siembra) y maternidad (cobertera) a dosis de 30 y 90 t purín ha⁻¹ año⁻¹, respectivamente.

La caracterización de la comunidad de lombrices de tierra se realizó a dos niveles: (i) nivel taxonómico, que incluyó la identificación de las especies (número de especies) por la morfología externa de los especímenes adultos (Pérez y Rodríguez, 2008), (ii) nivel global, en el que se cuantificó la abundancia (individuos m⁻²) de juveniles y adultos y se calculó la abundancia total como la suma, considerando las lombrices enteras (cuando estaban cortadas, solo se contaba la parte anterior), y la biomasa total (g m⁻²) donde el peso de los especímenes presentes en las muestras y preservados en etanol (o de sus fracciones) se consideró equivalente al peso fresco.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el programa SAS (SAS Institute, 2002-2012). Se realizó un análisis de varianza (acrónimo en inglés ANOVA). Las mediciones incluidas en el nivel global se normalizaron previamente al análisis ANOVA mediante la transformación raíz cuadrada.

3.3 Resultados y discusión

A nivel taxonómico se identificaron dos especies de lombrices de tierra (Figuras 3.1, 3.2). La primera especie encontrada, *Koinodrilus roseus* (Savigny, 1826) ha sido descrita por distintos autores, por lo que presenta distintas sinonimias: *Allobophora rosea* (Pop, 1948; Gerar, 1964; Alvarez, 1971; Bouché, 1972), *Aporrectodea rosea* (Gates, 1976; Sims y Gerar, 1985), *Enterion roseum* (Savigny, 1826), *Eisenia rosea* (Michaelson, 1900; Gates, 1974), *Allolobophora rosea* (Savigny, 1826), este último mencionado en la publicación de Lainez y Jordana (1987). Pertenece al grupo de las especies endogeicas. La segunda especie encontrada, *Nicodrilus trapezoides* (Dugés, 1828) también presenta distintas sinonimias: *Allolobophora trapezoides* (Rosa, 1886), *Allolobophora calaginoza trapezoides* (Alvarez, 1971), *Nicodrilus caliginosus meridionalis* (Bauché, 1972). Pertenece al grupo de las especies anécicas.

Las especies de la familia Lumbricidae son consideradas como ingenieros del ecosistema, por las actividades de bioturbación que benefician los servicios ecosistémicos del suelo (Jones et al., 1994) y han sido utilizadas en biomonitorización de la calidad del suelo (Tischer, 2008). Las especies observadas (*K. roseus* y *N. trapezoides*) son típicas de tierras cultivadas y han sido descritas en campos de cultivos y pastizales en diversas zonas españolas (Hernández et al., 2003; Lainez y Jordana, 1987; Pérez y Rodríguez, 2008; Pérez y Rodríguez, 2009). Las lombrices identificadas *K. roseus* y *N. trapezoides*, son morfológica y funcionalmente distintas (Figura 3.1, 3.2), destacando la diferencia del tamaño del cuerpo. Estos aspectos son de relevancia porque contribuyen de manera diferenciada en la bioturbación del suelo (Piron et al., 2017) ya que las endogeicas forman amplios sistemas de madrigueras horizontales, mezclando fragmentos de materia orgánica con la fracción mineral del suelo (son comedoras de suelo), mientras que las anécicas forman galerías verticales que facilitan el transporte de agua y nutrientes (u otras sustancias químicas) hacia capas más profundas.

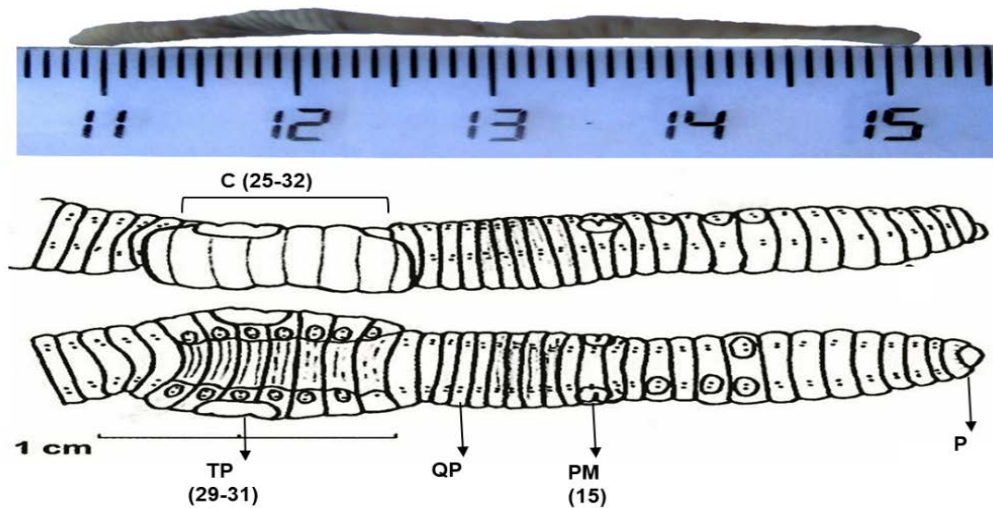


Figura 3.1. Características de diagnóstico (1) y generales (2) de la especie *Koinodrilus roseus*. (1) quetas pareadas (QP), poros masculinos (PM) en el segmento 15, pigmentación dorsal sin bandas, prostomio (P) epilóbico cerrado, clitelo (C) del 25–32, tubérculos pubertarios (TP) 29–31, primer poro dorsal en 4/5, coloración rosa en vivo (2) número de segmentos del cuerpo 120–165, longitud 25–70 mm, anchura 2–4 mm, poros nefridianos en la línea área B cerca de la línea b de quetas, poros de espermatecas en los surcos intersegmentarios 9/10 y 10/11 área D, poróforos en general si rebasar el segmento 15. Fotos dorsales y ventrales fueron adaptadas de Pérez y Rodríguez (2008).

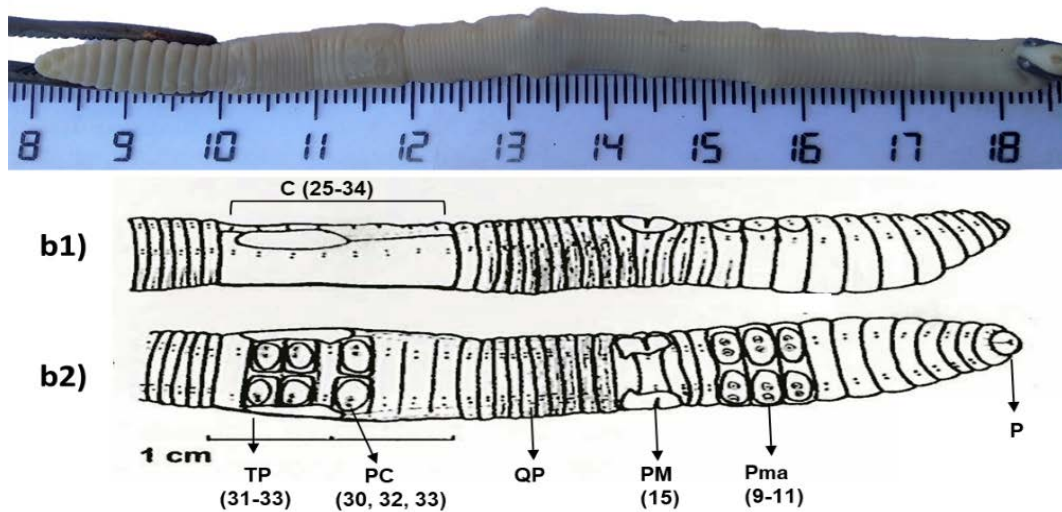


Figura 3.2. Características de diagnóstico (1) y generales (2) de la especie *Nicodrilus trapezoides*. (1) Quetas pareadas (QP), poros masculinos (PM) en el segmento 15, pigmentación dorsal sin bandas, prostomio (P) epilóbico cerrado, clitelo (C) del 25–34, tubérculos pubertarios (TP) 31–33 sin estrechamiento en 32, papilas mamelonares (Pma) en los segmentos 9–11, papilas clitelares (PC) en la quetas ab de 30, 32 y 33, primer poro dorsal en 7/8 o 8/9 o 9/10 pigmentación dorsal parda (2) número de segmentos del cuerpo 122–188, longitud 55–148 mm, anchura 3–5 mm, poróforos $\frac{1}{2}$ 14– $\frac{1}{2}$ 16. Fotos dorsales y ventrales fueron adaptadas de Pérez y Rodríguez (2008).

Nuestros resultados muestran una baja diversidad de lombrices (2 especies identificadas) de manera similar a otros estudios en suelos agrícolas del Mediterráneo (Andriuzzi et al., 2017; Baldivieso-Freitas et al., 2018). De hecho, según Rutgers et al. (2016), en condiciones Mediterráneas semiáridas es característico encontrar 2-3 taxones y ello se explica porque las bajas precipitaciones y el bajo contenido de materia orgánica les afectan negativamente. Además, en comparación con pastizales, la diversidad disminuye con la intensificación agrícola (Curry, 2004; Rutgers et al., 2016).

Tabla 3.2. Análisis de varianza de los datos normalizados (transformación raíz cuadrada) de la abundancia (juveniles, adultos e individuos totales) y de la biomasa de lombrices de tierra para los diferentes tratamientos de fertilización.

Tratamientos	Abundancia de lombrices (individuos m ⁻²)						Biomasa de lombrices (g m ⁻²)		
	Juveniles		Adultos		Total				
ANOVA	GI	CM	P	CM	P	CM	P	CM	P
Entre tratamientos	6	13,53	0,26	16,99	0,11	26,37	0,16	9,87	0,30
Entre bloques	2	17,32	0,19	5,76	0,49	21,88	0,25	0,001	0,99
Dentro de tratamientos	12	9,10		7,51		13,93		7,17	

^a GI = grados de libertad, CM = cuadrados medios, P = valor de probabilidad.

Tabla 3.3. Valores medios y error estándar de la abundancia (juveniles, adultos e individuos totales) y biomasa de lombrices de tierra^a para los diferentes tratamientos de fertilización.

Tratamientos ^b	Abundancia de lombrices (individuos m ⁻²)			Biomasa de lombrices (g m ⁻²)
	Juveniles	Adultos	Total	
0-FM	21 ± 14 (4)	27 ± 14 (4)	48 ± 24 (6)	9,0 ± 4,8 (2,4)
0-40PE	69 ± 23 (8)	21 ± 5 (5)	90 ± 28 (9)	18,2 ± 6,0 (4,1)
0-60PE	37 ± 30 (5)	21 ± 21 (3)	58 ± 51 (6)	15,8 ± 15,3 (2,6)
0-60PM	64 ± 9 (8)	69 ± 19 (8)	133 ± 23 (11)	44,4 ± 16,1 (6,4)
0-90PM	64 ± 32 (8)	37 ± 11 (6)	101 ± 38 (10)	37,5 ± 13,1 (6,0)
30PE-0	101 ± 46 (10)	96 ± 28 (10)	197 ± 70 (14)	53,5 ± 25,3 (6,9)
30PE-90PM	37 ± 14 (6)	27 ± 5 (5)	64 ± 16 (8)	23,4 ± 15,5 (4,3)

^a Los números entre paréntesis corresponden a los datos normalizados mediante la transformación de la raíz cuadrada.

^b FM: fertilización mineral; PE: purín de cerdo de engorde, los números indican las dosis teóricas: 30 t ha año⁻¹ aplicado en pre-siembra, 40 y 60 t ha año⁻¹ aplicadas en cobertera; PM: purín de cerdo de maternidad, los números indican las dosis de aplicación en cobertera: 60 y 90 t ha año⁻¹; 30PE-90PM con aporte de purín de cerdo de engorde (pre-siembra) y madres reproductoras (cobertera) a dosis de 30 y 90 t ha año⁻¹, respectivamente.

La especie endogeica *K. roseus* (Figura 3.1) fue la dominante y representó entre el 80 y 100% de los individuos (Figura 3.3), independientemente de la naturaleza del fertilizante (orgánico o mineral). Por otra parte, la especie anécica *N. trapezoides* (Figura 3.2), además de minoritaria, no se registró en los tratamientos 0–40PE y 0–60PE (Figura 3.3). Cuando el material orgánico se entierra, las anécicas tienen desventajas (por la competencia por recursos alimenticios) frente a la endogeicas (Capowiez et al., 2009). No obstante, ello no explica la ausencia de *N. trapezoides* en 0–40PE y 0–60PE ya que la incorporación de residuos de cosecha es similar para todos los tratamientos. Las mayores aportaciones de N en estos tratamientos (265 y 506 kg N ha⁻¹), tampoco justifican la desaparición de *N. trapezoides* ya que cuando la aportación se realiza como PM a dosis de 259 kg N ha⁻¹ (0–90PM) o incluso combinada con PE a dosis de 355 kg N ha⁻¹ (30PE–90PM), la especie sigue presente (Figura 3.3). Estos resultados indican la existencia de otros componentes diferenciales asociados al origen del purín que inciden sobre las especies y que no han sido analizados. Así, *K. roseus*, ha sido descrita como tolerante a distintas perturbaciones edáficas (Koblenz et al., 2015; Murchie et al., 2015) por lo que la expresión de esta tolerancia concuerda con nuestros resultados ya que esta especie está presente en todos los tratamientos (Figura 3.3).

La abundancia registrada (Figura 3.4) es la característica de zonas Mediterráneas de secano que suele oscilar entre 5–200 individuos m⁻² (Rutgers et al., 2016). La abundancia (total y de las formas juveniles y adultas), así como la biomasa, no variaron significativamente con la aplicación, durante 12 años, de los distintos tratamientos de fertilización (Tabla 3.2).

En general, los tratamientos asociados a la fertilización orgánica previa presentaron, respecto a la fertilización mineral (0–FM), valores de abundancia total entre un 21 a un 310% superiores (rango de 48 a 197 individuos m⁻²), y también superiores (entre 68 a 494%) en biomasa (rango de 9,0 a 53,5 g m⁻²) (Tabla 3.3). Estas diferencias se observaron tanto en las formas adultas como en las juveniles (Tabla 3.3).

La tendencia mostrada en las variables evaluadas en la fertilización con purines respecto a la mineral se explicaría porque las aplicaciones a largo plazo de fertilizantes orgánicos incrementan las fuentes de alimentos (nutrientes y MO), beneficiando directamente e indirectamente (v.g. mejora de la estructura y porosidad, favoreciendo su hábitat) a la comunidad de lombrices de tierra (Biau et al., 2012; Baldivieso-Freitas et al., 2018) lo que repercute en un incremento de la abundancia y la biomasa (Hansen y Engelstad, 1999; Baldivieso-Freitas et al., 2018).

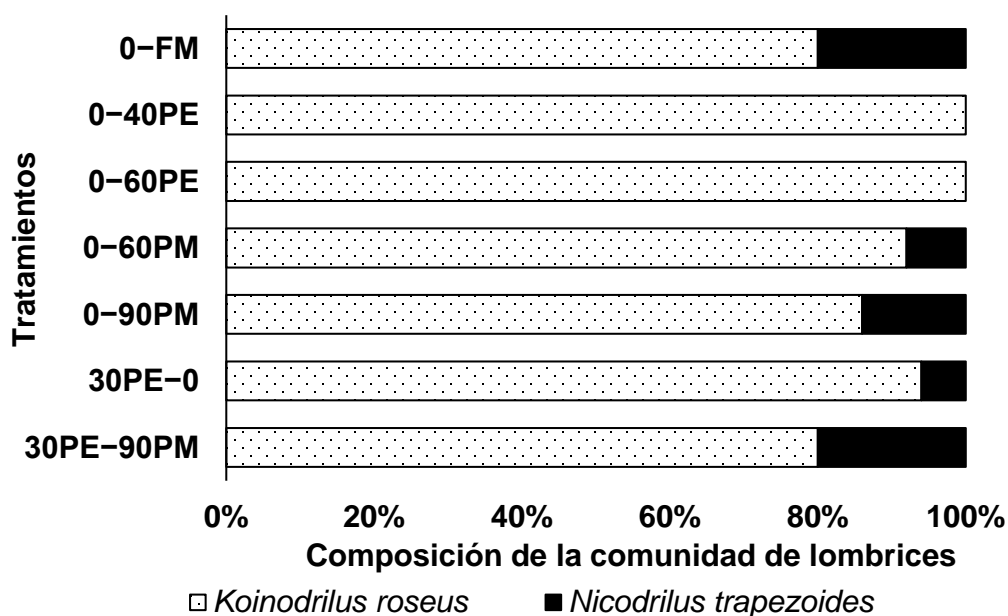


Figura 3.3. Composición porcentual de las dos especies de lombrices de tierra según los distintos tratamientos de fertilización: FM, fertilización mineral; PE, purín de cerdo de engorde, los números indican las dosis teóricas en peso fresco aplicadas: 30 t ha⁻¹ año⁻¹ aplicado en pre-siembra, 40 y 60 t ha⁻¹ año⁻¹ aplicado en cobertera; PM, purín de cerdo de maternidad aplicado en cobertera, los números indican las dosis en peso fresco aplicadas: 60 y 90 t ha⁻¹ año⁻¹; 30PE-90PM con aporte combinado de purín de cerdo de engorde (pre-siembra) y madres reproductoras (cobertera) a dosis de 30 y 90 t ha⁻¹ año⁻¹, respectivamente.

El estudio confirma los efectos beneficiosos del purín de cerdo sobre la comunidad de lombrices de tierra a dosis de N próximas al umbral máximo (170 kg N año⁻¹ ha⁻¹ de origen orgánico) establecido para zonas susceptibles de contaminación de las aguas subsuperficiales por nitratos (Directiva 91/676/CEE, Unión Europea, 1991). El estudio también indica que el uso de dosis más elevadas de purín tiende a disminuir significativamente la abundancia y biomasa de lombrices ($P = 0,02$ y $P = 0,03$, respectivamente) (Figura 3.4) pero siempre con valores similares o por encima de la fertilización mineral. Varios autores (Curry, 1976; Hansen y Engelstad, 1999; Edwards, 2007; Koblenz et al., 2015) afirman que los efectos negativos de la sobrefertilización con purines sobre la comunidad de lombrices de tierra (menor abundancia y biomasa) están relacionados con el efecto tóxico del N-amoniaco y otras sales, pero que el estrés se produce generalmente a corto plazo (inmediato a la aplicación) y es transitorio, por lo que la población podría recuperarse si las aplicaciones no fueran frecuentes. Sin embargo, esto no se evidencia en este ensayo puesto que se ha evaluado la población de lombrices tras un periodo superior a los 12 meses desde la última aplicación de purín, y el

N-amoniacal en este tipo de suelo se transforma rápidamente en N-nítrico (Sánchez y González, 2005). Otros autores (Ma et al., 1990) asocian la sobrefertilización con la disminución del pH y consecuente efecto negativo en las lombrices. Pero en estudios previos, en este mismo experimento (Bosch-Serra et al., 2014), no se observaron cambios en el pH (permanecía entre 8,3–8,4) a dosis crecientes de purín porcino debido al alto poder tampón de los suelos ricos en carbonato de calcio.

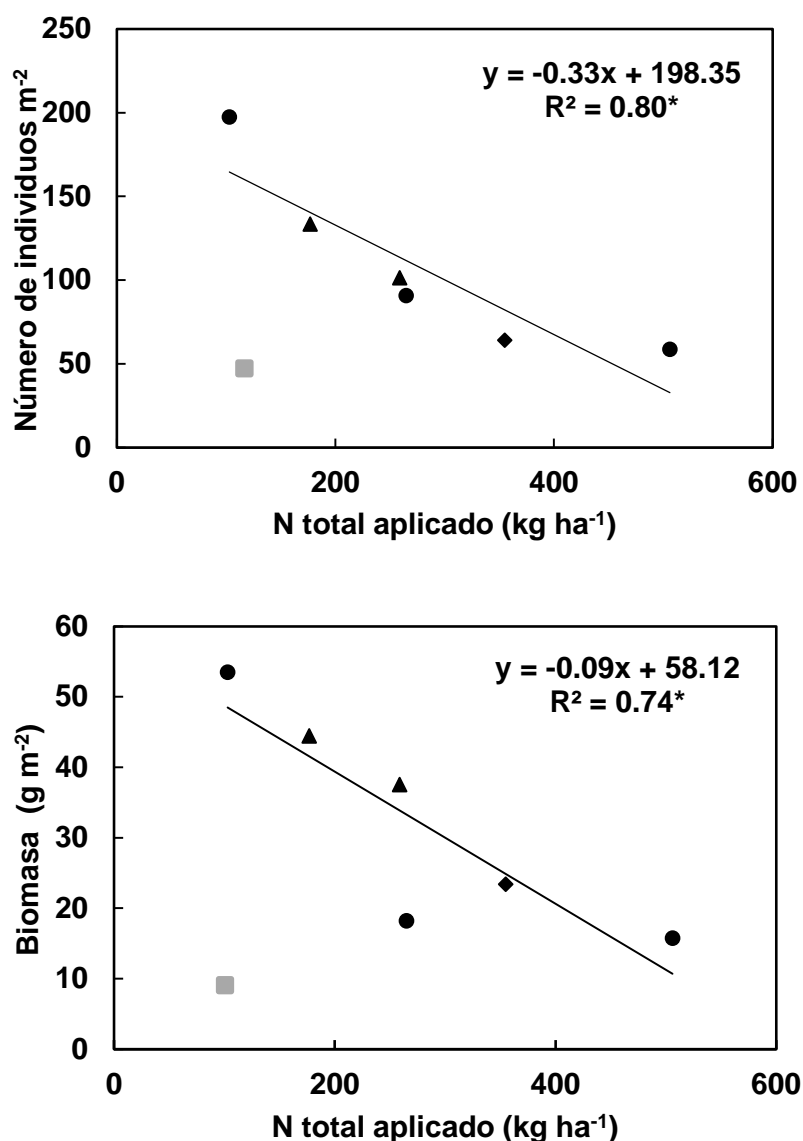


Figura 3.4. Relación entre la abundancia (individuos totales) y biomasa de lombrices de tierra y la dosis de N aplicada (* $P < 0,05$) cuando se fertiliza con purines. Se señalan las aplicaciones de N como fertilizante mineral (■), como purín de cerdo de engorde (●) en las que se incluye purín de madres reproductoras (▲) y la aplicación combinada de purín de engorde y madres (◆).

Por otro lado, una sobrefertilización con purines también implica riesgos ecotoxicológicos (De la Torre et al., 2000). Los metales pesados podrían acumularse en el suelo tras aplicaciones a largo plazo de purín y aunque no se alcanzasen niveles fitotóxicos (Berenguer et al., 2008), las lombrices de tierra podrían estar en riesgo (Becquer et al., 2005) debido a su hábito alimenticio (ingestión de suelo y MO). Esta situación podría darse incluso cuando los residuos orgánicos cumplieren con los requisitos para uso agrícola (Renaud et al., 2017). Estos potenciales riesgos ecotoxicológicos requerirían de mayor experimentación.

3.4 Conclusiones

En una situación de barbecho, tras doce años de fertilización con purín porcino y en relación a la fertilización mineral, la población de lombrices de tierra a nivel global (abundancia y biomasa) no experimenta cambios significativos. La abundancia total oscila entre 48 y 197 individuos m^{-2} y la biomasa entre 9 y 54 g m^{-2} . Se identificaron dos especies: *Koinodrillus roseus* que fue la dominante y *Nicodrillus trapezoides*. La especie *Nicodrillus trapezoides* no se detecta en los muestreos hasta 20 cm en condiciones de sobrefertilización histórica con PE.

La fertilización nitrogenada con dosis ajustadas de purín porcino, cualquiera sea su origen (PE o PM), presenta el mayor número de lombrices del suelo y diversidad, por lo que la dosis de N recomendada por la Unión Europea (170 kg N ha^{-1} $año^{-1}$ de fuentes orgánicas) para zonas clasificadas como vulnerables a la contaminación de las aguas subterráneas por nitratos, sería también la adecuada en relación a la prevención de riesgos ambientales ligados a la pérdida de diversidad edáfica. La ausencia de *N. trapezoides*, en los primeros 20 cm, puede considerarse un buen indicador de aportes excesivos de purines.

Serían necesarias futuras investigaciones para determinar los componentes del purín que impactan negativamente sobre las lombrices de tierra al incrementar las dosis aplicadas.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado con fondos del MINECO-INIA (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y

Alimentaria) a través del proyecto RTA2017-88-C3-3. Se agradece al Departamento de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Generalitat de Catalunya por su apoyo en el mantenimiento del campo experimental, al Dr. Antonio Pérez-Onteniente sus recomendaciones para la identificación de las especies, a Dyhia Boukirat de la Universidad Ibn-Khaldoun de Tiaret (Algeria) su apoyo en el procesado de las muestras y a Silvia Porras y Silvana Nacci por su apoyo en los trabajos de campo.

Referencias

- AENOR, 2009. Calidad del suelo, muestreo de invertebrados del suelo, Parte 1. Cribado manual y extracción con formol de lombrices. Norma UNE-EN ISO 23611-1:2009. Madrid (ES).
- Andriuzzi, W.S., Pulleman, M.M., Cluzeau, D., Pérès, G., 2017. Comparison of two widely used sampling methods in assessing earthworm community responses to agricultural intensification. *Appl. Soil Ecol.* 119, 145–151.
- Baldivieso-Freitas, P., Blanco-Moreno, J.M., Gutiérrez-López, M., Peigné, J., Pérez-Ferrer, A., Trigo-Aza, D., Sans, F.X., 2018. Earthworm abundance response to conservation agriculture practices in organic arable farming under Mediterranean climate. *Pedobiologia (Jena)* 66, 58–64.
- Becquer, T., Dai, J., Quantin, C., Lavelle, P., 2005. Sources of bioavailable trace metals for earthworms from a Zn-, Pb- and Cd-contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1564–1568.
- Berenguer, P., Cela, S., Santiveri, F., Boixadera, J., Lloveras, J., 2008. Copper and zinc soil accumulation and plant concentration in irrigated maize fertilized with liquid swine manure. *Agron. J.* 100, 1056–1061.
- Biau, A., Santiveri, F., Mijangos, I., Lloveras, J., 2012. The impact of organic and mineral fertilizers on soil quality parameters and the productivity of irrigated maize crops in semiarid regions. *Eur. J. Soil Biol.* 53, 56–61.
- Bosch-Serra, À.D., Padró, R., Boixadera-Bosch, R.R., Orobitg, J., Yagüe, M.R., 2014. Tillage and slurry over-fertilization affect oribatid mite communities in a semiarid Mediterranean environment. *Appl. Soil Ecol.* 84, 124–139.
- Capowiez, Y., Cadoux, S., Bouchant, P., Ruy, S., Roger-Estrade, J., Richard, G., Boizard, H., 2009. The effect of tillage type and cropping system on earthworm communities, macroporosity and water infiltration. *Soil Tillage Res.* 105, 209–216.
- Curry, J., 1976. Some effects of animal manures on earthworms in grassland. *Pedobiologia.* 16, 425–438.
- Curry, J., 2004. Factors affecting the abundance of earthworm in soils. In: Edwards, C. *Earthworm Ecology*. 2 ed. United State of America: CRC Press; p. 91–114.
- De Goede, R.G.M., Brussaard, L., Akkermans, A.D.L., 2003. On-farm impact of cattle slurry manure management on biological soil quality. *NJAS - Wageningen J. Life Sci.* 51, 103–133.
- De la Torre, A.I., Jiménez, J.A., Carballo, M., Fernandez, C., Roset, J., Muñoz, M.J., 2000. Ecotoxicological evaluation of pig slurry. *Chemosphere* 41, 629–1635.
- Edwards, C., 2007. Edwards ecology in cultivated soils. In: Satchell, J., editor. *Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture*. United State of America: Chapman and Hall; p. 123–138.
- Edwards, C.A., Lofty, J.R., 1982. Nitrogenous fertilizers and earthworm populations in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 14, 515–521.
- Hansen, S., Engelstad, F., 1999. Earthworm populations in a cool and wet district as affected by tractor traffic and fertilisation. *Appl. Soil Ecol.* 13, 237–250.

- Hernández, P., Gutiérrez, M., Ramajo, M., Trigo, D., Díaz Cosín, D.J., 2003. Horizontal distribution of an earthworm community at El Molar, Madrid (Spain). *Pedobiologia (Jena)* 47, 568–573.
- Jones, C., Lawton, J., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*. 69, 373–386.
- Koblentz, B., Tischer, S., Rücknagel, J., Christen, O., 2015. Influence of biogas digestate on density, biomass and community composition of earthworms. *Ind. Crops Prod.* 66, 206–209.
- Lainez, C., Jordana, R., 1987. Contribución al conocimiento de los Oligoquetos (Oligochaeta, Lumbricidae) de Navarra. *Publicaciones de biología de la Universidad de Navarra (Serie Zoológica)* 15, 1–80.
- Ma, W.C., Brussaard, L., de Ridder, J.A., 1990. Long-term effects of nitrogenous fertilizers on grassland earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae): Their relation to soil acidification. *Agric. Ecosyst. Environ.* 30, 71–80.
- Manono, B., 2016. Agro-ecological role of earthworms (Oligochaetes) in sustainable agriculture and nutrient use efficiency: a review. *J. Agric. Ecol. Res. Int.* 8, 1–18.
- MAPA, 1989. Caracterización agroclimática de la provincia de Lérida. Madrid (ES): Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones.
- Murchie, A.K., Blackshaw, R.P., Gordon, A.W., Christie, P., 2015. Responses of earthworm species to long-term applications of slurry. *Appl. Soil Ecol.* 96, 60–67.
- Paoletti, M.G., 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agric. Ecosyst. Environ.* 74, 137–155.
- Pérès, G., Cluzeau, D., Hotte, H., Delaveau, H., 2014. Earthworms. In : ADEME, editor. *Bioindicators. Biological tools for soil quality assessment. France (Fr): ADEME, FranceTool Worksheet N° 6.*
- Pérez, A, Rodríguez, C., 2008. *Lombrices de tierra de la Comunitat Valenciana.* Valencia (ES): Generalitat Valenciana (Conselleria de Medi Ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge).
- Pérez, A., Rodríguez, C., 2009. Fauna de lombrices de tierra de las zonas nordeste y suroeste de la Provincia de Albacete. *SABUCO* 7, 203–234.
- Piron, D., Boizard, H., Heddadj, D., Pérès, G., Hallaire, V., Cluzeau, D., 2017. Indicators of earthworm bioturbation to improve visual assessment of soil structure. *Soil Tillage Res.* 173, 53–63.
- Renaud, M., Chelinho, S., Alvarenga, P., Mourinha, C., Palma, P., Sousa, J.P., Natal-da-Luz, T., 2017. Organic wastes as soil amendments – Effects assessment towards soil invertebrates. *J. Hazard. Mater.* 330, 149–156.
- Rutgers, M., Orgiazzi, A., Gardi, C., Römbke, J., Jänsch, S., Keith, A.M., Neilson, R., Boag, B., Schmidt, O., Murchie, A.K., Blackshaw, R.P., Pérès, G., Cluzeau, D., Guernion, M., Briones, M.J.I., Rodeiro, J., Piñeiro, R., Cosín, D.J.D., Sousa, J.P., Suhadolc, M., Kos, I., Krogh, P.H., Faber, J.H., Mulder, C., Bogte, J.J., va Wijnen, H.J., Schouten, A.J., de Zwart, D., 2016. Mapping earthworm communities in Europe. *Appl. Soil Ecol.* 97, 98–111.

- Sánchez, M., González, J.L., 2005. The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation. *Bioresour. Technol.* 96, 1117–1123.
- SAS Institute, 2001. The SAS/TAT system for Windows. Release 8.2. SAS Inst., Cary, NC.
- Soil Survey Staff, 2014. Keys to soil taxonomy. 12th ed. Washington, DC. (US): U. S. Gov. Print. Office.
- Timmerman, A., Bos, D., Ouwehand, J., de Goede, R.G.M., 2006. Long-term effects of fertilisation regime on earthworm abundance in a semi-natural grassland area. *Pedobiologia* 50, 427–432.
- Tischer, S., 2008. Lumbricidae communities in soil monitoring sites differently managed and polluted with heavy metals. *Pol. J. Ecol.* 54, 635–646.
- Unión Europea, 1991. Directiva del Consejo (91/676/CEE) de 12 de diciembre de 1991 relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura. DOCE. L375, 1–8.
- Unión Europea, 2013. Reglamento (UE) No 1306/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013 sobre la financiación, gestión y seguimiento de la Política Agrícola Común, por el que se derogan los Reglamentos (CE) n° 352/78, (CE) n° 165/94, (CE) n° 2799/98, (CE) n° 814/2000, (CE) n° 1290/2005 y (CE) n° 485/2008. DOCE. L347, 549–607.
- Unión Europea, 2018. Eurostat. Número de cerdos en la UE-27. [acceso 2018 Nov 15] <https://ec.europa.eu/eurostat/tgm/table.do?tab=table&plugin=0&language=en&pcod e=tag00018>.
- Yagüe, M.R., Bosch-Serra, À.D., Boixadera, J., 2012. Measurement and estimation of the fertiliser value of pig slurry by physicochemical models: Usefulness and constraints. *Biosyst. Eng.* 111, 206–216.
- Zadoks, J., Chang, T., Konzak, C., 1974. A decimal growth code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14, 415–421.

Capítulo 4

Earthworm community and soil microstructure changes with long-term organic fertilization

Este capítulo se halla en revisión en Archives of Agronomy and Soil Science

Earthworm community and soil microstructure changes with long-term organic fertilization

Abstract

Organic waste recycling as fertilizer can affect soil quality. The aim of this study was to evaluate the effects of organic fertilizers: sludge compost with agricultural waste (SC) in two rates (4.4 and 8.7 t ha⁻¹) and pig slurry (PS, 27 t ha⁻¹) on soil quality, in the framework of a long-term fertilization field experiment (19-year-old) in a Mediterranean semiarid rainfed system. The organic treatments were compared with mineral fertilization (MF) plus a control treatment (no N fertilization). Soil microstructure and types of voids, earthworm community and its bioturbation (classified according to the presence of biostructures: burrows and casts) were studied using micromorphological methods. Two earthworm species, *Koinodrilus roseus* and *Nicodrilus trapezoides* were identified; however, *N. trapezoides* was not present in the SC treatments. Earthworm abundance and biomass were not affected by fertilization. The application of PS resulted in increased bioturbation associated with earthworm activity, improved soil microstructure (crumb type) and increased the biopore presence (compound packing voids) which led to a better incorporation of the residues into the soil. By contrast, the control and MF plots showed a platy to massive microstructure with an absence of faunal chambers. In SC plots, non-mixed soil-organic materials were observed and soil vughs were not visible. Composition differences between SC and PS and the total amount of OM applied may have had an impact on the activity and species of earthworms; such changes can be an early indicator of further potential impacts on soil quality which need to be validated.

Keywords: dryland agricultural system, pig slurry, sludge compost, soil bioturbation, soil micromorphology.

Abbreviations: CO, control; DM, dry matter; MF, mineral fertilizer, OM, organic matter; PS, pig slurry; SC, sewage sludge compost.

4.1 Introduction

In semiarid Mediterranean agricultural systems, the application of organic fertilizers has focused on strategies to improve productivity, particularly on the efficient use of nitrogen (Bosch-Serra et al., 2015). However, the use of urban and agricultural/livestock organic wastes as such fertilizers should be based on objective criteria to maintain soil quality (Kibblewhite et al., 2008) and its productive potential as part of sustainable agriculture (Singh, 2018). Therefore, it is necessary to consider that repeated applications of organic fertilizers in long term together with different quality or characteristics (e.g. C:N ratio, nutrient content, heavy metals and/or organic pollutants) could affect the quality of the soil (Gómez-Muñoz et al., 2017).

Spain is the first producer of pork in the European Union (European Union, 2018; 30 million pigs yearly), high volumes of pig slurry (PS) produced and mainly used as fertilizer integrated in management plans. The PS is characterized by high nutrient content, mainly as ammonium-N; a low C:N ratio and some amounts of heavy metals (mainly Cu and Zn) that can vary according to the feeding and sanitary status of the animal in intensive production (Sanchez and Gonzalez, 2005; Yagüe et al., 2012).

The present and future increase of human population goes hand in hand with the availability of a solid sewage sludge resulting from different treatment processes (Sharma et al., 2017). This sewage sludge for agricultural use purposes could face technical problems or have a limited use because of its pollutant load (i.e. pathogenic microorganisms, organic compound and heavy metals) (Alvarenga et al., 2015, 2017), since its agricultural use has been regulated (86/278/EEC, European Union, 1986; RD 1310/1990, MAPA,1990). The sewage sludge is commonly used as a co-substrate composted with others organic residues derived from forestry or agricultural wastes (i.e. tree bark, sawdust, wood chip), namely sludge compost (SC). This composting process improves its quality as it reduces its water content, decreases contamination with pathogenic microorganisms by stabilization of the product and dilutes heavy metal content (Gomez, 1998; Alvarenga et al., 2015; Onwosi et al., 2017; Asses et al., 2018). The SC is an organic fertilizer with high C content (Gómez-Muñoz et al., 2017; Głąb et al., 2018) and its application increases organic matter in soil (Paetsch et al., 2016). Nevertheless, Renaud et al. (2017) demonstrated that contaminant concentrations required by current legislation might not be properly translated into the expected potential effects on soil quality (e.g. soil biology effects).

The evaluation of soil quality is complex. Bioindicators can be used, such as soil earthworms (Shepherd et al., 2008), because of their limited mobility and high sensitivity to changes in the soil properties which are generated by modifications in agricultural practices or by the introduction of contaminants (Paoletti, 1999). Application of organic fertilizers generally affects the biological activity of the soil (Yagüe et al., 2016; Sharma et al., 2017) and in particular the earthworm population (Pérès et al., 2011; Murchie et al., 2015). The earthworms have a key role in the sustainability of the agrarian system (Singh, 2018). This fact is mainly because they intervene in the decomposition of organic matter, in the flow of water, nutrients and gases in the soil, besides their contribution to the formation of structure and their improvement of soil porosity: size, distribution and pore network connectivity and its morphology (Blouin et al., 2013; Schon et al., 2017).

The reciprocal relationship between fauna and soil structure has been well recognized (Kooistra and Pulleman, 2001) and its study using micromorphological techniques, by the microscopical analysis of thin sections, has been applied for a long time (Bal, 1970; Koistra, 1991). These studies include the description and quantification of different excremental types (from enchytraeids, oribatid, beetles, diptera larvae and earthworms) and other pedofeatures (plant fragments and void space) showing its utility to the interpretation of structural changes associated to faunal activities (Bruneau et al., 2004, 2005; Davidson et al., 2002, 2004; Davidson and Gravie, 2006).

Others authors estimated the soil porosity, either qualitatively (VandenBygaert et al., 2000) or quantitatively (Piron et al., 2012; Sauzet et al., 2017) as a result of the earthworm activity at soil micromorphology scale in thin sections. Recently, Dominguez-Haydar et al., (2018) combined the quantification of different taxonomic groups at a class level (e.g. Oligochaeta, Chilopoda and Diplodopa) and soil macroaggregate types, and related them with changes on the observed bioturbation (no quantified) in thin sections from rehabilitated coal mine technosols revegetated with diverse native plants and grasses.

On the other hand, at the profile scale, Piron et al. (2012, 2017) developed a method for visual and morphological description of soil structure patterns produced by earthworm bioturbation in soils. This bioturbation is related to two types of biostructures: the burrows (formed by excavation or by the redistribution of the soil material caused by its own displacement) and the excrements or casts (which are ovoid granules produced by the ingestion of soil and organic material that subsequently are excreted on the surface or below it) (Lee and Foster, 1991). Both bio-structures create different pore morphologies (Stoops, 2003): compound packing pores (i.e. voids between elementary soil particles or

aggregates), cavities in the form of stars, channels and chambers. The degree of alteration is influenced by the functional role of earthworms in the soil according to ecological groups: epigeic, endogeic and anecic (Bouché, 1972; Lamandé et al., 2003; Pérès et al., 2014). Piron et al. (2017) indicated that additionally to the main indicators currently used to describe soil structure (type of porosity and the size and appearance of aggregates), these new typologies seemed relevant and complementary to the typical indicators of the abundance and activity of earthworms.

The use of bioindicators linked to the earthworm communities (e.g. abundance, biomass, species richness, diversity) are sensitive to management changes and can provide information on soil quality (Paoletti, 1999; Ponge et al., 2013). In particular, management practices as the incorporation of organic wastes containing specific compounds, when applied as fertilizers for a long term, could bring about the accumulation of such compounds with threshold risks for the soil organisms.

The combination of both methodologies: the use of bioindicators linked to earthworm communities (abundance, biomass and classification at species and functional group level) and its effect on soil bioturbation (observation of thin sections at micromorphological scale) can be a new procedure to evaluate biological activity and soil quality. Indeed, the current trends for the assessment soil quality promotes the use of innovative indicators that complement the use of analytical, visual and digital diagnostic tools (Bünemann et al., 2018).

A recent study conducted by D'Hose et al. (2018) shows that the evaluations of agricultural practices that affect soil biota, in Mediterranean conditions, have focused on soil tillage. Meanwhile, Bertrand et al. (2015) mention the scarcity of field data describing the response of earthworm populations to different organic amendments. This fact contrasts with wide information in relation with biological indicators as microorganisms and enzymatic activities after organic fertilizer application in reviews by Diacono and Montemurto (2010) and Sharma et al. (2017), using standard methodologies.

The hypothesis of this work assumes that the use of these biological indicators can be strengthened if they are combined with visible changes in the structure of the soil, specifically with the description of areas with biostructures produced by the activity of earthworms (burrows and casts) and the types of associated pores. This research aims to evaluate the influence of the long term application of organic fertilizers in the maintenance

of soil quality, through the use of the earthworm community and soil microstructure as indicators.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Experimental framework

This study is included in a long term fertilization research study that started in 1997, and was carried out during the cropping season (October – June) 2015/16. The experimental site is located in Agramunt, Lleida, Spain (41° 46' 31.7"N, 1° 5' 40"E). The area has a dry Mediterranean climate according to Papadakis classification (MAPA, 1989). During the 2015/16 period (August 2015 – July 2016), the average mean temperature was 14 °C (standard deviation, SD \pm 7 °C), the accumulated precipitation was 346 mm and the reference evapotranspiration was 1085 mm yr⁻¹ (Figure 4.1). This period was a representative one in terms of weather conditions. The characteristics of the top soil (0–0.25 m) were: loam texture (182 g clay kg⁻¹, 435 g silt kg⁻¹, 383 g sand kg⁻¹, Robinson pipette method), and the average gravimetric soil water content (Gupta and Wang, 2007) at permanent wilting point (–1500 kPa) and at field capacity (–33 kPa) were 6 \pm 0.9% (\pm SD) and 18 \pm 0.9% (\pm SD) (w/w), respectively. The soil is non-saline (electrical conductivity, EC 1:5 w/v; 0.18 dS m⁻¹), with a basic pH (potenciometry, pH 1:2.5 w/v) 8.2, and it is calcareous (Bernard calcimeter method, 270 g CaCO₃ kg⁻¹). The soil was classified as Typic Xerorthent (Soil Survey Staff, 2014).

The experimental field includes an annual rotation of winter cereals: wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.), except in the 2013/14 season when the crop was rapeseed (*Brassica napus* L.) under rainfed conditions. Grain yield averages in the last twelve cropping seasons were similar for MF, PS and SC treatments, and they oscillated between 3150 and 3500 kg ha⁻¹. Seeding is done in October – November and harvest is June – July. Straw is removed from fields according to farmers' practice. The agricultural practices correspond to a rainfed agricultural system, which includes the incorporation of fertilizers (disc-harrowing, ~0.15 m depth) within 24h after their application.

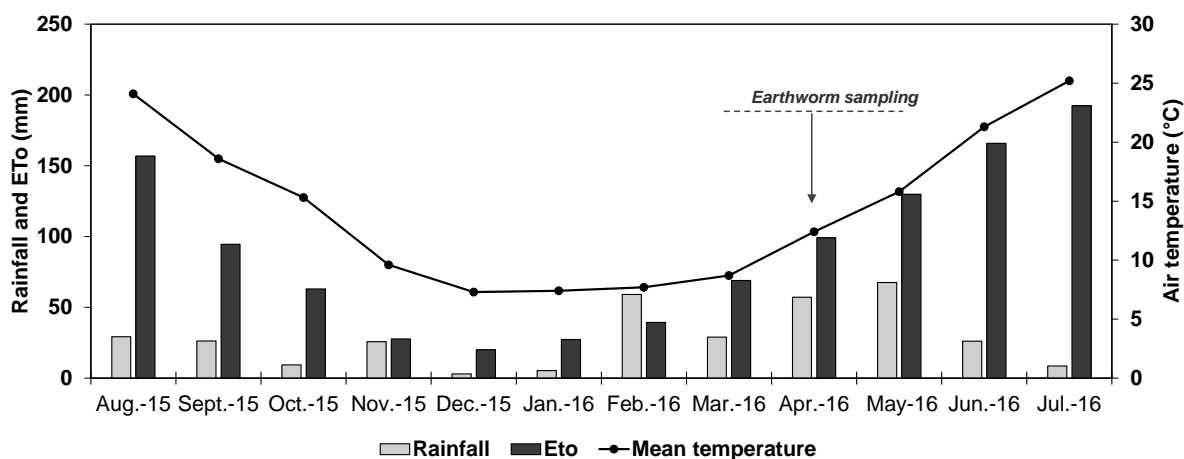


Figure 4.1. Monthly rainfall, reference crop evapotranspiration (ETo, FAO Penman–Monteith equation), and monthly average of air temperature during the cropping year (August 2015 – July 2016). Data were obtained from the Tárrega meteorological station, located 15 km from the experimental site (UTMX, UTM Y: 347015.00, 4614430.00).

4.2.2 Description of the experiment

Barley (Nuria variety, two-row barley) was sown in the 2015/16 season. Plots from five different N fertilization treatments were randomly assigned to three blocks (replications) at the start of the experiment and they were always maintained in the same position from 1997 onwards. The treatments were: control with no N added (named CO), mineral N fertilizer applied at a rate of 80 kg N ha⁻¹ (named MF; 38% N applied before sowing and the rest as topdressing at a V6–V8 Zadoks cereal physiological stage), pig slurry applied at a rate of 96 kg N ha⁻¹ equivalent to 27 t ha⁻¹ (named PS) and two rates of sludge compost: 88 and 174 kg N ha⁻¹ equivalent to 4.4 and 8.7 t ha⁻¹ (named 4SC and 8SC, respectively). Thus, the criterion for the organic fertilizer dose to be applied was based on N supply. The rates applied with the organic fertilizers guarantee PK availability for the crop. The PS and SC were provided by pig farms and by a commercial officially licensed composting plant close to the experimental site and these were applied before sowing and buried within 24 h after application. The compost was obtained mixing one part of municipal wastewater sludge combined with three parts of the agro-industrial and forest waste. The proportion of sludge was always the same; however, the proportion of agro-industrial versus forest waste depended on their availability. The compost always met the legal regulations for its agricultural use (RD 1310/1990, MAPA 1990; RD 506/2013, MAPA 2013).

In the 2015/16 cropping season, just before fertilization, a composite sample from each of these fertilizer products was taken and their dry matter (DM, gravimetric method at 105

°C) and organic matter (OM, ignition at 550 °C) were analysed. Dry matter values were 4.3% (w/w) for PS and 72% (w/w) for the sludge compost, and OM content was 64% over dry weight for PS (equivalent to 0.74 t OM ha⁻¹ yr⁻¹) and 45% for the SC in two rates for both components expressed over dry weight (equivalent to 1.42 t OM ha⁻¹ yr⁻¹ and 2.84 t OM ha⁻¹ yr⁻¹ for 4SC and 8SC respectively). As a consequence of the long duration of the experiment (19 years), a gradient in soil organic matter content (Walkley and Black method) developed according to the different treatments. At the end of the 2015/16 cropping season, soil OM average values were 1.5, 1.7, 1.8, 2.1 and 2.3% for CO, MF, PS, 4SC and 8SC, respectively. The heavy metal content of SC in the 2015/16 season was: Co = 2.1, Cu = 83, Zn = 293, Cr = 28, Cd = 0.49, Ni = 20, Pb = 19 and Hg = 0.3 all of them expressed in mg kg⁻¹ of SC dry matter.

4.2.3 Earthworm sampling and community characterization

Earthworm sampling was carried out on April 11 and 12, 2016 (~6 months after the last pre-sowing organic fertilization and 2 months after the last mineral fertilizer topdressing). The sampling date took into account the Pérès et al. (2014) recommendation about best samplings between the end of winter time and the beginning of spring time, where conditions are favourable for earthworm activity. Considering the low rainfall and high evapotranspiration in the study area during the summer period (Figure 4.1), samplings at the beginning of autumn, before sowing, cannot be recommended as the earthworm population at that season might be affected by low soil moisture content. The average water content in the soil ($14 \pm 1\%$, w/w, gravimetric humidity) was measured during sampling.

Soil monoliths (0.25 m x 0.25 m) were excavated to a depth of 0.20 m in each plot with a spade, transferred to the laboratory and hand-sorted for earthworms within 24 h after collection (n = 3, each treatment). The earthworms were immediately fixed with formaldehyde and stored in ethanol (70%). Furthermore, in the field, in each pit hole, different volumes of formalin were poured at different concentrations (0.2%, 0.750 mL two times and 0.4%, 1 L one time) for periods of 45 minutes but applied at intervals of fifteen minutes to expel residual earthworms which might have escaped to deeper layers (AENOR 2009). The infiltration of the formaldehyde solutions was slow, because a compacted layer was found at that depth (0.20–0.25 m depth), and no earthworms were detected below that level.

The parameters associated with the earthworm community were used as bioindicators following AENOR (2009): total and juvenile abundance, considering the whole earthworm body - and if it was cut, only the fore part (i.e. with head) was counted; and earthworm biomass, considering the weight of specimens preserved in ethanol and earthworm richness (number of species). Besides, species identification following Pérez and Rodríguez (2008), and species dominance (%) were also studied.

Table 4.1. Classification of the earthworm bioturbation and the micromorphological description of the associated soil structure.

Type of earthworm ^a bioturbation	Micromorphological characteristics
Type 0	Absence of earthworm bioturbation. Inclusion of soil anthropogenic processes: - Soil compaction: area without discernible porosity, low roughness and larger cracks. - Soil tillage: aggregate assemblages of various sizes and shapes. High porosity and roughness. Unidentified processes: apedal microstructure without an aggregative aspect.
Type 1	Burrows, mainly empty.
Type 2	Packing of homogeneous (in shape and size) cast aggregates, individually distributed and not welded. Packing of welded cast aggregates. Packing of strongly welded casts (compacted).

^a Adapted from Piron et al. (2012, 2017).

4.2.4 Earthworm bioturbation and micromorphological soil traits

An undisturbed soil prism sample, with a rectangular shape (0.06 m height, 0.09 m width, 0.19 m length), was taken on January 27, 2016 from each treatment and with two replicates (blocks). The rectangular prisms (n = 10) were dried at room temperature and impregnated with polyester resin with a fluorescent dye (Uvitex®). One vertical thin section (0.05 m height, 0.13 m length) was obtained from each prism according to the procedure described by Benyarku and Stoops (2005). All thin sections (10 in total) were scanned with a high resolution Epson scanner to obtain digital images which were processed with the 3200 dpi (dots per inch) option and with a 24 bit spectral resolution (“true colour”). Thus, images with a dimension of 14126 x 5461 pixels (equivalent to an area of 4860 mm²) were obtained.

The microstructure and the abundance of the different shapes of pores were described, following Stoops (2003) and Zaiets and Poch (2016). At the image scale, three types of bioturbation were quantified as a percentage of total area. The measurements of

bioturbated areas were processed with Olympus Stream image analysis software (Olympus, 2013).

The classification of earthworm bioturbation, adapted to the micromorphological technique from the visual description of the soil profiles by Piron et al. (2012, 2017), was included (Table 4.1).

4.2.5 Data analysis

All statistical analyses were performed using SAS V8.2 statistical software (SAS Institute 2001). When differences, according to the analyses of variance (ANOVA), were considered significant ($P < 0.05$), Least Statistical Difference (LSD) was computed to compare pairs of means at the 0.05 probability level. Earthworm abundance data were normalized, before the ANOVA analysis, using the log-transformation.

A qualitative scale was used to describe the abundance of the different types of pores (from “not observed” up to “abundant”).

4.3 Results

Earthworm abundance (total and juvenile specimens) and biomass did not show significant differences between the fertilizer treatments (Table 4.2). The total abundance values were in the interval between 101 to 176 individuals m^{-2} and earthworm biomass ranged from 17.3 to 34.4 $g m^{-2}$.

Two earthworm species were recovered in the experimental site (Table 4.3), the endogenic earthworm *Koinodrilus roseus* (Savigny, 1826) and the anecic species *Nicodrilus trapezoides* (Dugés, 1828). The second of these was not present in the SC treatments (4SC and 8SC) (Table 3). Their dimensions agree with general descriptions of the species, as *Koinodrilus roseus* is characterized by a length between 25 to 75 mm and by a width between 2 to 4 mm; *Nicodrilus trapezoides* has a length between 55 to 148 mm and a width between 3 to 5 mm.

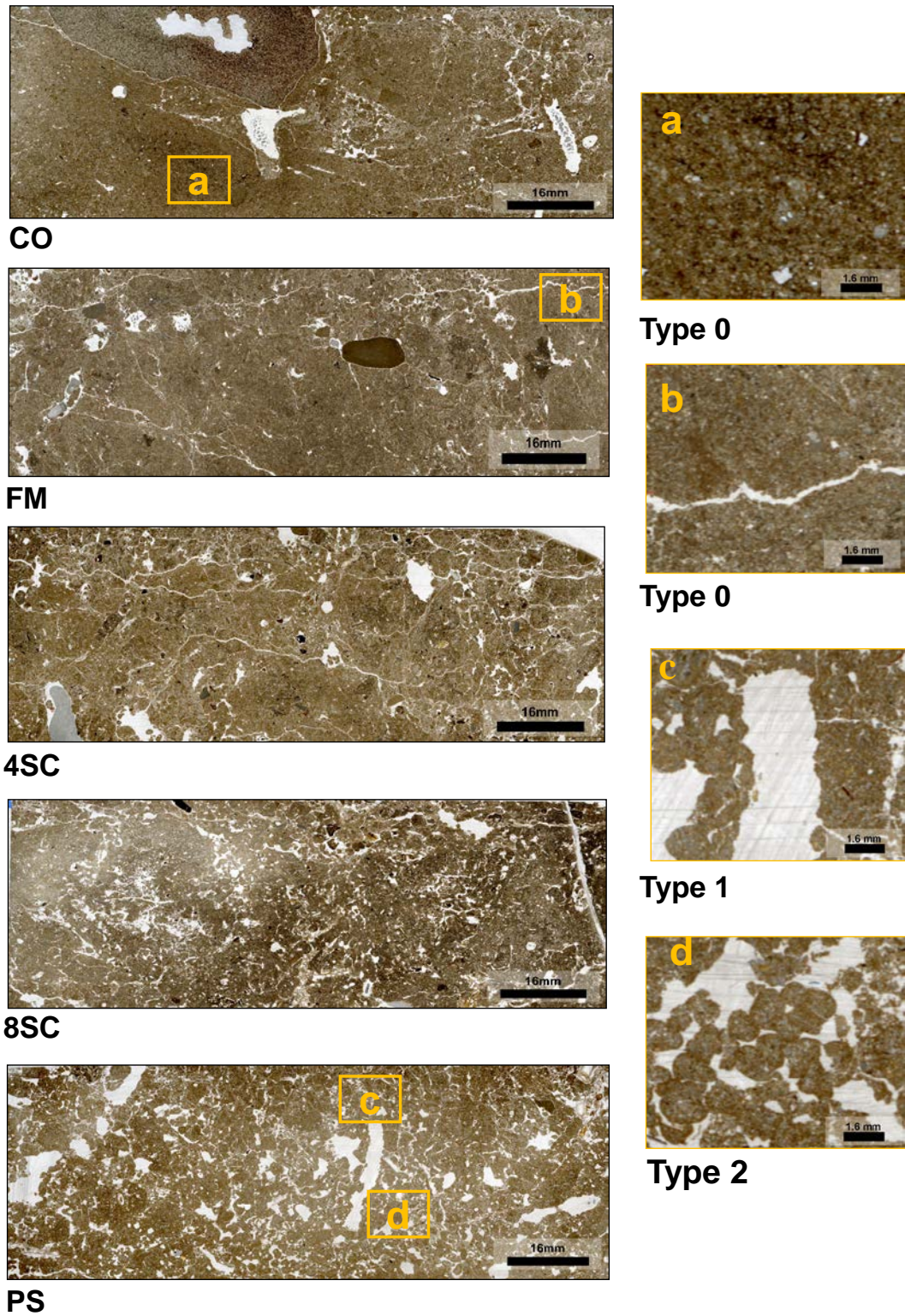


Figure 4.2. Scanned images of thin sections used for the description of the microstructure, types of voids and micromorphological earthworm bioturbation (Type 0, absence of bioturbation: anthropogenic and unidentified processes; Type 1, burrows; Type 2, cast) from different fertilizer treatments. Treatments were: CO, control; MF, mineral.

Micromorphological differences (microstructure and types of voids) were observed (Figure 4.2; Table 4.4). The control and the MF treatments had a platy to massive microstructure, moderately separated (i.e. aggregates are, in general, horizontally elongated and separated by planar voids; no separated areas with a few visible voids are also present). The sludge compost treatments had a sub-angular blocky microstructure weakly separated (i.e. aggregates separated by short planar voids on all or in most sides) while the PS treatment had a crumb microstructure, highly separated by rugose packing pores (Figure 4.2; Table 4.4).

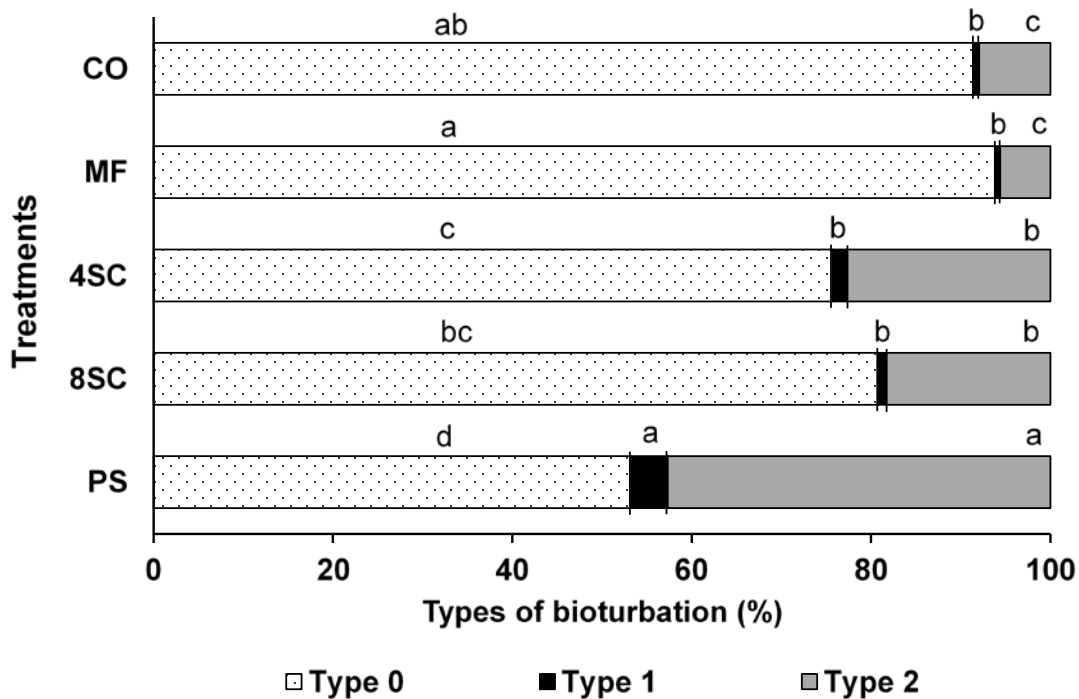


Figure 4.3. Presence (%) of the different earthworms' bioturbation types in the different fertilization treatments. Mean values followed by different letter were significantly different at the 0.05 probability level based on the Fisher's Least Significant Difference test. Codes for bioturbation were: Type 0, absence of bioturbation: anthropogenic and indefinite processes; Type 1, burrows; Type 2, casts. Codes for treatments were: CO, control; MF, mineral N fertilizer; SC, sludge compost, numbers indicate the applied rate of 4 or 8 t ha⁻¹; PS, pig slurry applied at a rate of 27 t ha⁻¹.

Pores related to biological activity were more abundant when organic fertilizers were applied, mainly in PS. Vughs were not present in SC treatments, which had planar voids distributed randomly in vertical and horizontal forms, linked to microstructure type (Figure 4.2). By contrast, in CO and MF treatments, planar voids were mainly horizontally distributed. In the PS treatment (Table 4.2; Figure 4.3), the presence of earthworm bioturbation Type 1 (4%; burrows) and Type 2 (42%, casts) were significantly higher.

Channels and pores associated with the accommodation of the fresh casts, welded or compacted (compound packing voids and star-shaped vughs) linked to earthworm bioturbation predominated with PS application. The percentage of casts in SC treatments was higher than in CO and MF treatments (Type 2), without differences in the presence of burrows (Type 1).

Table 4.2. Analysis of variance of earthworm bioindicators: total abundance (individuals m⁻²); juvenile abundance (individuals m⁻²), earthworm biomass (g m⁻²), and earthworm bioturbation (% of total soil section area) classified in three types: Type 0 (absence), Type 1 (burrows) and Type 2 (casts).

Earthworm bioindicators	Source	Total abundance			Juvenile abundance			Biomass	
		DF^a	MS	P	MS	P	MS	P	
	Between treatments	4	0.05	0.96	0.09	0.92	129.98	0.77	
	Between blocks	2	1.03	0.09	0.85	0.17	590.26	0.20	
	Residual	8	0.31		0.38		293.12		
	SE		0.32		0.35		9.88		
Earthworm bioturbation	Source	Type 0			Type 1		Type 2		
		DF	MS	P	MS	P	MS	P	
	Between treatments	4	526.26	0.002	4.38	0.009	437.93	0.002	
	Between blocks	1	3.45	0.66	0.57	0.21	1.23	0.76	
	Residual	4	15.57		0.25		11.94		
	SE, SED, LSD ^b		2.79, 3.95, 10.96		0.36, 0.50, 1.39		2.44, 3.45, 9.59		

^a DF: degrees of freedom; MS: mean square.

^b SE, standard error of the mean; SED, standard error of a difference; LSD, least significant difference test ($P = 0.05$).

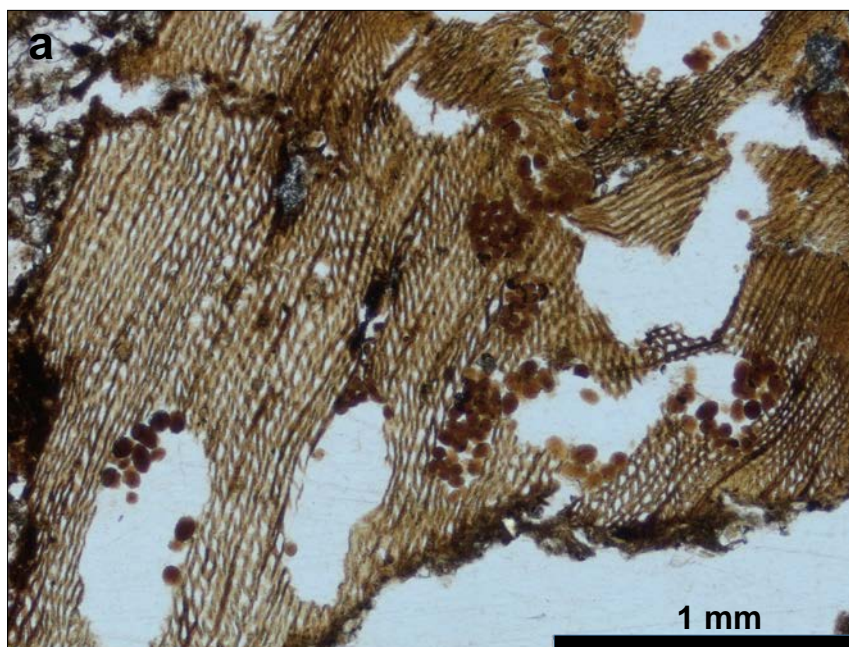
Table 4.3. Average values ($n = 3$) of total and juvenile earthworm abundance (individuals m⁻²), earthworm biomass (g m⁻²) and distribution (%) of the earthworm community for the different fertilizer treatments.

Treatments^a	Abundance		Biomass	Community composition	
	Total	Juvenile		<i>Koinodrilus roseus</i>	<i>Nicodrilus trapezoides</i>
CO	139	101	29.5	83	17
MF	112	69	34.4	63	38
4SC	176	155	22.2	100	0
8SC	117	106	17.3	100	0
PS	101	80	26.5	75	25

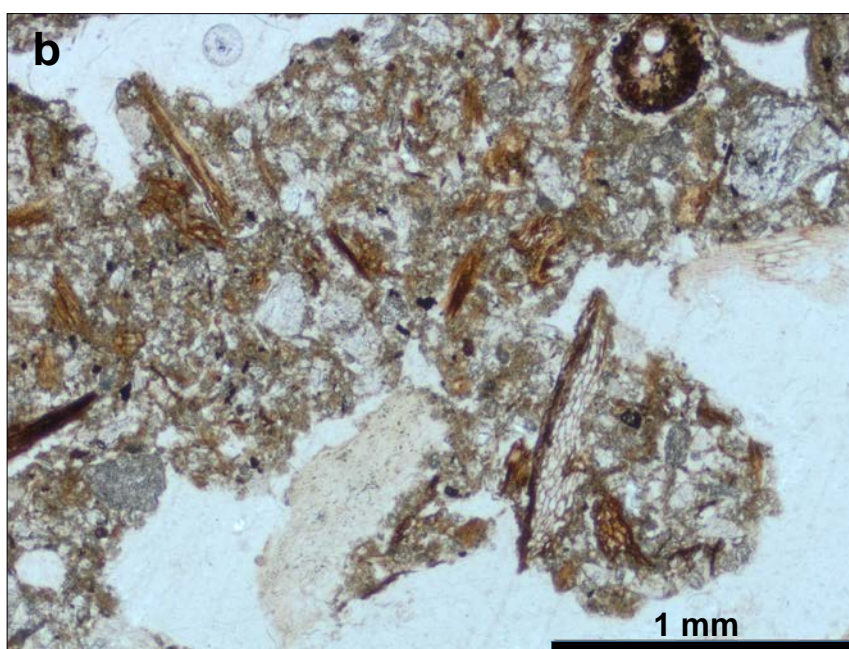
^a CO: control; MF: mineral N fertilizer; SC: sludge compost, numbers indicate the applied rate of 4 or 8 t ha⁻¹; PS: pig slurry applied at a rate of 27 t ha⁻¹.

Also, the presence of non-mixed fresh vegetal material was observed in the SC treatments, while in the PS treatments the organic material was more intimately mixed

and was distributed homogeneously throughout the observation area (Figures 4a, b). The earthworm bioturbated area accounted for 47% in PS and 22% (average) in SC treatments (Figure 4.3).



SC



PS

Figure 4.4. Fresh plant material in soil. a) fresh material in treatments with sewage compost (SC) attacked by soil organisms other than earthworms (oribatids). b) mixed soil materials due to earthworm bioturbation in pig slurry (PS) treatment.

Table 4.4. Micromorphological description^a of microstructures and morphological types of voids from different fertilizer treatments.

Treatment ^c	Microstructures				Morphological types of voids ^b						
	Shape	Size (mm)	Degree of separation	Compound packing voids	Planar	Channels	Chambers	Vughs	Star-shaped vughs		
CO	platy to massive		moderate	+	++	++	0	++	0		
MF	platy to massive		moderate	0	++	+	0	++	+		
4SC	subangular blocky		weak to moderate	++	+++	+++	+++	0	++		
8SC	subangular blocky		weak	++	++	+++	+++	0	+++		
PS	crumb	1-4	moderate to high	+++	0	++++	++++	+++	+++		

^a Descriptive description of the observed thin sections (n = 2).

^b Abundance gradation: 0 no presence, + very few, ++ few, +++ moderate, ++++ abundant.

^c CO: control; MF: mineral N fertilizer; SC: sludge compost, numbers indicate the applied rate of 4 or 8 t ha⁻¹; PS: pig slurry applied at a rate of 27 t ha⁻¹.

4.4 Discussion

Earthworm abundance agreed with other observations made under a semiarid Mediterranean climate, where less than 200 individuals m^{-2} were found (Rutgers et al., 2016). The importance of juvenile specimens can be explained by the sampling period, as spring samplings capture higher percentages than autumn samplings (Murchie et al., 2015). The absence of differences between treatments in other parameters such as earthworm biomass might be interpreted as these parameters are insufficiently sensitive to differences between fertilization materials and the decline in earthworm abundance can only be expected under heavier impacts as the ones present in contaminated soils (Pérès et al., 2011).

The biodiversity was low, in accordance with Baldivieso-Freitas et al. (2018), as only two species of earthworms were collected. Both species live in field crops and forests although endogeic species such as *K. roseus* predominate in field crops (Lamandé et al., 2003), and anecic earthworms such as *N. trapezoides* predominate in forests (Kooch et al., 2008). Pérès and Rodriguez (2008), pointed out that both species are under threat due to pollution. The absence of epigeic earthworms can be explained by the lack of litter in the cropland (Koblenz et al., 2015), common in rainfed areas where straw is removed from the fields. Furthermore, *N. trapezoides* was not present in SC treatments. The absence of anecics is directly associated with the characteristics of the organic material due to their saprophagic habit, as endogenics have a geophagic habit (Piron et al., 2017). This finding agrees with Coors et al. (2016) who observed a decrease of anecic species with sludge applications. Besides, *N. trapezoides* shows a low susceptibility (changes in abundance) to mineral fertilization (Reinecke and Visser, 1980). Sludge compost increases soil organic carbon stocks but it is a strongly stabilized source of OM and it might contain substances potentially toxic to soil organisms (Fernández et al., 2007a, 2007b; Rigby et al., 2016). Our results indicate that the presence of earthworm species should be monitored to assess potential environmental risks (Renaud et al., 2017) when sludge compost is applied for a long-term.

Although SC satisfies legal limits, in the framework of this long-term fertilization experiment, the accumulation of other non-identified compounds could be harmful to a specific earthworm species. It is known that sewage sludge contains organic and inorganic contaminants not regulated by law i.e. emerging contaminants or nanoparticles; thus its compliance is not a reliable guarantee of lack of toxicity (Aparicio et al., 2009; Fijalkowski et al., 2017). Furthermore, the processes undergone by the sewage sludge

(composting, anaerobic digestion, even thermal carbonization) do not ensure that the final product has a high quality and does not contain contaminants (in fact only a lower amount by a dilution effect). These facts should be investigated in future studies as other authors also pointed out (Fijalkowski et al., 2017). Nevertheless, differences in the total amount of OM applied by PS and SC might play a role apart from OM composition.

Differences in feeding habits and specific physiological characteristics of species make them useful as bioindicators of disturbed or contaminated soils (Nahmani et al. 2003): *N. trapezoides*, according to our results, could be a sound bioindicator candidate.

The earthworm community is sensitive to agricultural management (Biau et al., 2012; Yagüe et al., 2016) but the influence is reciprocal. In practice, the soil influences the development of living organisms and the latter influence the development of porosity as stated by Kooistra and Pulleman (2001). In our experiment, earthworm bioturbation differed according to the treatment applied, and in turn soil microstructure and its shape (Figure 4.2) evolved from a platy-massive (CO, MF), to a subangular blocky (SC) and finally to a crumb microstructure (PS). The application of sludges decreased the amount of large horizontal cracks when compared with CO and MF, but was not able to increase neither the abundance of biopores (i.e. channels, chambers, compound packing voids and especially vughs, Table 4.4) nor earthworm bioturbation (Figure 4.3, Type 1 and 2) compared with PS treatment. Overall, the application of slurries increased the activity of earthworms due to their nutritional value (D'Hose et al. 2018). According to Dominquez-Hydar et al. (2018), when the soil has an advanced state of homogenization by a high faunal activity, the soil microstructure evolves from subangular blocks to more rounded peds, as it has been observed under the PS treatment. This microstructure development (crumb) is typically linked with large compound packing voids and results from the disturbance of former voids or their refilling with various materials like parts of burrow walls and casts from earthworms (VandenBygaart et al., 2000; Bruneau et al., 2004; Sauzet et al., 2017).

In agreement with our findings, Adesodun et al. (2005) observed an increase in excrement-produced by soil fauna (included earthworms) with two SC applications (every two years) in relation to control (without OM application) but they observed an evident negative effect of SC on microbial biomass. This may be due to a damaging effect on the soil ecosystem as a whole, even when the applications are not long-term. The negative effect of SC on microorganisms and enzymes of the soil is indeed very well documented (Charlton et al., 2016; Sharma et al., 2017). Specifically, the lowest bioturbation of Type 1

in the CO and MF treatments might be associated to a massive microstructure, while in SC it is attributed to the absence of anecic species because non-mixed organic material was visible in soil thin sections (Figure 4.4a). The microstructure and fissures observed in CO and MF (Figure 4.2) are typical of agricultural systems without external inputs of organic matter (Bosch-Serra et al., 2017) and possible compaction problems (Pagliai, 2003). Anecic activities are important for Type 1 bioturbation as they build and live in relatively permanent vertical burrows (channels or tubular voids), feed on decomposed litter and mix litter fragments with mineral particles (Lamandé et al., 2003; Piron et al., 2012, 2017).

Our results support the conclusions of Lamandé et al. (2013) in the sense that in order to improve our understanding of earthworm and structure interaction it is necessary to consider the functional diversity of earthworms, as well as their abundance. The highest earthworm bioturbation in the PS treatment was mainly associated with two biostructures (Figure 4.3): burrows (Type 1) and casts (Type 2). In general, Type 2 bioturbation corresponds to an important part of soil aggregates and is more abundant in soils with favourable physical conditions (Lee and Foster, 1991; Pulleman et al., 2005). The microstructure improvement and the biopore presence have a potential and positive functional impact, favouring gaseous exchanges, the movement and retention of soil water and root penetration in soil (Lamandé et al., 2003; Peigné et al., 2013).

Earthworms significantly contribute to many of the ecosystem services provided by the soil, but they are also indicators of unknown but harmful soil components. The analysis of earthworm roles, apart from abundance and diversity of species, must include their activity (Birkas et al., 2010) through the evaluation of soil bioturbation (soil microstructure description) in order to properly assess the impact of a long term use of wastes as fertilizers, as it is proved in our conditions. Our results support the recent trend towards integrative approaches in soil health assessment combining qualitative and quantitative tools (Pirón et al., 2017; Bünemann et al., 2018). Current works mention the need for monitoring the soil ecosystem when SC is used as fertilizer (Fijalkowski et al., 2017) and the increase interest in taking preventive measures before the load of pollutants that entails the use of SC can affect soil quality, and compromise the circular economy (Rigueiro-Rodríguez et al., 2018).

The integrated analysis of micromorphological features and earthworm traits is an useful tool for the record of past (structures casts, burrows) and present soil fauna (abundance,

biomass, diversity) and it makes possible to monitor changes in soils associated to the effect of management agriculture practices, as long term organic fertilization.

4.5 Conclusions

Earthworm numbers (abundance and biomass) were not useful to detect differences between fertilization treatments while the species identification and the analysis of soil bioturbation did. The bioturbated area was lower than 9% for the control and MF treatments. The application of PS resulted in increased bioturbation (up to 47%). Specifically, when compared with sludge compost, PS improved the indicators of soil fertility: physical (microstructure), and biological (number of earthworm species and activity). No chambers were observed in the control and in the mineral fertilized plots, while vughs were absent in SC treatments. Globally, bio-structures developed by earthworms (presence of burrows and casts), were more abundant when PS was applied.

Composted sludge treatments compared with PS reduced the percentage of area bioturbated by 47% and the earthworm community to one species: *Koinodrilus roseus*. The lack of *Nicodrilus trapezoides* (present in the rest of the treatments) points to this species as an indicator of the risk in soil biological quality reduction in this dryland agricultural systems, which in our experiment resulted as a consequence of long-term sludge compost application. Hence, these insights about the possible causes for the absence of *Nicodrilus trapezoides* under sludge compost fertilization should be investigated in future studies as well as if it implies negative impacts on an integrative soil quality concept.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the Spanish National Institute for Agricultural Research and Experimentation (MINECO-INIA) through the projects RTA2013-57-C5-5 and RTA2017-88-C3-3. The field maintenance of the experimental site by the Ministry of Agriculture, Livestock, Fisheries and Food (Generalitat de Catalunya), in the framework of the improvement of fertilization practices in Catalonia (Spain), is fully acknowledged. The authors thank Josep M. Llop and Stefania C. Maris for field assistance and Dr. Antonio Pérez Onteniente for his valuable help on earthworm classification.

References

- AENOR, 2009. Calidad del suelo, muestreo de invertebrados del suelo, Parte 1. Cribado manual y extracción con formol de lombrices. Norma UNE-EN ISO 23611-1:2009. Madrid (ES).
- Adesodun, J.K., Davidson, D.A., Hopkins, D.W., 2005. Micromorphological evidence for changes in soil faunal activity following application of sewage sludge and biocide. *Appl. Soil Ecol.* 29, 39–45.
- Alvarenga, P., Mourinha, C., Farto, M., Santos, T., Palma, P., Sengo, P., Morais, M.C., Cunha-Queda, C., 2015. Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: Benefits versus limiting factors. *Waste Manag.* 40, 44–52.
- Alvarenga, P., Palma, P., Mourinha, C., Farto, M., Dôres, J., Patanita, M., Cunha-Queda, C., Natal-da-Luz, T., Renaud, M., Sousa, J., 2017. Recycling organic wastes to agricultural land as a way to improve its quality: A field study to evaluate benefits and risks. *Waste Manag.* 61, 582–592.
- Aparicio, I., Santos, J.L., Alonso, E., 2009. Limitation of the concentration of organic pollutants in sewage sludge for agricultural purposes: A case study in South Spain. *Waste Manag.* 29, 1747–1753.
- Asses, N., Farhat, A., Cherif, S., Hamdi, M., Bouallagui, H., 2018. Comparative study of sewage sludge co-composting with olive mill wastes or green residues: Process monitoring and agriculture value of the resulting composts. *Process Saf. Environ. Prot.* 114, 25–35.
- Bal, L., 1970. Morphological investigation in two moder-humus profiles and the role of the soil fauna in their genesis. *Geoderma* 4, 5–36
- Baldivieso-Freitas, P., Blanco-Moreno, J.M., Gutiérrez-López, M., Peigné, J., Pérez-Ferrer, A., Trigo-Aza, D., Sans, FX., 2018. Earthworm abundance response to conservation agriculture practices in organic arable farming under Mediterranean climate. *Pedobiologia (Jena)* 66, 58–64.
- Benyarku, C.A., Stoops, G., 2005. Guidelines for preparation of rock and soil thin sections and polished sections. Lleida (SP): Quaderns DMACS 33, Ed. Universitat de Lleida.
- Bertrand, M., Barot, S., Blouin, M., Whalen, J., de Oliveira, T., Roger-Estrade, J., 2015. Earthworm services for cropping systems. A review. *Agron Sustain Dev.* 35, 553–567.
- Biau, A., Santiveri, F., Mijangos, I., Lloveras, J., 2012. The impact of organic and mineral fertilizers on soil quality parameters and the productivity of irrigated maize crops in semiarid regions. *Eur J Soil Biol.* 53, 56–61.
- Birkas, M., Bottlik, L., Stingli, A., Gyuricza, C., Jolánkai, M., 2010. Effect of soil physical state on the earthworms in Hungary. *Appl Environ Soil Sci.* 2010, 1–7.
- Blouin, M., Hodson, M.E., Delgado, E.A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K.R., Dai, J., Dendooven, L., Peres, G., Tondoh, J.E., Cluzeau, D., Brun, J.J., 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Eur. J. Soil Sci.* 64, 161–182.

- Bosch-Serra, A.D., Ortiz, C., Yagüe, M.R., Boixadera, J., 2015. Strategies to optimize nitrogen efficiency when fertilizing with pig slurries in dryland agricultural systems. *Eur J Agron.* 67, 27–36.
- Bosch-Serra, A.D., Yagüe, M.R., Poch, R.M., Molner, M., Junyent, B., Boixadera, J., 2017. Aggregate strength in calcareous soil fertilized with pig slurries. *Eur J Soil Sci.* 68, 449–461.
- Bouché, M.B., 1972. *Lombriciens de France. Ecologie et systématique.* Paris (FR). INRA.
- Bruneau, P.M.C., Davidson, D.A., Grieve, I.C., Young, I.M., Nunan, N., 2005. The effects of soil horizons and faunal excrement on bacterial distribution in an upland grassland soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 139–144.
- Bruneau, P.M.C., Davidson, D.A., Grieve, I.C., 2004. An evaluation of image analysis for measuring changes in void space and excremental features on soil thin sections in an upland grassland soil. *Geoderma* 120, 165–175.
- Bünemann, E.K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R.E., De Deyn, G., de Goede, R., Fleskens, L., Geissen, V., Kuyper, T.W., Mäder, P., Pulleman, M., Sukkel, W., van Groenigen, J.W., Brussaard, L., 2018. Soil quality – A critical review. *Soil Biol. Biochem.* 120, 105–125.
- Charlton, A., Sakrabani, R., Tyrrel, S., Rivas Casado, M., McGrath, S.P., Crooks, B., Cooper, P., Campbell, C.D., 2016. Long-term impact of sewage sludge application on soil microbial biomass: An evaluation using meta-analysis. *Environ. Pollut.* 219:1021–1035.
- Coors, A., Edwards, M., Lorenz, P., Römbke, J., Schmelz, R.M., Topp, E., Waszak, K., Wilkes, G., Lapen, D.R., 2016. Biosolids applied to agricultural land: Influence on structural and functional endpoints of soil fauna on a short- and long-term scale. *Sci Total Environ.* 562, 312–326.
- D'Hose, T., Molendijk, L., Van Vooren, L., van den Berg, W., Hoek, H., Runia, W., van Evert, F., ten Berge, H., Spiegel, H., Sandèn, T., Grignani, C., Ruyschaert, G., 2018. Responses of soil biota to non-inversion tillage and organic amendments: An analysis on European multiyear field experiments. *Pedobiologia (Jena).* 66, 18–28.
- Davidson, D.A., Bruneau, P.M.C., Grieve, I.C., Wilson, C.A., 2004. Micromorphological assessment of the effect of liming on faunal excrement in an upland grassland soil. *Appl. Soil Ecol.* 26, 169–177.
- Davidson, D.A., 2002. Bioturbation in old arable soils: Quantitative evidence from soil micromorphology. *J. Archaeol. Sci.* 29, 1247–1253.
- Davidson, D.A., Grieve, I.C., 2006. Relationships between biodiversity and soil structure and function: Evidence from laboratory and field experiments. *Appl. Soil Ecol.* 3, 176–185.
- Diacono, M., Montemurto, F., 2010. Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 401–422.
- Domínguez-Haydar, Y., Castañeda, C., Rodríguez-Ochoa, R., Jiménez, J.J., 2018. Assessment of soil fauna footprints at a rehabilitated coal mine using micromorphology and near infrared spectroscopy (NIRS). *Geoderma.* 313, 135–145.

- European Union, 1986. Council Directive, (86 / 278 /EEC), of 12 June 1986, on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agricultura. Off. J. Eur. Commun. 181, 6–12.
- European Union, 2018. Eurostat. Data base. Agriculture. [acceseed 2018 Nov 21]. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/data/database>.
- Fernández, J.M., Plaza, C., Hernández, D., Polo, A., 2007a. Carbon mineralization in an arid soil amended with thermally-dried and composted sewage sludges. *Geoderma*. 137, 97–503.
- Fernández, J.M., Hernández, D., Plaza, C.A., 2007b. Organic matter in degraded agricultural soils amended with composted and thermally-dried sewage sludges. *Sci Total Environ*. 378, 75–80.
- Fijalkowski, K., Rorat, A., Grobelak, A., Kacprzak, M.J., 2017. The presence of contaminations in sewage sludge – The current situation. *J. Environ. Manage*. 203, 1126–1136.
- Głąb, T., Żabiński, A., Sadowska, U., Gondek, K., Kopeć, M., Mierzwa-Hersztek, M., Tabor S., 2018. Effects of co-composted maize, sewage sludge, and biochar mixtures on hydrological and physical qualities of sandy soil. *Geoderma*. 315, 27–35.
- Gomez, A., 1998. The evaluation of compost quality. *Trends Anal. Chem*. 17, 310–314.
- Gómez-Muñoz, B., Magid, J., Jensen, L.S., 2017. Nitrogen turnover, crop use efficiency and soil fertility in a long-term field experiment amended with different qualities of urban and agricultural waste. *Agric. Ecosyst. Environ*. 240, 300–313.
- Gupta, S.C., Wang, D., 2007. Water retention in soil. In: Lal, R., editor. *Encyclopedia of Soil Science*. 2nd ed. New York (NY): Taylor and Francis. p. 1864–1869.
- Kibblewhite, M., Ritz, K., Swift, M., 2008. Soil health in agricultural systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 363, 685–701.
- Koblenz, B., Tischer, S., Rücknagel, J., Christen, O., 2015. Influence of biogas digestate on density, biomass and community composition of earthworms. *Ind Crops Prod*. 66, 206–209.
- Kooch, Y., Jalilvand, H., Bahmanyar, M.A., Pormajidian, M.R., 2008. Abundance, biomass and vertical distribution of earthworms in ecosystem units of hornbeam forest. *J Biol Sci*. 8, 1033–1038.
- Kooistra, M.J., Pulleman, M.M., 2001. Features related to faunal activity. In: Stoops, G., Marcelino, V., Mees, F., editors. *Interpretation of Micromorphological Features of soils and regoliths*. Amserdam (NL): Elsevier; p. 397–418.
- Kooistra, M.J., 1991. A micromorphological approach to the interactions between soil structure and soil biota. *Agric. Ecosyst. Environ*. 34, 315–328.
- Lamandé, M., Hallaire, V., Curm, P., Pérès, G., Cluzeau, D., 2003. Changes of pore morphology, infiltration and earthworm community in a loamy soil under different agricultural managements. *Catena* 54, 637–649.
- Lee, K., Foster, R., 1991. Soil fauna and soil structure. *Aust J Soil Res*. 29, 745–775.

- MAPA, 1989. Caracterización Agroclimática de la Provincia de Lérida. Madrid (SP): Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones.
- Gobierno de España, 1990. Real Decreto 1310/ 1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración depuración en el sector agrario. BOE 262, 32339–32340.
- Gobierno de España, 2013. Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. BOE 164, 51119–51207.
- Murchie, A.K., Blackshaw, R.P., Gordon, A.W., Christie, P., 2015. Responses of earthworm species to long-term applications of slurry. *Appl. Soil Ecol.* 96, 60–67.
- Nahmani, J., Lavelle, P., Lapied, E., van Oort, F., 2003. Effects of heavy metal soil pollution on earthworm communities in the north of France. *Pedobiologia (Jena)* 47, 663–669.
- Olympus, 2013. Olympus Stream. Analysys software. Version 510_UMA_OlyStream19-Krishna. Münster (DE).
- Onwosi, C.O., Igbokwe, V.C., Odimba, J.N., Eke, I.E., Nwankwoala, M.O., Iroh, I.N., Ezeogu L.I., 2017. Composting technology in waste stabilization: On the methods, challenges and future prospects. *J. Environ. Manage.* 190, 140–157.
- Paetsch, L., Mueller, C.W., Rumpel, C., Houot, S., Kögel-Knabner, I., 2016. Urban waste composts enhance OC and N stocks after long-term amendment but do not alter organic matter composition. *Agric. Ecosyst. Environ.* 223, 211–222.
- Pagliai, M., 2003. Changes of pore system following soil compaction. Paper presented at: Collage on Soil physics; Mar. 3–21; Miramare, Trieste, (IT) [accessed 2018 Nov. 20]. <http://indico.ictp.it/event/a0261/session/17/contribution/12/material/0/2.pdf>.
- Paoletti, M.G., 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agric Ecosyst Environ.* 74:137–155.
- Peigné, J., Vian, J.F., Cannavacciuolo, M., Lefevre, V., Gautronneau, Y., Boizard, H., 2013. Assessment of soil structure in the transition layer between topsoil and subsoil using the profil cultural method. *Soil Tillage Res.* 127, 13–25.
- Pérès, G., Cluzeau, D., Hotte, H., Delaveau, H., 2014. Earthworms. In : ADEME, editor. Bioindicators. Biological tools for soil quality assessment. France (Fr): ADEME, FranceTool Worksheet N° 6.
- Pérès, G., Vandenbulcke, F., Guernion, M., Hedde, M., Beguiristain, T., Douay, F., Houot, S., Piron, D., Richard, A., Bispo, A., Grand, C., Galsomies, L., Cluzeau, D., 2011. Earthworm indicators as tools for soil monitoring, characterization and risk assessment. An example from the national Bioindicator programme (France). *Pedobiologia (Jena)* 54, S77–S87.
- Pérez, A; Rodriguez, C. 2008. Lombrices de tierra de la Comunitat Valenciana. Valencia (ES): Generalitat Valenciana
- Piron, D., Boizard, H., Heddadj, D., Pérès, G., Hallaire, V., Cluzeau, D., 2017. Indicators of earthworm bioturbation to improve visual assessment of soil structure. *Soil Tillage Res.* 173, 53–63.

- Piron, D., Pérès, G., Hallaire, V., Cluzeau, D., 2012. Morphological description of soil structure patterns produced by earthworm bioturbation at the profile scale. *Eur J Soil Biol.* 50, 83–90.
- Ponge, J.F., Pérès, G., Guernion, M., Ruiz-Camacho, N., Cortet, J., Pernin, C., Villenave, C., Chaussod, R., Martin-Laurent, F., Bispo, A., Cluzeau, D., 2013. The impact of agricultural practices on soil biota: A regional study. *Soil Biol. Biochem.* 67, 271–284.
- Pulleman, M.M., Six, J., Uyl, A., Marinissen, J.C.Y., Jongmans, A.G., 2005. Earthworms and management affect organic matter incorporation and microaggregate formation in agricultural soils. *Appl Soil Ecol.* 29, 1–15.
- Reinecke, A.J., Visser, F.A., 1980. The influence of agricultural land use practices on the population densities of *Allolobophora trapezoides* and *Eisenia rosea* (Oligochaeta) in Southern Africa. In: Dindal, D.L., editor. *Soil Biology as Related to Land Use practices*. Washintong DC (US): EPA; p. 310–324.
- Renaud, M., Chelinho, S., Alvarenga, P., Mourinha, C., Palma, P., Sousa, J.P., Natal-da-Luz, T., 2017. Organic wastes as soil amendments – Effects assessment towards soil invertebrates. *J Hazard Mater.* 330, 149–156.
- Rigby, H., Clarke, B.O., Pritchard, D.L., Meehan, B., Beshah, F., Smith, S.R., Porter, N.A., 2016. A critical review of nitrogen mineralization in biosolids-amended soil, the associated fertilizer value for crop production and potential for emissions to the environment. *Sci Total Environ.* 541, 1310–1338.
- Rigueiro-Rodríguez, A., Amador-García, A., Ferreiro-Domínguez, N., Muñoz-Ferreiro, N., Santiago-Freijanes, J.J., Mosquera-Losada, M.R., 2018. Proposing policy changes for sewage sludge applications based on zinc within a circular economy perspective. *Land use policy* 76, 839–846.
- Rutgers, M., Orgiazzi, A., Gardi, C., Römbke, J., Jänsch, S., Keith, A.M., Neilson, R., Boag, B., Schmidt, O., Murchie, A.K., Blackshaw, R.P., Pérès, G., Cluzeau, D., Guernion, M., Briones, M.J.I., Rodeiro, J., Piñeiro, R., Cosín, D.J.D., Sousa, J.P., Suhadolc, M., Kos, I., Krogh, P.H., Faber, J.H., Mulder, C., Bogte, J.J., Wijnen, H.J. va., Schouten, A.J., Zwart, D. de, 2016. Mapping earthworm communities in Europe. *Appl. Soil Ecol.* 97, 98–111.
- Sánchez, M., González, J.L., 2005. The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation. *Bioresour. Technol.* 96, 1117–1123.
- SAS Institute-2001. *The SAS/TAT system for Windows*. Release V 8.2. SAS Inst., Cary, NC.
- Sauzet, O., Cammas, C., Gilliot, J.M., Bajard, M., Montagne, D., 2017. Development of a novel image analysis procedure to quantify biological porosity and illuvial clay in large soil thin sections. *Geoderma.* 292,135–148.
- Schon, N.L., Mackay, A.D., Gray, R.A, van Koten, C., Dodd, M.B., 2017. Influence of earthworm abundance and diversity on soil structure and the implications for soil services throughout the season. *Pedobiologia (Jena)* 62, 41–47.
- Sharma, B., Sarkar, A., Singh, P., Singh, R.P., 2017. Agricultural utilization of biosolids: A review on potential effects on soil and plant grown. *Waste Manag.* 64, 117–132.

- Shepherd, G., Stagnari, F., Pisante, M., Benites, J., 2008. Visual soil assessment. Field guides. Rome (IT): FAO. [accessed 2018 Nov 27]. <http://www.fao.org/docrep/010/i0007e/i0007e00.htm>
- Singh, J., 2018. Role of earthworms in sustainable agriculture. In: Galanakis, C.M., editor. Sustainable Food Systems from Agriculture to Industry. Improving Production and Processing. United Kingdom (UK): Elsevier; p. 83–122.
- Soil Survey Staff, 2014. Keys to soil taxonomy. 12th ed. Washington, DC. (US): U. S. Gov. Print. Office.
- Stoops, G., 2003. Guidelines for Analysis and Description of Soil and Regolith Thin Sections. Madison (WI): SSSA.
- VandenBygaart, A.J., Fox, C.A., Fallow, D.J., Protz, R., 2000. Estimating Earthworm-Influenced soil structure by morphometric image analysis. Soil Sci. Soc. Am. J. 64, 982–988.
- Yagüe, M.R., Bosch-Serra, À.D., Boixadera, J., 2012. Measurement and estimation of the fertiliser value of pig slurry by physicochemical models: Usefulness and constraints. Biosyst. Eng. 111, 206–216.
- Yagüe, M.R., Domingo-Olivé, F., Bosch-Serra, À.D, Poch, R.M., Boixadera, J., 2016. Dairy cattle manure effects on soil quality: porosity, earthworms, aggregates and soil organic carbon fractions. Land Degrad Develop. 2, 1753–1762.
- Zaiets, O., Poch, R.M., 2016. Micromorphology of organic matter and humus in Mediterranean mountain soils. Geoderma 272, 73–82.

Capítulo 5

Long-term fertilization with dairy cattle slurry in intensive production systems: effects on soil porosity and pore morphology

Este capítulo esta aceptado para publicación como artículo en la Revista de Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo

Valdez-Ibañez, A.S., Domingo-Olivé, F., Mateo-Marín, N., Yagüe-Carrasco, M.R. Bosch-Serra, À.D., 2019. Long-term fertilization with dairy cattle slurry in intensive production systems: effects on soil porosity and pore morphology. Rev. Fac. Cienc. Agrar., Univ. Nac. Cuyo (aceptado Marzo 13, 2019)

Long-term fertilization with dairy cattle slurry in intensive production systems: effects on soil porosity and pore morphology

Abstract

In Mediterranean environments, livestock effluents might improve soil physical properties. The study was located in an intensive crop production system of northwest Spain. After nine consecutive years of dairy cattle slurry (DCS) use as fertilizer, the aim of the experiment was to evaluate the impacts of DCS on soil porosity and pore shape. Soil texture was loam. The applied DCS rates were equivalent to 170 and 250 kg N ha⁻¹ (170DCS and 250DCS, respectively) and they were complemented with mineral N up to 450 kg N ha⁻¹ (two crops). A nonfertilized control was included. Digital binary images were obtained from soil thin sections. Pores with an apparent diameter (AD) >30 µm were analysed. The 250DCS treatment improved soil porosity (>30 µm): it doubled in comparison with the 170DCS and the control. The application of DCS favored the presence of pores with an AD >400 µm, the roughness for AD >100 µm and the elongation in the AD interval of 100–200 µm. From the study, the 250DCS treatment is recommended as it increases macroporosity (compaction reduction) and produces more elongated and tortuous pores, which will be a constraint for fast drainage but it will be advantageous in coarse textured soils.

Keywords: double-cropping, organic fertilizer, soil pore shapes, micromorphology of pores

Abbreviations: DCS, dairy; AD, apparent diameter, OM, organic matter

Resumen

En zonas Mediterráneas del noroeste español bajo producción intensiva, la aplicación de deyecciones ganaderas podría mejorar las propiedades físicas del suelo. Tras nueve años de fertilización con purín de vacas lecheras (DCS), se planteó evaluar los efectos del DCS sobre la porosidad edáfica y la morfología de los poros. La clase de familia textural era franca gruesa. Las dos dosis de DCS evaluadas equivalían a 170 y 250 kg N ha⁻¹ (170DCS y 250DCS, respectivamente) y se complementaban con N mineral hasta 450 kg N ha⁻¹ (dos cultivos). Se incluyó un control sin fertilización. A partir de láminas delgadas de suelo se obtuvieron imágenes digitales binarizadas. Se analizaron los poros de diámetro aparente (AD) >30 µm. El tratamiento 250DCS duplicó la porosidad (>30 µm) respecto a 170DCS y el control. La aplicación de DCS favoreció la presencia de AD >400 µm, la rugosidad para AD >100µm y la elongación de poros en el rango 100–200 µm. La dosis de 250DCS es recomendable al incrementar la macroporosidad (implica una disminución de la compactación) y favorecer unas formas de poros más alargadas, con mayor tortuosidad, que dificultarían el drenaje rápido, lo cual es beneficioso en suelos con contenido importante de arena.

Palabras clave: Doble cultivo, fertilizantes orgánicos, forma de poros edáficos, micromorfología de poros.

5.1 Introduction

The intensification of forage production by means of double-annual cropping, is linked with a dynamic agricultural system that enhances the circular economy, since the plant biomass harvested becomes livestock feed, and the animal excrements are used to cover the nutrient demands of the forage crops (Perramon et al., 2018). In the European Union areas which have been designated as vulnerable to contamination of subsurface waters by nitrates, the application of N from organic sources is limited to 170 kg N ha⁻¹ year⁻¹ (Directive 91/676/EEC; European Union, 1991), although the rates applied can be complemented with mineral N. This regulation covers the N demand of many annual crops. However, in a double-annual cropping system, the application of 250 kg N ha⁻¹ year⁻¹ from livestock excrements (manures and slurries) is an alternative to maintain high forage yields while saving expenses on additional mineral N (Perramon et al., 2016, 2017). Furthermore, organic fertilizers introduce organic matter (OM) into the soil, which is especially needed in Mediterranean climates where soils are characterized by their low levels of OM (Jones et al., 2004).

In the European Union, the Common Agricultural Policy includes “conditionality” in order to maintain the potential productivity of land resources and prevent soil degradation (European Union, 2013). Conditionality is a set of legally defined good agricultural and environmental practices that farmers, who receive direct (or for rural development) subsidies, are obliged to implement. These requirements include the maintenance of soil OM, an objective which is significantly covered by the use of livestock waste in fertilization schedules.

The addition of OM affects soil physical properties such as porosity (Mellek et al., 2010). In addition, porosity affects soil ecosystem services (Adhikari and Hartemink, 2016). Thus, porosity becomes an indicator of the sustainability of a specific agricultural management method. The characteristics of the soil porous system have a direct relationship: (i) with the retention and movement of water and gases (Lamandé et al., 2003), (ii) with biological and chemical properties (Pagliai and Vignozzi, 2006), (iii) with erosion risks and sediment transport, including contaminants (Ramon et al., 2006), and (iv) with the development of the plant root system (Pagliai and Nobili, 1993). In addition, the soil porous system is sensitive, mainly through macroporosity (Pagliai et al., 2004; Yazdanpanah et al., 2016), to changes induced by agricultural activities such as tillage, irrigation or fertilization. Nevertheless, the assessment of impacts on porosity requires knowledge of how it is distributed (range of apparent diameters (AD) and their shape). The use of micromorphological techniques

allows the study of macroporosity ($>60\ \mu\text{m}$) in soil thin sections (Loaiza et al., 2015) and even the mesoporosity which, in this study, is associated with AD between 30 and 60 μm .

The double-annual forage cropping system increases machinery traffic over soil in comparison with a single annual crop system. Harvesting implies the carrying off of a substantial weight of fresh plant material, which is maximized when two cuts per crop are done (e.g. ryegrass). The traffic over the soil surface can cause compaction (Raghavan et al., 1990) and a decrease of soil porosity. In these intensive Mediterranean systems, there is only limited information available about the effect of organic fertilizers on macroporosity, since research has been mainly focused on cereal agricultural systems (Yagüe et al., 2016; Bosch-Serra et al., 2017) or on annual rotations (Domingo-Olivé et al., 2016) where pig slurry and cattle manure are used as fertilizers.

The hypothesis of this research is that the application of dairy cattle slurry (DCS) influences soil physical fertility. The study is carried out in the framework of a long-term experiment (2008–2016), under a dry Mediterranean climate. The main objective was to assess the effects of DCS, applied at different rates, on soil porosity and pore morphology.

5.2 Materials and methods

A fertilization experiment was established in 2008 in the Tallada d'Empordà, Girona, NE of Spain (altitude 18 m a.s.l., 42 ° 03' 02" N, 03° 03' 37" E) and was maintained for nine years (until 2016). The current study was conducted at the end of the 2016 cropping season.

5.2.1 Soil and climatic characteristics

The soil was classified as Oxiaquic Xerofluvent (Soil Survey Staff, 2014) and the family particle-size class was coarse-loamy. The surface soil horizon (0–0.30 m) had a loam texture (485 g sand kg^{-1} , 405 g silt kg^{-1} and 110 g clay kg^{-1}), a pH (potentiometry, water 1:2.5; w:v) of 8.2, an electrical conductivity (1:5, 25°C, w:v) of 0.18 dS m^{-1} , an organic matter content (Walkley-Black method) of 18 g kg^{-1} and 140 g kg^{-1} of equivalent calcium carbonate (Bernard's calcimeter method).

The area has a subhumic Mediterranean climate (Bosch-Serra et al., 2010). During the 2008–2016 period, the average annual temperature was 14.8°C, with a maximum daily average of 23.4°C registered in July, and a minimum daily average of 7.9°C registered in

January. The average annual precipitation and evapotranspiration (Allen et al., 1998) in the period 2008–2016 were 608 and 986 mm, respectively.

5.2.2 Experimental context

During the 2008–2013 period, a double-annual crop forage rotation: maize (*Zea mays* L.) – ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) was established. Forage maize was sown in spring (May) and it was harvested in autumn (September) at the doughy grain stage. Ryegrass was sown in autumn (September) and it was harvested at maximum biomass before coming into ears, first harvest was done in March and last harvest in May. In the 2013–2016 period, after the maize harvest, the rotation was modified and it included: rapeseed (*Brassica napus* L.) – grain maize (short cycle) – grain maize (long cycle) – rapeseed, which means four crops in three years. Rapeseed was sown in autumn (September) and it was harvested in June. Grain maize was sown in spring: (June, short cycle; April, long cycle) and it was harvested in October. Maize was irrigated (sprinkler system) during the spring – summer period and the rest of the crops were not irrigated. Stubble of rapeseed and maize (grain) was incorporated into the soil but the rest (stalks) was removed. Main tillage before sowing was done with a mouldboard or a disc harrow (~0.25 m deep).

The fertilization trial was designed as a randomized block, with three treatments and three repetitions per treatment (blocks). The plot surface area was 40 m² (5 m x 8 m). The treatments were: one control (without fertilizer) and two rates of DCS. The rates (\pm standard deviation) of DCS were 52 (\pm 10) and 77 (\pm 14) m³ ha⁻¹. These rates contributed to 170 and 250 kg N ha⁻¹, and they were distributed between two successive crops, prior to spring and autumn sowings (170DCS: 100 and 70 kg N ha⁻¹; 250DCS: 150 and 100 kg N ha⁻¹, respectively). The treatments with DCM were complemented in each rotation of two crops, with mineral N as topdressing (calcium ammonium nitrate, 27%) up to a total of 450 kg N ha⁻¹ for spring and autumn sowings (170DCS: 200 and 80 kg N ha⁻¹; 250DCS: 150 and 50 kg N ha⁻¹, respectively). The exception was the 2014-2015 cropping season where a summer crop (maize) was followed by a summer crop (maize) but the fertilization schedule for summer crops was maintained.

Previous to each application, a DCS sample was analysed. For the 2003–2016 period, the mean values (n = 15) of the DCS evaluated parameters were: pH of 8.4 (\pm 0.5) by potentiometry (1:5, soil:water), electrical conductivity (1:5, soil: water, at 25°C) 4.6 (\pm 2.7) dS m⁻¹, dry matter of 8.7% (\pm 2.9) over fresh matter (by gravimetry at 105°C) and 75.7% (\pm 5.0) of OM over dry matter (by ignition at 550°C). Thus, during the 2008–2016 period, prior

soil samplings, the 170DCS and 250 DCS plots have received an average amount of 50 Mg dry OM ha⁻¹ and 74 Mg dry OM ha⁻¹, respectively.

There were no significant differences between yields associated with the evaluated DCS treatments (data not shown) and yields in the control were 36% lower (as an average). In DCS treatments, the average forage yield as ryegrass (two cuts/cycle) and maize were 10 and 21 Mg dry matter ha⁻¹ (drying at 65°C), respectively; the grain yield average of rapeseed was of 2 Mg ha⁻¹ (9% moisture content) and the grain yield average of maize was 10 and 15 Mg ha⁻¹ (14% moisture content) for the short and long cycles, respectively.

5.2.3 Soil sampling and soil porosity analysis: pore-size distribution and shape

In June 2016 (~eight months after the last DCS application), after the winter crop (rapeseed) harvest, rectangular blocks (depth 0.06 m, 0.09 m wide and 0.20 m long) of undisturbed soil samples (n = 9) were obtained from each treatment. The blocks were dried at room temperature and impregnated with polyester resin with fluorescent dye (Uvitex ©). One vertical thin section (0.05 m wide, 0.13 m long) was made from each block according to the procedures described by Benyarku and Stoops (2005). From each thin section, two images (42 mm long x 31.5 mm wide) were obtained under two light scenarios: parallel polarized and crossed polarized. Cross polarized images were processed with the Olympus Stream program (Olympus, 2013) to obtain digital binary images. These images were used to analyse total porosity, which included pores with an apparent diameter (AD) >30 µm (the minimum threshold for the established procedure). From each image, the analysis of pore-size distribution was based on an open mathematical algorithm: the Quantim4 library program (Vogel, 2008). The area occupied by pores was divided into five intervals according to the pores' AD: 30–60 µm, 60–100 µm, 100–200 µm, 200–400 µm and >400 µm. The pore shape, when its AD was >60 µm, was analysed by means of four descriptors according to Ferreira and Rasband (2012): circularity, aspect ratio (AR), roundness (R) and solidity (S). The circularity $[4\pi \cdot (\text{pore area}) / (\text{pore perimeter})^2]$ indicates a perfect circle when it reaches the value of 1. The AR or the ratio of the ellipse adjusted to the pore (major axis/minor axis) is an index that describes the pore elongation, so that at higher values, the pores are more elongated. The roundness $[4 \cdot (\text{pore area}) / (\pi \cdot (\text{major axis})^2)]$ indicates whether the pore has rounded (leading to 1) or angled (leading to 0) edges. The solidity (area of the pore/convex area of the pore) assesses the roughness, irregularity and tortuosity of the pore walls (high values correspond to smooth pores and low ones to rough pores).

5.2.4 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SAS program (SAS Institute, 2012). The analysis of variance (ANOVA) was carried out after verifying the assumptions of normality and homogeneity of variances. Porosity percentages between 200–400 μm and $>400 \mu\text{m}$, were normalized by the square root transformation and for the range 30–60 μm they could not be normalized. The solidity data in the 60–100 μm range could also not to be normalized. When the analysis detected significant differences, the means were compared by the Least Significant Difference (LSD) test, at the 0.05 probability level.

5.3 Results

The different fertilizer treatments had a significant influence on the porous area (pores with AD $>30 \mu\text{m}$) and on their distribution in the different ranges (Table 5.1). The porosity in 250DCS (25.6%) significantly increased (nearly doubled) when comparing with the control and 170DCS (Table 5.2). Differences were maintained in three different AD ranges of pores: 60–100 μm , 100–200 μm and 200–400 μm (Table 5.2). The control and 170DCS only significantly differed in the range of AD of pores greater than 400 μm , where 170DCS had a higher percentage (Table 5.2). These porosity differences between treatments were also qualitatively observed in the images from thin soil sections (Figure 5.1).

The evaluated pore shape descriptors showed significant differences (Table 5.3). The application of DCS led to decreases in the solidity in pores with an AD greater than 100 μm ; the circularity was also reduced but only above AD of 200 μm , while the roundness decreased in the pore range from 60 to 200 μm (Table 5.4). Finally, when DCS was applied, the aspect ratio (AR) increased in the AD pore range of 100–200 μm (Table 5.4).

Table 5.1. Analysis of variance (DF= degrees of freedom, MS = mean squares, *P* = probability value) of the porosity (>30µm) and their pore apparent diameter (AD) distribution (%) according to the fertilization treatments (TR).

Source	>30 µm		60–100 µm		100–200 µm		200–400 µm		>400 µm		
	DF	MS	<i>P</i>	MS	<i>P</i>	MS	<i>P</i>	MS	<i>P</i>	MS	<i>P</i>
Between TR	2	311.91	<0.0001	5.22	0.0003	35.31	0.0002	1.88	<0.0001	2.25	<0.0001
Between blocks	2	55.77	0.002	0.28	0.37	5.66	0.07	0.56	0.004	0.36	0.04
Between samples of TR	3	20.85	0.03	0.25	0.43	1.11	0.59	0.06	0.44	0.43	0.02
Within samples (residual)	10	4.64		0.25		1.64		0.06		0.08	

^a The percentage pores with an AD between 30-60 µm could not be normalized.

Table 5.2. Average porosity (>30µm) values (%)^a (n = 6) and its distribution in different pore apparent diameter ranges^b for each fertilization treatment^c.

Treatments	Porosity (%)								
	>30 µm		60–100 µm		100–200 µm		200–400 µm		>400 µm
Control	12.2 B	1.67	3.29 B	4.65 B	2.14 (1.40)B	0.44 (0.60)C			
170DCS	14.1B	2.29	3.65 B	4.06 B	2.26 (1.47)B	2.16 (1.42)B			
250DCS	25.6 A	2.78	5.05 A	8.53 A	5.85 (2.40)A	3.43 (1.80)A			

^a Numbers in brackets are $x^{0.5}$ transformed values. Mean values in columns followed by different letters are significantly different according to the LSD test at 0.05 probability level.

^b The 30–60µm diameter interval does not fit the normal assumption for ANOVA.

^c Treatments: control (without N) and dairy cattle slurry fertilization (DCS) where numbers indicate the N applied rates of 170 or 250 kg ha⁻¹ year.

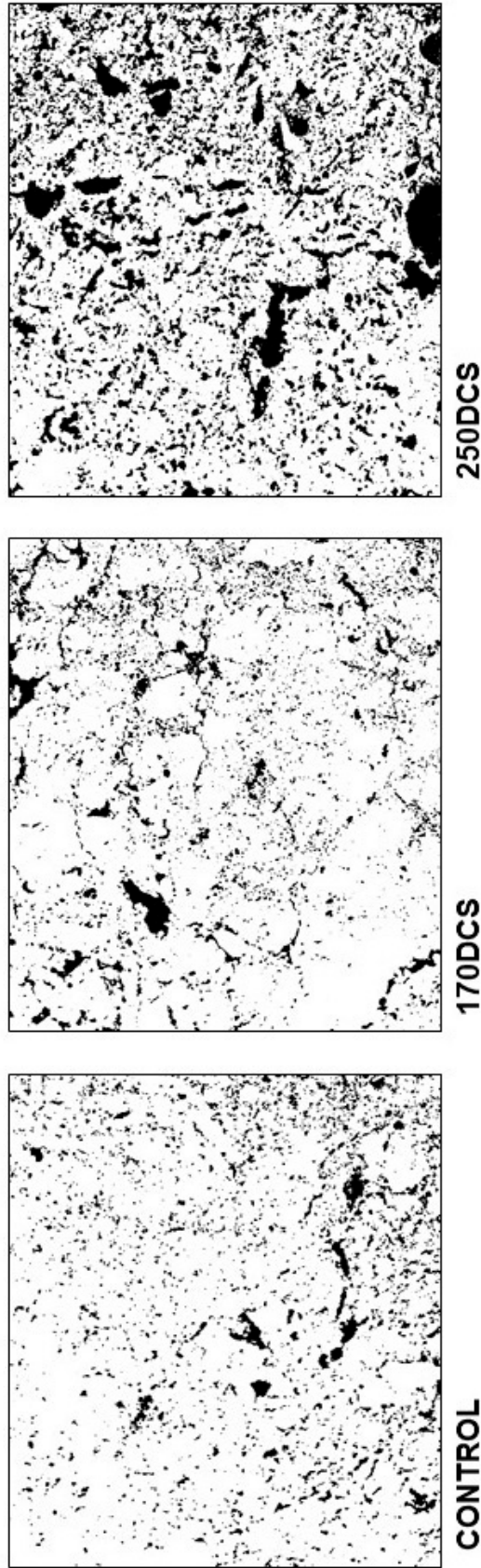


Figure 5.1. Porosity images (black color) from thin sections, vertically orientated from the soil surface, and for the different fertilizer treatments: Control (without slurry addition), dairy cattle slurry at a rate of 170 kg N ha⁻¹ (170DCS) or 250 kg N ha⁻¹ (250DCS). Image size was 42.0 mm long and 31.5 mm width.

Table 5.3. Analysis of variance (DF= degrees of freedom, MS = mean square, *P* = probability value) of different shape descriptors for each fertilization treatment (TR) and for the different ranges of pore apparent diameters (AD).

Pore-size (AD)	Shape pore descriptors			Circularity			Solidity ^a			Aspect ratio			Roundness		
	Source	DF	MS	<i>P</i>	MS	<i>P</i>	MS	<i>P</i>	MS	<i>P</i>	MS	<i>P</i>	MS	<i>P</i>	
60–100 μm	Between TR	2	0.001	0.07	-	-	0.026	0.05	0.004	0.04	0.004	0.04	0.004	0.04	
	Between blocks	2	1.2E ⁻⁴	0.75	-	-	0.002	0.77	2.4E ⁻⁴	0.79	2.4E ⁻⁴	0.79	2.4E ⁻⁴	0.79	
	Between samples of TR	3	4.0E ⁻⁴	0.42	-	-	0.004	0.62	5.4E ⁻⁴	0.66	5.4E ⁻⁴	0.66	5.4E ⁻⁴	0.66	
	Within samples (residual)	10	4.0E ⁻⁴		-	-	0.007		9.9E ⁻⁴		9.9E ⁻⁴		9.9E ⁻⁴		
100–200 μm	Between TR	2	0.004	0.05	5.4E ⁻⁴	0.02	0.032	0.01	0.003	0.02	0.003	0.02	0.003	0.02	
	Between blocks	2	1.0E ⁻⁴	0.89	5.6E ⁻⁶	0.94	5.1E ⁻⁴	0.90	5.6E ⁻⁶	0.99	5.6E ⁻⁶	0.99	5.6E ⁻⁶	0.99	
	Between samples of TR	3	4.1E ⁻⁴	0.70	9.4E ⁻⁵	0.42	0.004	0.50	3.0E ⁻⁴	0.61	3.0E ⁻⁴	0.61	3.0E ⁻⁴	0.61	
	Within samples (residual)	10	8.7E ⁻⁴		9.2E ⁻⁵		0.005		4.7E ⁻⁴		4.7E ⁻⁴		4.7E ⁻⁴		
200–400 μm	Between TR	2	0.007	0.006	0.003	0.008	0.013	0.21	5.4E ⁻⁴	0.22	5.4E ⁻⁴	0.22	5.4E ⁻⁴	0.22	
	Between blocks	2	1.4E ⁻⁴	0.84	7.2E ⁻⁵	0.81	0.009	0.34	2.7E ⁻⁴	0.44	2.7E ⁻⁴	0.44	2.7E ⁻⁴	0.44	
	Between samples of TR	3	7.7E ⁻⁴	0.45	2.3E ⁻⁴	0.59	0.002	0.86	7.2E ⁻⁵	0.87	7.2E ⁻⁵	0.87	7.2E ⁻⁵	0.87	
	Within samples (residual)	10	8.1E ⁻⁴		3.4 ⁻⁴		0.007		3.1E ⁻⁴		3.1E ⁻⁴		3.1E ⁻⁴		
>400 μm	Between TR	2	0.005	0.002	0.004	0.003	0.029	0.07	6.5E ⁻⁴	0.07	6.5E ⁻⁴	0.07	6.5E ⁻⁴	0.07	
	Between blocks	2	7.1E ⁻⁴	0.26	9.3E ⁻⁴	0.12	0.013	0.26	4.2E ⁻⁴	0.16	4.2E ⁻⁴	0.16	4.2E ⁻⁴	0.16	
	Between samples of TR	3	2.7E ⁻⁴	0.63	1.4E ⁻⁴	0.76	0.002	0.86	1.9E ⁻⁴	0.44	1.9E ⁻⁴	0.44	1.9E ⁻⁴	0.44	
	Within samples (residual)	10	4.6 E ⁻⁴		3.5E ⁻⁴		0.009		1.9E ⁻⁴		1.9E ⁻⁴		1.9E ⁻⁴		

^a The solidity values for pores with an AD between 60–100 μm have not been normalized.

Table 5.4. Average values^a of the pore shape descriptors for each fertilization treatment^b and for the different ranges of apparent pore diameters.

Pore-size (AD)/ Treatments	Shape pore descriptors			
	Circularity	Solidity	Aspect ratio	Roundness
60-100 μm				
Control	0.938	0.875	1.440	0.742A
170DCS	0.910	0.865	1.565	0.690B
250DCS	0.917	0.871	1.540	0.702AB
100-200 μm				
Control	0.797	0.860A	1.807B	0.618A
170DCS	0.752	0.842B	1.945A	0.577B
250DCS	0.758	0.847B	1.915A	0.587B
200-400 μm				
Control	0.595A	0.793A	2.053	0.548
170DCS	0.530B	0.751B	2.014	0.530
250DCS	0.542B	0.762B	2.072	0.543
>400 μm				
Control	0.348A	0.662A	2.243	0.512
170DCS	0.300B	0.617B	2.221	0.517
250DCS	0.293B	0.620B	2.113	0.532

^a Mean values in columns followed by different letters are significantly different according to the LSD test at 0.05 probability level.

5.4 Discussion

The significant increase of the porous area (>30 μm) in the 250DCS treatment (49% higher than 170DCS and the control, Table 5.2) agree with the findings of Pagliai and Antisari (1993) about the increase in soil porosity percentage associated with high doses of pig slurry applications (300 $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$) in a maize crop. Mellek et al. (2010) when applying DCS (180 $\text{m}^3 \text{ha}^{-1} \text{year}^{-1}$) in a double-annual cropping system, attributed these porosity changes to the direct effects of the OM incorporation, among which were the improvement of the aggregation and the decrease of the soil bulk density, and their indirect effects among which were a higher root density that, after decomposition, increased the porous space. The OM soil addition from slurries is low when compared with other solid organic wastes (Domingo-Olivé et al., 2016), so the 170DCS did not supply enough OM to make an improvement in soil porosity detectable. However, a porosity increase (>30 μm) was detected at the higher dose of 250DCS (Table 5.2). This increase is advantageous for the soil-water-plant relationship, and for the maintenance of a good soil structure. In addition, in soil superficial layers (first 0.05 m), it could reduce superficial compaction (Pagliai and Antisari, 1993;

Regelink et al., 2015) and assure the different soil services such as gaseous exchange (Adhikari and Hartemink, 2016).

Our results emphasize that the pore range between 60 and 400 μm is sensitive to the fertilizer type and rate applied, and therefore this range could be introduced as an indicator of physical soil quality. In addition, at the 250DCS rate, the porosity increase was distributed among different ranges, which enhances the different functionality of pores (Shaxson and Barber, 2005), both in water storage (30–60 and 60–100 μm , Table 2), and in the water and air fluxes, as a guarantee of their improved supply to roots and microorganisms (Shaxson and Barber, 2005; Feeney et al., 2006). Finally, the increment in the pore range between 100 and 400 μm (Table 5.2) is important to avoid any constraint in root development and growth (Oades, 1984; Shaxson and Barber, 2005), since the root hairs usually have diameters between 0.1 and 0.3 mm.

The porosity linked to AD >400 μm increases gradually, from the control, with the rate of DCS applied (Table 5.2). In a broad sense, these pores usually result from soil fauna activity, mainly earthworm activity (Shaxson and Barber, 2005; Sauzet et al., 2017). The incorporation of organic fertilizers such as DCS stimulates microbial activity (De Giusquiani et al., 1995; Goede et al., 2003; Yazdanpanah et al., 2016) and increases macrofauna which changes the soil surface layer, increasing the presence of large pores (Lamandé et al., 2003; Falco and Coviella, 2016). Thus, it results in structural improvement. In contrast, its decrease, as shown in the control (>400 μm , Table 5.2), can be related to compaction problems (Lamandé et al., 2003) and lower soil faunal activity. The large pores (>400 μm) in the 250DCS treatment do not correspond to cracks, which are commonly associated with low levels of soil OM contributions (Bosch-Serra et al., 2017).

Changes in pore shapes were observed, regardless of the DCS applied rate (Table 5.4). Dairy cattle slurry increased the elongation (AR, 100–200 μm , Circularity, 200–400 μm and >400 μm , Table 5.4), angularity and roughness (R, 100–200 μm ; S, 200–400 μm and >400 μm , Table 5.4) of pores. These changes could result in an increase in soil water holding capacity, leading to better water management efficiency, as well as facilitating the soil penetration by roots (Pagliai and Antisari, 1993; Giusquiani et al., 1995; Marinari et al., 2000; Yagüe et al., 2016). This fact is of particular relevance in intensive systems, with a substantial machinery traffic because that annually doubles or triples when compared with a single annual crop. Also, when the soil is wet, the elongated pores with rough and irregular walls are more difficult to seal than the circular and smooth ones. Thus, in the face of activities favouring disaggregation (transit of machinery, impact of raindrops or irrigation),

they would not be totally closed, i.e. the circulation of fluids would not be compromised (Pagliai and Vignozzi, 2002; Morrás, 2015).

Our results support the option of considering, in intensive systems, the application of 250 kg N ha⁻¹ (split into winter and summer crops) of organic origin (through contributions of DCS) to improve soil physical fertility. Our findings reinforce the positive evaluation of this rate, from the agronomic point of view, reported by other authors (Perramon et al., 2016, 2017) in similar agricultural systems.

5.4 Conclusions

In a coarse loam soil, when an intensive production system is introduced, the DCS rate equivalent to 250 kg N ha⁻¹ (split into winter and summer crops) increased porosity (AD greater than 30 µm) up to 26%. This figure almost doubled with respect to the one (14%) found at the lower rate of 170 kg N ha⁻¹; the latter did not differ from the control. Slurries, independently of the rate and compared with the control, mainly increased the presence of pores with an AD greater than 400 µm. This fact acts as a warning of the potential existence of compaction problems when OM is not applied. In addition, changes in the pore shape by DCS (roughness and elongation increases) would favour water retention, which is important in winter rainfed crops. These results confirm that in a double cropping programme, the application of DCS at an equivalent rate of to 250 kg N ha⁻¹ could prevent compaction (increases macroporosity) despite the intensity of machinery traffic, while it helps to slow down the potential drainage of infiltrated water by increasing the tortuosity of the pores.

Acknowledgments

The authors thank the staff of the micromorphology service from Lleida University. This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the Spanish National Institute for Agricultural Research and Experimentation (MINECO-INIA) through the projects RTA2013-57-C5-5 and RTA2017-88-C3-3.

References

- Adhikari, K., Hartemink, A.E., 2016. Linking soils to ecosystem services - A global review. *Geoderma*. 262, 101–111.
- Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M., 1998. Crop Evapotranspiration. Guidelines for Computing Crop Water Requirements. *FAO Irrig. and Drain*. 56, 65–77.
- Benyarku, C.A., Stoops, G., 2005. Guidelines for preparation of rock and soil thin sections and polished sections. Lleida (SP): Quaderns DMACS 33, Ed. Universitat de Lleida.
- Bosch-Serra, À.D., Yagüe, M.R., Poch, R.M., Molner, M., Junyent, B., Boixadera, J., 2017. Aggregate strength in calcareous soil fertilized with pig slurries. *Eur. J. Soil Sci.* 68, 449–461.
- Bosch-Serra, A.D., 2010. Nitrogen use efficiency in rainfed Mediterranean agriculture. In: Lal, R., editor. *Encyclopedia of Soil Science*. CRC Press LLC, 1-6.
- De Goede, R.G.M., Brussaard, L., Akkermans, A.D.L., 2003. On-farm impact of cattle slurry manure management on biological soil quality. *NJAS - Wageningen J. Life Sci.* 51, 103–133.
- Domingo-Olivé, F., Bosch-Serra, À.D., Yagüe, M.R., Poch, R.M., Boixadera, J., 2016. Long term application of dairy cattle manure and pig slurry to winter cereals improves soil quality. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 104, 39–51.
- European Union, 1991. Council Directive 91/676/EEC, of 12 December 1991, concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. *Off. J. Eur. Communities*. L375, 1–8.
- European Union, 2013. Regulation (EU) No. 1306/2013 of the European Parliament and of the council of 17 December 2013 on the financing, management and monitoring of the common agricultural policy and repealing Council Regulations (EEC) No 352/78, (EC) No 165/94, (EC) No 2799/98, (EC) No 814/ 2000, (EC) No 1290/2005 and (EC) No 485/2008. *Off. J. Eur. Commun.* L347, 549–607.
- Falco, L., Coviella, C., 2016. Contribution of *Amyntas gracilis* (Megascolecidae) and *Octolasion cyaneum* (Lumbricidae) to soil physical stability: a mesocosm experiment. *Rev. Fac. Cienc. Agrar., Univ. Nac. Cuyo*. 48, 115-127.
- Feeney D.S., Crawford, J.W., Daniell, T., Hallett, P.D., Nunan, N., Ritz, K., Rivers, M., Young, I.M., 2006. Three-dimensional microorganization of the soil-root-microbe system. *Microb. Ecol.* 52, 151–158.
- Ferreira, T., Rasband, W., 2012., ImageJ user guide. IJ 1.46r. [accessed 2018 Jul 10] <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>
- Giusquiani, P.L., Pagliai, M., Gigliotti, G., Businelli, D., Benetti, A., 1995. Urban waste compost: effects on physical, chemical, and biochemical soil properties. *J. Environ. Qual.* 24, 175–182.
- Jones, R.J.A., Hiederer, R., Rusco, E., Loveland, P.J., Montanarella, L., 2004. The map of organic carbon in topsoils in Europe, Version 1.2, September 2003: Explanation of Special Publication Ispra 2004 No.72 (S.P.I.04.72). Luxembourg (LU): European Soil Bureau Technical Report EUR 21209. Office for Off. J. Eur. Communities. [accessed 2018 Jun 16]

<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC28299/EUR%2021209%20EN.pdf>.

- Lamandé, M., Hallaire, V., Curmi, P., Pérès, G., Cluzeau, D., 2003. Changes of pore morphology, infiltration and earthworm community in a loamy soil under different agricultural managements. *Catena* 54, 637–649.
- Loaiza, J. C., Stoops, G., Poch, R. M., Casamitjana, M., 2015. *Manual de Micromorfología de Suelos y Técnicas Complementarias*. Medellín (CO): Ed. Pascual Bravo Fondo Editorial.
- Marinari, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Grego, S., 2000. Influence of organic and mineral fertilisers on soil biological and physical properties. *Bioresour. Technol.* 72, 9–17.
- Mellek, J.E., Dieckow, J., da Silva, V.L., Favaretto, N., Pauletti, V., Vezzani, F.M., de Souza, J.L.M., 2010. Dairy liquid manure and no-tillage: Physical and hydraulic properties and carbon stocks in a Cambisol of Southern Brazil. *Soil Tillage Res.* 110, 69–76.
- Morrás, H. J. M., 2015. Porosidad y microestructura de suelos. In: Loaiza, J. C., Stoops, G., Poch, R. M., Casamitjana, M. editores. *Manual de Micromorfología de Suelos y Técnicas Complementarias*. Medellín (CO): Ed. Pascual Bravo Fondo Editorial; p. 205–260.
- Oades, J.M., 1984. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant Soil.* 76, 319–337.
- Olympus, 2013. Olympus Stream. Analysys software. Version 510_UMA_OlyStream19-Krishna. Münster (DE).
- Pagliai, M., Antisari, L., 1993. Influence of waste organic matter on soil micro-and macrostructure. *Bioresour. Technol.* 43, 205–213.
- Pagliai, M., Nobili, M., 1993. Relationships between soil porosity, root development and soil enzyme activity in cultivated soils. *Geoderma* 56, 243–256.
- Pagliai, M., Vignozzi, N., 2002. Image analysis and microscopic techniques to characterize soil pore systems. In: Blahovec, J. Kutilek, M., editors. *Physical methods in agriculture: approach precision and quality*. New York (NY): Springer; p. 13–38.
- Pagliai, M., Vignozzi, N., Pellegrini, S., 2004. Soil structure and the effect of management practices. *Soil Tillage Res.* 79, 131–143.
- Pagliai, M., Vignozzi, N., 2006. Soil porosity as an indicator of soil health. *Ann. Arid Zone.* 45, 259–286.
- Perramon, B., Bosch-Serra, Á.D., Domingo, F., Boixadera, J., 2016. Organic and mineral fertilization management improvements to a double-annual cropping system under humid Mediterranean conditions. *Eur. J. Agron.* 76, 28–40.
- Perramon, B., Bosch-Serra, Á.D., Domingo, F., Boixadera, J., 2017. The efficiency of nitrogen in cattle manures when applied to a double-annual forage cropping system. *Grass Forage Sci.* 72, 676–690.
- Perramon, B., Domingo-Olivé, F., Bosch-Serra, À.D., 2018. Double-annual forage crop rotation controls nutrient surpluses in N based organic fertilization. *Agron. J.* 110, 2268–2276.

- Raghavan, G.S.V., Alvo, P., McKyes, E., 1990. Soil Compaction in Agriculture: A View Toward Managing the Problem. In: Lal, R., Stewart, B A., editors. Soil degradation. Advances in Soil Science 11. New York (NY): Springer; p. 1–36.
- Ramos, M.C., Quinton, J.N., Tyrrel, S.F., 2006. Effects of cattle manure on erosion rates and runoff water pollution by faecal coliforms. *J. Environ. Manage.* 78, 97–101.
- Regelink, I.C., Stoof, C.R., Rousseva, S., Weng, L., Lair, G.J., Kram, P., Nikolaidis, N. P., Kercheva, M., Banwart, S., Comans, R.N.J., 2015. Linkages between aggregate formation, porosity and soil chemical properties. *Geoderma*. 247–248, 24–37.
- SAS Institute, 2012. SAS/TAT. Software V 9.4 SAS Inst., Cary, NC.
- Sauzet, O., Cammas, C., Gilliot, J.M., Bajard, M., Montagne, D., 2017. Development of a novel image analysis procedure to quantify biological porosity and illuvial clay in large soil thin sections. *Geoderma* 292, 135–148.
- Shaxson, F., Barber, R., 2005. Optimización de la humedad del suelo para la producción vegetal. El significado de la porosidad del suelo. *Boletín de suelos de la FAO* 79, 9–26.
- Soil Survey Staff, 2014. Keys to soil taxonomy. 12th ed. Washington, DC. (US): U. S. Gov. Print. Office.
- Vogel, H.J., 2008. Quantim4 C/C++ Library for scientific image processing. Software. UFZ – Helmholtz Center for Environmental Research. Germany (DE).
- Yagüe, M.R., Domingo-Olivé, F., Bosch-Serra, À.D., Poch, R.M., Boixadera, J., 2016. Dairy cattle manure effects on soil quality: porosity, earthworms, aggregates and soil organic carbon fractions. *Land Degrad. Develop.* 27, 1753–1762.
- Yazdanpanah, N., Mahmoodabadi, M., Cerdà, A., 2016. The impact of organic amendments on soil hydrology, structure and microbial respiration in semiarid lands. *Geoderma* 266, 58–65.

Capítulo 6

Discusión general

La fertilización orgánica de los cultivos, es una alternativa para reducir o sustituir la dependencia de fertilizantes minerales, manteniendo o incrementando los rendimientos, además del reciclaje de nutrientes en el sistema agrario. Pero su utilización presenta implicaciones ambientales a corto y largo plazo tras la aplicación que deben ser evaluadas. La aplicación de purín porcino, debido a sus características, presenta un efecto a corto plazo (e.g. primeras horas tras aplicación) que implica emisiones de NH_3 a la atmósfera con efectos nocivos para el medio ambiente (lluvia ácida) y salud humana (formación partículas que acceden al sistema respiratorio), y también supone una reducción de su valor fertilizante. Esto tiene implicaciones directas en la eficiencia del uso del N cuando fertilizamos con este tipo de orgánicos. Evaluar técnicas de mitigación de NH_3 que pueden implementarse en suelos mediterráneos como son el método (e.g. tubos colgantes vs. abanico) y el momento de aplicación (e.g. fondo vs. cobertera) permiten reducir emisiones y contribuirán a cumplir con los compromisos de reducción asumidos por España como país miembro de la UE.

La aplicación de fertilizantes orgánicos (e.g. purines, compost de lodos) se realiza de forma continuada a largo plazo, debido a que en las zonas en que se producen se incluyen en los planes de fertilización. Con la adición de orgánicos se aportan nutrientes, MO, y otros elementos (e.g. metales pesados) que dependiendo de su composición influyen en propiedades del suelo. La evaluación de la calidad del suelo se realiza a través de algunas de sus propiedades físicas y biológicas tras el aporte de orgánicos a largo plazo. Se utilizan indicadores como la porosidad (total, forma y tamaño de poros) y la presencia de lombrices (abundancia, biomasa y diversidad). La evaluación de las propiedades con estos indicadores de suelo permite conocer qué prácticas de fertilización orgánica son sostenibles, acorde con el objetivo de estrategia temática del suelo de la UE (Unión Europea, 2012) de proteger y explotar de forma sostenible el suelo, evitando su degradación (e.g. contaminación, compactación, acidificación, desertificación) y preservando sus funciones (e.g. biodiversidad, almacenamiento de agua, suministro de alimentos, etc.).

6.1 Calidad ambiental: evaluación de las pérdidas de NH_3 por volatilización y estrategias de mitigación

6.1.1 Fertilización con purín porcino en presiembra (suelo desnudo)

Los estudios publicados sobre emisiones de amoníaco post-aplicación de purín porcino en condiciones Mediterráneas son escasos: Morvan et al. (1997); Sanz et al. (2010); Yagüe y Bosch-Serra (2013); Bosch-Serra et al. (2014) y han registrados pérdidas entre 16 a 65% del N amoniacal aplicado. Los resultados obtenidos en el ensayo de esta tesis indicaron que en el caso de aplicaciones en fondo de cereal de invierno, suelo desnudo, las pérdidas del N por emisiones en forma de amoníaco resultaron relativamente bajas, comparadas a los estudios anteriores, entre 3 a 4% del N amoniacal aplicado (equivalente 2–3 kg N-NH₃ ha⁻¹).

Las bajas emisiones de amoníaco obtenidas no estuvieron asociadas a los métodos de aplicación estudiados, abanico (AB) o tubos colgantes (TC), presumiblemente esto está estrechamente vinculado a otros condicionantes como al bajo contenido de materia seca (MS) del purín aplicado, que junto con un bajo contenido de humedad superficial ($\leq 40\%$ de agua en relación a la humedad de saturación), y el rápido enterrado con el laboreo, comportan una rápida infiltración del purín en el suelo. Esta situación de rápida infiltración en condiciones de baja MS del purín beneficia más a AB que TC, debido a que en TC al reducir superficie de emisión aumenta la MS (MS mayor por unidad de superficie exposición) y por tanto, se reduce la infiltración del purín en el suelo, en cambio en AB al aumentar la superficie de exposición, se reduce la MS y por tanto se incrementa la infiltración (Hafner et al., 2018). En aplicaciones en suelo desnudo también es importante considerar la rugosidad de la superficie de aplicación. Según Bell et al. (2016), el bajo contenido de MS y la rugosidad del suelo reduce la efectividad de los TC debido a que aunque reduce la superficie emisora para las pérdidas de amoníaco también la superficie para la infiltración, y en esta situación no hay efecto del método TC respecto al superficial.

Los factores relacionados a características del purín y condiciones del suelo ya fueron descritos como condicionantes de bajas emisiones de amoníaco por autores como Sommer et al. (2003), Misselbrook et al. (2005) y Bosch-Serra et al. (2014) y recientemente Hafner et al. (2018), y por lo tanto, son importantes para mitigar las pérdidas de N, y en nuestras condiciones resultaron ser muy relevantes. Por otra parte, las condiciones ambientales durante la aplicación también juegan un papel crucial para reducir la emisiones de amoníaco, baja velocidad del viento, baja temperatura y alta humedad (Sommer et al., 2003; Huijsmans et al., 2003; Carozzi et al., 2013). Al igual que en esta tesis, estudios previos (Malgeryd et al., 1998; Misselbrook et al., 2002), en aplicaciones a suelo desnudo, no han encontrado reducciones significativas de amoníaco con TC comparado con AB. Sin embargo, aunque las emisiones de amoníaco no fueron

diferentes entre los métodos, los menores valores de emisiones se registraron con el uso de TC. Esto se explica por qué las aplicaciones con TC se realizan en bandas, lo que disminuye la superficie de exposición de purín con respecto a AB que impregna toda la superficie y, por tanto, las emisiones también disminuyen al tener menor superficie en contacto a condiciones ambientales adversas, argumentos también descritos por NEIKER (2013) y Viguria et al. (2015). En concordancia con Misselbrook et al. (2002), TC reduce los picos máximos de emisión registrada a las primeras horas tras la aplicación.

Las emisiones de amoníaco presentaron la tendencia típica después de la aplicación del purín, es decir, la tasa de pérdida fue alta inmediatamente después de la aplicación y posteriormente decrece, favorecida por la incorporación del purín al suelo como es detectada por muchos autores (Carozzi et al., 2013; Yagüe y Bosch-Serra, 2013; Viguria et al., 2015; Ferrara et al., 2016). El momento de máxima emisión se registró dentro de las primeras 4 horas tras la aplicación del purín, en consonancia a lo detectado por Yagüe y Bosch-Serra (2013) en similares condiciones. La incorporación de purín lo más inmediatamente posible tras la aplicación resulta ser una eficiente técnica de mitigación de emisiones de amoníaco y, por lo tanto, contribuye a aumentar la disponibilidad de N para el cultivo, el retraso en esta práctica podría comprometer su eficiencia (Carozzi et al., 2013; Viguria et al., 2015; Ferrara et al., 2016). Por lo que nuestros resultados confirman la necesidad de incorporar con prontitud el purín tras la aplicación dentro de las cuatro primeras horas posteriores a la aplicación recomendado en la Directiva Europea 2016/2284 (Unión Europea, 2016).

6.1.2 Fertilización con purín porcino en cobertera (cultivo)

Las evaluaciones de pérdidas de N por emisiones de amoníaco tras su aplicación en cereales de invierno en crecimiento (ahijamiento) son muy escasas: Sommer et al. (1997) y Meade et al. (2011). Generalmente estas pérdidas se estiman por el estudio de la eficiencia de N (Petersen, 1996; Sieling, 1998), y mayoritariamente con pastos en condiciones del norte de Europa y con suelos diferentes a las nuestros. Sin embargo, en condiciones del Mediterráneo semiárido, la aplicación de purín de cerdo (el estudio incluye el uso de AB) en cobertera (etapa de ahijamiento) en cereales de invierno, ha demostrado ser más eficiente agronómicamente y ambientalmente respetuoso que las aplicaciones en pre-siembra (Bosch-Serra et al., 2015).

En condiciones de aplicaciones en cobertera, la impregnación del cultivo con el purín es uno de los factores que inciden en las pérdidas de N (Sommer y Hutchings, 2001).

Cuando se aplica purín sobre un cultivo implementado este interactúa en mayor o menor medida según el método de aplicación, por la impregnación en toda la superficie o en forma localizada. En la etapa de ahijado de los cereales y en las aplicaciones realizadas con TC, al depositar el purín entre las hileras del cultivo, directamente sobre el suelo, este se infiltra rápidamente mientras que con el método de AB las plantas quedan impregnadas de purín, actuando éstas con una mayor superficie de exposición y por tanto, produce una mayor área de emisión de amoníaco. Además, en las aplicaciones con TC, también podrían significar una ventaja la captación de amoníaco, emitido desde el suelo, por el follaje de la plantas tal como apuntan otros autores (Sommer et al., 1993; Hoekstra et al., 2000; Schoninger et al., 2018) así como la reducción de la velocidad del viento dentro del dosel del cultivo (Sommer y Hutchings, 2001). Por ello, las aplicaciones con mangueras son más eficientes en reducir las emisiones de amoníaco en presencia de cultivo que el método de aplicación a toda la superficie (Malgeryd, 1998; Thorman et al., 2008).

Por la menor superficie de exposición y factores mencionados, la utilización de TC reduce significativamente las emisiones de amoníaco, en etapa de ahijamiento del cereal, en comparación con AB en las primeras 24h, y principalmente el flujo de emisión de amoníaco en las primeras 5 horas después de la aplicación (35 y 422 g N-NH₃ h⁻¹ ha⁻¹ para TC y AB respectivamente). Así, TC tuvo un efecto significativo en la reducción de emisiones de amoníaco respecto al método de AB (1,1 y 3,2 kg N-NH₃ ha⁻¹ TC y AB respectivamente), reducción equivalente al 66% del N total aplicado. Esta mitigación de amoníaco obtenida con el método TC en áreas semiáridas del Mediterráneo es muy importante ya que según Fanguero et al. (2018) las aplicaciones en bandas es una eficiente solución para la reducción de emisiones de amoníaco y se propone como alternativa al uso de inyectores, recomendados en la mayoría de los países europeos, cuyo uso es limitado debido a las problemáticas de suelos pesados y pedregosos. La mitigación de pérdidas de amoníaco con TC, se traduce en un incremento del valor fertilizante del orgánico y resulta en un incremento en el rendimiento de los cultivos (Huguenin-Elie et al., 2018).

Un aspecto particular, durante los muestreos de trampas de amoníaco, en esta tesis fue que tras 5h del inicio del ensayo hubo lluvias, que obligaron a cubrir las trampas, por lo que en la trampa superior en contacto directo con el ambiente, no permitieron obtener medidas de emisiones con el efecto de la lluvia. Pero sí se percibía la reducción de olor importante y el lavado de las hojas impregnadas de purín en el caso de la aplicación con AB. Por lo que en sistemas con disponibilidad de riego por aspersión, suministrar agua en

cantidades bajas (~7–10 mm) podría ser una técnica de mitigación a estudiar como alternativa para favorecer la infiltración del purín de forma inmediata tras las aplicaciones y además lavar las hojas impregnadas en el caso AB. En aplicaciones con urea, un riego posterior por aspersión de 7,6–16,0 mm reduce en más de un 80% las pérdidas de amoníaco (Black et al., 1987; Holcomb et al., 2011). Tras las lluvias las pérdidas de amoníaco acumuladas fueron similares entre ambos métodos TC y AB.

En una reciente revisión sobre estrategias de reducción de gases de efecto invernadero y otras problemáticas ambientales, como la emisión de amoníaco, en clima Mediterráneo solo se incluyen el método de inyección y la incorporación post-aplicación (Sanz-Cobena et al., 2017) como técnicas de mitigación, por lo que nuestro trabajo pone a disposición otras medidas de mitigación que podrían ser implementadas, especialmente si estas se realizan en aplicaciones en cobertera. Las estrategias de mitigación realizadas a campo en los sistemas agrícolas son claves porque no derivan en otras labores dentro de la cadena de producción (almacenamiento, manejo de alojamiento, etc) y podrían representar mejor coste para el agricultor que posee granjas (Webb et al., 2010; NEIKER, 2013).

En las aplicaciones en cobertera (con cultivo) o condiciones de siembra directa, en las que no es posible la utilización del laboreo para favorecer la incorporación del purín las estrategias como el uso de tubos colgantes, combinadas, cuando sea posible con la utilización de purín de bajo contenido de materia seca y un bajo contenido de humedad del suelo, son técnicas que podrían complementarse entre ellas para reducir las emisiones de amoníaco y que son de fácil implementación en buenas prácticas de fertilización por ser accesibles para los productores

6.2 Efecto de diferentes fertilizantes orgánicos y sistemas agrarios en las propiedades biológicas y físicas del suelo

6.2.1 Implicaciones de la fertilización orgánica a largo plazo en las lombrices del suelo y la bioturbación de las lombrices

En los sistemas agrarios, la respuesta del suelo al uso a largo plazo de fertilizantes orgánicos pueden ser biomonitorizadas, y los indicadores relacionados a la comunidad de lombrices de tierra son herramientas útiles para este fin (Paoletti et al., 1999). La aplicación continuada a largo plazo (12 y 19 años) de diferentes tipos de fertilizantes

orgánicos (purín de diferentes orígenes: cerdo en engorde y madres reproductoras y lodos compostados) no generaron cambios significativos en la abundancia y biomasa (caracterización a nivel global) de las lombrices de tierra respecto a la fertilización mineral convencional, en cambio, sí en la diversidad de especies. Los valores de abundancia y diversidad de especies, están acordes al mapa de comunidades de lombrices en Europa y coherentes con el potencial, vinculado a parámetros ambientales (alta evapotranspiración) y del suelo (bajo contenido de materia orgánica), de las zonas del Mediterráneo semiárido (Rutgers et al., 2016; Askoy et al., 2017).

Sin embargo en este contexto, en sistemas agrarios de cereales de secano, se ha evidenciado que las aplicaciones de alta dosis de purín de cerdo (sobrefertilización) y el uso de compost de lodos, independientemente de la dosis aplicada (incluida dosis agronómica) tienden a impactar negativamente en la comunidad de lombrices de tierra (su biomasa decrece). Además, en ambos casos, afecta significativamente a la diversidad de especies, *Nicodrilus trapezoides* (anécica) no se presenta quedando solo *Koinodrilus roseus* (endógea). Esto podría atribuirse a que estos casos pueden comportar acumulaciones de nutrientes o metales pesados que representan riesgos ecotoxicológicos para los lombrices de tierra (De la Torre et al., 2000; Manono, 2016) por lo que a medio o largo plazo no constituye una práctica sostenible. Las lombrices de tierra benefician la productividad del suelo y contribuyen al mantenimiento de la fertilidad física, química y biológica del suelo (Bhadauria y Saxena, 2010). Aunque la Directiva Europea 86/278/CEE limita el contenido de metales pesados en fertilizantes orgánicos a aplicar (Unión Europea, 1986), y los orgánicos utilizados cumplían la normativa, esta podría no ser una medida suficientemente protectora para el ecosistema del suelo. Estos límites en relación al contenido de metales pesados no se corresponden adecuadamente con la toxicidad potencial de los residuos a los invertebrados del suelo por lo sería recomendable que combinar análisis químicos y ecotoxicológicos que podrían contribuir a reducir el riesgo ambiental (Renaud et al., 2017).

La ausencia de *N. trapezoides* comporta una pérdida a nivel funcional de la comunidad de lombrices en el suelo. Las actividades de bioturbación de las lombrices de tierra y por tanto, su impacto en la estructura del suelo están estrechamente relacionadas a su grupo funcional (Pirón et al., 2017; Frazão et al., 2019). En ausencia de las anécicas (saprogeófagas), los bioporos son menos abundantes y principalmente, se reduce la bioturbación relacionada a los canales y cámaras (bioturbación tipo 1). La reducción de la bioturbación de este tipo (canales), que refleja las actividades de excavación incluida ingestión y deyección del materiales en el suelo (Jégou et al., 2000), podría comprometer

la adecuada mezcla del suelo con el material orgánico aplicado. Este es un punto importante, debido que las lombrices de tierra a través de mezcla, ingestión y deyección de materiales favorecen la descomposición de los residuos orgánicos e influyen en otros niveles de la cadena trófica del suelo, como en la actividad y diversidad microbiana y de la microfauna (Domínguez et al., 2009). Por otra parte, *K. roseus* (geófaga) demostró ser más resistente a perturbaciones y estuvo presente en todos los tratamientos (purines, lodos compostados, mineral y control). Generalmente, los fertilizantes orgánicos no afectan a las geófagas (Murchie et al., 2015; Onrust y Piersma, 2019).

Los resultados de este estudio, están en concordancia con Cluzeau et al. (2012) y enfatizan la relevancia de tener en cuenta no solo a la abundancia como bioindicador de la comunidad de lombrices de tierra, sino también otros parámetros como la diversidad de especies, los grupos y sus actividades funcionales, como herramienta en las evaluaciones del suelo. La integración de los bioindicadores en el monitoreo del suelo es necesaria (Askoy et al., 2017) para una mejor comprensión de los impactos de las actividades antrópicas y permite una visión integrada de los ecosistemas en los servicios ecosistémicos del suelo incluyendo la provisión de hábitat. Este aspecto está recogido en el reglamento de la CE 1783/2003 que establece un marco de buenas condiciones agrarias y medioambientales que pretenden contribuir entre otras a evitar el deterioro de hábitats, y amenazas como la erosión consideradas en la Política Agrícola Común (Unión Europea, 2013).

El área de bioturbación de las lombrices de tierra estuvo condicionada por el tipo y la calidad de la materia orgánica de los fertilizantes orgánicos aportados. Esta área bioturbada por las lombrices de tierra se incrementó con la aplicación de fertilizantes orgánicos, respecto a la fertilización mineral y suelo sin fertilización, ambas similares, indicando una baja actividad de lombrices de tierra que estarían asociadas a condiciones de suelo compactado (Pirón et al., 2017). Este hecho destaca la importancia del aporte de materia orgánica externa como fuente de alimento para las lombrices de tierra (Bertrand et al., 2015). El uso de purín de cerdo incrementa el área bioturbada respecto a la fertilización con compost de lodos, lo que podría relacionarse con la ausencia de un grupo funcional (*N. trapezoides*, anécica) según es detectado por otros autores (D'Hose et al., 2018; Whalen et al., 2008), con el valor nutritivo (calidad) de las enmiendas orgánicas frescas, que son más altas que en un compost (donde la materia orgánica está estabilizada por el proceso compostaje aeróbico), aunque la cantidad de materia orgánica aportada con el purín fue menor que con el compost. Recientemente, Onrust y Piersma (2019) observaron que los saprogeóseas, como *N. trapezoides*, pueden incrementarse

con aplicaciones de fertilizantes orgánicos de origen ganadero (estiércol de corral) con alta relación C/N, por lo que su ausencia podría estar relacionada a otras características del compost de lodos.

Para VandenBygaert et al. (2000), este incremento de bioturbación con purín de cerdo, es evidencia de mayor actividad de las lombrices de tierra. Esta mayor actividad de fauna, como ocurre en nuestros tratamientos fertilizados con purín de cerdo, influye en la microestructura del suelo (Morrás, 2015; Pirón et al., 2012), y en nuestro caso resultó en el desarrollo de una microestructura migajosa e incremento en la abundancia de los poros de empaquetamiento compuestos y cavidades en forma de estrella. Estos poros están relacionados con la acomodación de los excrementos, principalmente de lombrices de tierra (bioturbación tipo 2: excrementos agrupados y/o compactados), que favorecerían retención de agua (Lamandé et al., 2003) y mejorarían otros servicios ecosistémicos del suelo como el flujo de gases (Adhikari y Hartemink, 2016), aspectos claves en sistemas mediterráneos de secano. En cambio en los tratamientos que no recibieron fertilización orgánica (microestructura masiva, pocos bioporos, presencia de fisuras), se evidencia las condiciones de degradación de la estructura en el suelo tal como también las habían observado Pagliai (2003) y Bosch-Serra et al. (2017). Presumiblemente, esta falta de buenas condiciones físicas del suelo (estructura) en los tratamientos sin aporte de fertilización orgánica también pudo afectar a la comunidad de lombrices ya que en momento del muestreo se registró el menor porcentaje de lombrices juveniles, considerando que era la época activa de las lombrices de tierra.

Nuestros resultados, en base a las variables estudiadas, enfatizan la sostenibilidad a largo plazo de fertilización con purín de cerdo debido a que contribuye a una regeneración activa y una estructura favorable del suelo por el incremento de la actividad de las lombrices de tierra (bioturbación) y aunque no se refleje en la abundancia de individuos. La necesidad de vincular la evaluación de los tipos de poros, bioturbación de lombrices e indicadores biológicos ha sido mencionado por Pirón et al. (2017). Esta combinación de métodos cuantitativos (porcentaje bioturbación) y cualitativos (microestructura y tipos de poros) permite diferenciar entre la influencia de la actividad biológica y fisuras típicas de condiciones de compactación (sin y con fertilización mineral) sobre la macroporosidad que en cálculos de porosidad realizados por medio de software podría quedar enmascarados. Este aspecto referente a los beneficios de una descripción visual y cuantificación de las bioestructuras y de poros es enfatizado en Pirón et al. (2012). Por lo que es recomendable utilizar estos métodos como complemento al muestreo convencional de lombrices, abundancia, biomasa y diversidad, dado que en

sistemas de secano, contemplar solo el muestreo de lombrices resultaría sesgado para la valorar la actividad de este tipo de fauna del suelo.

6.2.2 Implicaciones de la fertilización orgánica a largo plazo en la porosidad y forma de poros del suelo

En sistemas intensivos de producción de forrajes, con doble cultivo anual desarrollados en zonas climáticas caracterizadas por altas pluviometrías y/o disponibilidad de riego para el cultivo de primavera, las labores con tránsito de maquinarias agrícolas en la parcela se incrementan (por ser dos cultivos y realización de varios cortes en el forraje verde), lo que puede afectar a las propiedades físicas del suelo como la porosidad ocasionando compactación. Por otra parte, el aprovechamiento en verde del forraje implica un bajo aporte de rastrojo al suelo lo que podría tener implicaciones negativas en del suelo.

En estos sistemas, en los que las necesidades de N de los cultivos son altas, se han estudiado estrategias de fertilización que incluyen la dosis de 250 kg N ha⁻¹ año⁻¹ procedente de fuentes orgánicas, para maximizar la reutilización de nutrientes procedentes de orgánicos. Perramon et al. (2016) en este tipo de sistemas intensivos de doble cultivo, han demostrado que esta estrategia (250 kg N ha⁻¹ año⁻¹ de fuentes orgánicas) durante 6 años garantiza la recirculación de nutrientes, incrementa las producciones, sin riesgo ambiental relacionado por pérdidas de N por lixiviación y sin riesgo significativo de acumulación de nutrientes en el suelo.

En nuestro ensayo realizado en base a esta tesis evaluamos como indicador la porosidad total, en diferentes rangos y parámetros de forma, concluyendo que el porcentaje de porosidad total (> 30 µm) ha mejorado significativamente en la dosis 250 kg N ha⁻¹ año⁻¹, casi duplicándose, en relación al uso de la dosis recomendada por la UE (170 kg N ha⁻¹ año⁻¹).

Este incremento de porosidad asociado a la utilización de fertilizantes orgánicos (purines) también ha sido descrito por otros investigadores (Pagliai y Antisari, 1993) y en estos sistemas intensivos, podría relacionarse al incremento de la materia orgánica del suelo que se logra con el uso de 250 kg N ha⁻¹ año⁻¹ en relación a 170 kg N ha⁻¹ año⁻¹ de fuentes orgánicas (Perramon et al., 2018). Los fertilizantes orgánicos incrementan la fracción ligera de materia orgánica relacionada con un incremento de estabilidad de los agregados (Domingo-Olivé et al., 2016; Yagüe et al., 2016), mejorando la estructura y la

porosidad. Además el incremento en la porosidad, en la estrategia de uso de 250 kg N ha⁻¹ año⁻¹ de fuentes orgánicas, fue equilibrado entre los distintos rangos de poros vinculados tanto al flujo de aire, agua y crecimiento radicular y, al igual que la dosis con purín 170 kg N ha⁻¹ año⁻¹, y esta estrategia le confiere a los poros mayor tortuosidad, rugosidad y elongación de los poros. Estos cambios en la formas de los poros, se relacionan con el movimiento del agua en el suelo, y son trascendentales porque mejoran la retención del agua en el suelo (Pagliai y Antisari, 1993; Pagliai y Vignozzi, 2006) y de especial importancia en suelos de texturas gruesas, como el nuestro con predisposición a un rápido drenaje. Los poros más rugosos y alargados permiten el movimiento del agua en suelo incluso cuando el este está mojado, mientras que los que carecen de estas características tienden a sellarse en estas circunstancias, retardando el movimiento del agua (Pagliai et al., 1984; Pagliai y Vignozzi, 2007).

Finalmente, estas mejoras en los aspectos relacionados con la porosidad, detectadas en la dosis 250 kg N ha año⁻¹ procedente de fuente orgánicas, también podrían vincularse con mejoras en condiciones de hábitat para la fauna del suelo (Morrás et al., 2015) y en una mayor acumulación de carbono en el suelo con esta dosis en doble cultivo (Perramón et al., 2018).

Referencias

- Adhikari, K., Hartemink, A.E., 2016. Linking soils to ecosystem services - A global review. *Geoderma* 262, 101–111.
- Aksoy, E., Louwagie, G., Gardi, C., Gregor, M., Schröder, C., Löhnertz, M., 2017. Assessing soil biodiversity potentials in Europe. *Sci. Total Environ.* 589, 236–249.
- Black A.S., Sherlock R.R., Smith N.P., 1987. Effect of timing of simulated rainfall on ammonia volatilization from urea, applied to soil of varying moisture-content. *J. Soil Sci.* 38, 679–687.
- Bell, M.J., Hinton, N.J., Cloy, J.M., Topp, C.F.E., Rees, R.M., Williams, J.R., Misselbrook, T.H., Chadwick, D.R., 2016. How do emission rates and emission factors for nitrous oxide and ammonia vary with manure type and time of application in a Scottish farmland? *Geoderma* 264, 81–93.
- Bertrand, M., Barot, S., Blouin, M., Whalen, J., de Oliveira, T., Roger-Estrade, J., 2015. Earthworm services for cropping systems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 553–567.
- Bhadauria, T., Saxena, K.G., 2010. Role of Earthworms in soil fertility maintenance through the production of biogenic structures. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2010, 1–7.
- Bosch-Serra, A.D., Ortiz, C., Yagüe, M.R., Boixadera, J., 2015. Strategies to optimize nitrogen efficiency when fertilizing with pig slurries in dryland agricultural systems. *Eur. J. Agron.* 67, 27–36.
- Bosch-Serra, À.D., Yagüe, M.R., Teira-Esmatges, M.R., 2014. Ammonia emissions from different fertilizing strategies in Mediterranean rainfed winter cereals. *Atmos. Environ.* 84, 204–212.
- Bosch-Serra, D., Yagüe, M.R., Poch, R.M., Molner, M., Junyent, B., Boixadera, J., 2017. Aggregate strength in calcareous soil fertilized with pig slurries. *Eur. J. Soil Sci.* 68, 449–461.
- Carozzi, M., Ferrara, R.M., Rana, G., Acutis, M., 2013. Evaluation of mitigation strategies to reduce ammonia losses from slurry fertilisation on arable lands. *Sci. Total Environ.* 449, 126–133.
- Cluzeau, D., Guernion, M., Chaussod, R., Martin-laurent, F., Villenave, C., Cortet, J., 2012. Integration of biodiversity in soil quality monitoring: Baselines for microbial and soil fauna parameters for different land-use types. *Eur. J. Soil Biol.* 49, 63–72.
- D'Hose, T., Molendijk, L., Van Vooren, L., van den Berg, W., Hoek, H., Runia, W., van Evert, F., ten Berge, H., Spiegel, H., Sandèn, T., Grignani, C., Ruyschaert, G., 2018. Responses of soil biota to non-inversion tillage and organic amendments: An analysis on European multiyear field experiments. *Pedobiologia (Jena)* 66, 18–28.
- De la Torre, A.I., Jiménez, J.A., Carballo, M., Fernández, C., Roset, J., Muñoz, M.J., 2000. Ecotoxicological evaluation of pig slurry. *Chemosphere* 41, 1629–1635.
- Domingo-Olive, F., Bosch-Serra, À.D., Yagüe, M.R., Boixadera, J., 2016. Long term application of dairy cattle manure and pig slurry to winter cereals improves soil quality. *Nutr Cycl Agroecosyst.* 104, 9–5.

- Domínguez, J., Aira, M., Gómez-Brandón, M., 2009. El papel de las lombrices de tierra en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes. *Ecosistemas*. 18, 20–31.
- Fangueiro, D., Pereira, J.L.S., Fraga, I., Surgy, S., Vasconcelos, E., 2018. Band application of acidified slurry as an alternative to slurry injection in a Mediterranean double cropping system: Agronomic effect and gaseous emissions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 267, 87–99.
- Ferrara, R., Carozzi, M., Di, P., Nelson, D.D., Fratini, G., Bertolini, T., Magliulo, V., Acutis, M., Rana, G., 2016. Dynamics of ammonia volatilisation measured by eddy covariance during slurry spreading in north Italy. *Agric. Ecosyst. Environ.* 219, 1–13.
- Frazão, J., de Goede, R.G.M., Capowiez, Y., Pulleman, M.M., 2019. Soil structure formation and organic matter distribution as affected by earthworm species interactions and crop residue placement. *Geoderma* 338, 453–463.
- Hafner, S.D., Pacholski, A., Bittman, S., Burchill, W., Bussink, W., Chantigny, M., Carozzi, M., Géniermont, S., Häni, C., Hansen, M.N., Huijsmans, J., Hunt, D., Kupper, T., Lanigan, G., Loubet, B., Misselbrook, T., Meisinger, J.J., Neftel, A., Nyord, T., Pedersen, S. V., Sintermann, J., Thompson, R.B., Vermeulen, B., Vestergaard, A. V., Voylokov, P., Williams, J.R., Sommer, S.G., 2018. The ALFAM2 database on ammonia emission from field-applied manure: Description and illustrative analysis. *Agric. For. Meteorol.* 258, 66–79.
- Hoekstra, N.J., Llor, S.T.J., Richards, K.G., O’Hea, N., Lanigan, G.J., Dyckmans, J., Schulte, R.P.O., Schmidt, O., 2010. Slurry ¹⁵NH₄-N recovery in herbage and soil: Effects of application method and timing. *Plant Soil* 330, 357–368.
- Holcomb J.C., Sullivan D.M., Horneck D.A., Clough G.H., 2011. Effect of irrigation rate on ammonia volatilization, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75, 2341-2347.
- Huguenin-Elie, O., Nyfeler, D., Ammann, C., Latsch, A., Richner, W. 2018. Influence of slurry application technique on yield and nitrogen flows in grassland. *Agrarforschung Schweiz*. 9, 236–247.
- Huijsmans, J. F. M., Hol, J. M. G., and Vermeulen, G. D., 2003. Effect of application method, manure characteristics, weather and field conditions on ammonia volatilization from manure applied to arable land, *Atmos. Environ.* 37, 3669–3680.
- Jégou, D., Cluzeau, D., Hallaire, V., Balesdent, J., Tréhen, P., 2000. Burrowing activity of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea giardi* and consequences on C transfers in soil. *Eur. J. Soil Biol.* 36, 27–34.
- Lamandé, M., Hallaire, V., Curmi, P., Pérès, G., Cluzeau, D., 2003. Changes of pore morphology, infiltration and earthworm community in a loamy soil under different agricultural managements. *Catena* 54, 637–649.
- Malgeryd, J., 1998. Technical measures to reduce ammonia losses after spreading of animal manure. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 51, 51–57.
- Manono, B., 2016. Agro-ecological Role of Earthworms (Oligochaetes) in Sustainable Agriculture and Nutrient Use Efficiency: A Review. *J. Agric. Ecol. Res. Int.* 8, 1–18.
- Meade, G., Pierce, K., O’Doherty, J.V., Mueller, C., Lanigan, G., Mc Cabe, T., 2011. Ammonia and nitrous oxide emissions following land application of high and low nitrogen pig manures to winter wheat at three growth stages. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140, 208–217.

- Misselbrook, T.H., Smith, K.A., Johnson, R.A., Pain, B.F., 2002. Slurry application techniques to reduce ammonia emissions: results of some UK field-scale experiments. *Biosyst Eng.* 81, 313–321.
- Misselbrook, T.H., Nicholson, F.A., Chambers, B.J., 2005. Predicting ammonia losses following the application of livestock manure to land. *Bioresour. Technol.* 96, 159–168.
- Morrás, H. J. M., 2015. Porosidad y microestructura de suelos. In: Loiza, J. C., Stoops, G., Poch, R. M., Casamitjana, M. editores. *Manual de Micromorfología de Suelos y Técnicas Complementarias*. Medellín (CO): Ed. Pascual Bravo Fondo Editorial; p. 205–260.
- Morvan, T., Leterme, P., Arsene, G.G., Mary, B., 1997. Nitrogen transformations after the spreading of pig slurry on bare soil and ryegrass using 15N-labelled ammonium. *Dev. Crop Sci.* 25, 237–244.
- Murchie, A.K., Blackshaw, R.P., Gordon, A.W., Christie, P., 2015. Responses of earthworm species to long-term applications of slurry. *Appl. Soil Ecol.* 96, 60–67.
- NEIKER, 2013. Reducción de emisiones de amoníaco mediante distintas técnicas de aplicación de purines. FER GIR Acción 2. [accessed 2018 Nov 11]. http://www.nasdap.ejgv.euskadi.eus/r503813/es/contenidos/documentacion/fergir/es_agripes/adjuntos/Experimentacion_2.pdf
- Onrust, J., Piersma, T., 2019. How dairy farmers manage the interactions between organic fertilizers and earthworm ecotypes and their predators. *Agric. Ecosyst. Environ.* 273, 80–85.
- Pagliai, M. 2003. Changes of pore system following soil compaction. Paper presented at: Collage on Soil physics; Mar. 3–21; Miramare, Trieste, (IT) [accessed 2018 Nov 20]. <http://indico.ictp.it/event/a0261/session/17/contribution/12/material/0/2.pdf>.
- Pagliai, M., La Marca, M., Lucamante, G., Genovese, L., 1984. Effects of zero and conventional tillage on the length and irregularity of elongated pores in a clay loam soil under viticulture. *Soil Till. Res.* 4, 433–444.
- Pagliai, M., Vignozzi, N., 2006. Soil porosity as an indicator of soil health. *Ann. Arid Zone* 45, 259–286.
- Pagliai, M., Vignozzi, N., 2007. Image analysis and microscopic techniques to characterize soil pore system. Paper presented at: Collage on Soil physics; Oct. 22–Nov. 9; Miramare, Trieste, (IT) [accessed 2018 Nov 20] <http://indico.ictp.it/event/a06222/session/8/contribution/5/material/0/3.pdf>
- Pagliai, M., Vittori Antisari, L., 1993. Influence of waste organic matter on soil micro-and macrostructure. *Bioresour. Technol.* 43, 205–213.
- Paoletti, M.G., 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agric. Ecosyst. Environ.* 74, 137–155.
- Perramon, B., Bosch-Serra, A.D., Domingo, F., Boixadera, J., 2016. Organic and mineral fertilization management improvements to a double-annual cropping system under humid Mediterranean conditions. *Eur. J. Agron.* 76, 28–40.
- Perramon, B., Domingo-Olivé, F., Bosch-Serra, Á.D., Yagüe, M.R., Boixadera, J., 2018. Double-Annual Forage Crop Rotation Controls Nutrient Surpluses in Nitrogen-Based Organic Fertilization. *Agron. J.* 110, 2268–2276

- Petersen, J., 1996. Fertilization of spring barley by combination of pig slurry and mineral nitrogen fertilizer. *J. Agr. Sc.* 127, 151–159.
- Piron, D., Boizard, H., Heddadj, D., Pérès, G., Hallaire, V., Cluzeau, D., 2017. Indicators of earthworm bioturbation to improve visual assessment of soil structure. *Soil Tillage Res.* 173, 53–63.
- Piron, D., Pérès, G., Hallaire, V., Cluzeau, D., 2012. Morphological description of soil structure patterns produced by earthworm bioturbation at the profile scale. *Eur. J. Soil Biol.* 50, 83–90.
- Renaud, M., Chelinho, S., Alvarenga, P., Mourinha, C., Palma, P., Sousa, J.P., Natal-da-Luz, T., 2017. Organic wastes as soil amendments – Effects assessment towards soil invertebrates. *J. Hazard. Mater.* 330, 149–156.
- Rutgers, M., Orgiazzi, A., Gardi, C., Römbke, J., Jänsch, S., Keith, A.M., Neilson, R., Boag, B., Schmidt, O., Murchie, A.K., Blackshaw, R.P., Pérès, G., Cluzeau, D., Guernion, M., Briones, M.J.I., Rodeiro, J., Piñeiro, R., Cosín, D.J.D., Sousa, J.P., Suhadolc, M., Kos, I., Krogh, P.H., Faber, J.H., Mulder, C., Bogte, J.J., Wijnen, H.J. va., Schouten, A.J., Zwart, D. de, 2016. Mapping earthworm communities in Europe. *Appl. Soil Ecol.* 97, 98–111.
- Sanz, A., Misselbrook, T., Sanz, M.J., Vallejo, A., 2010. Use of an inverse dispersion technique for estimating ammonia emission from surface-applied slurry. *Atmos. Environ.* 44, 999–1002.
- Sanz-Cobena, A., Lassaletta, L., Aguilera, E., Prado, A., Garnier, J., Billen, G., 2017. Strategies for greenhouse gas emissions mitigation in Mediterranean agriculture: A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 238, 5–24.
- Schoninger, E.L., González-Villalba, H.A., Bendassolli, J.A., Trivelin, P.C.O., 2018. Fertilizer nitrogen and corn plants: Not all volatilized ammonia is lost. *Agron. J.* 110, 1111–1118.
- Sieling, K., Schroder, H., Finck, M., H. Manus, 1998. Yield, nitrogen uptake and apparent nitrogen use efficiency of winter wheat and winter barley grown in different cropping systems. *J. Agric. Sci. Cambridge.* 131, 375–387.
- Sommer, S., Hutchings, N., 2001. Ammonia emission from field applied manure and its reduction—invited paper. *Eur. J. Agron.* 15, 1–15.
- Sommer, S.G., Friis, E., Bach, A., Schjørring, J.K., 1997. Ammonia volatilization from pig slurry applied with trail hoses or broadcast to winter wheat: effects of crop developmental stage, microclimate, and leaf ammonia absorption. *J. Environ. Qual.* 26, 1153–1160.
- Sommer, S.G., Géniermont, S., Cellier, P., Hutchings, N.J., Olesen, J.E., Morvan, T., 2003. Processes controlling ammonia emission from livestock slurry in the field. *Eur. J. Agron.* 19, 465–486.
- Sommer, S.G., Jensen, E.S., Schjørring, J.K., 1993. Leaf absorption of atmospheric ammonia emitted from pig slurry applied beneath the canopy of winter wheat. *Acta Agric. Scand. Sect. B — Soil Plant Sci.* 43, 21–24.
- Thorman, R.E., Hansen, M.N., Misselbrook, T.H., Sommer, S.G., 2008. Algorithm for estimating the crop height effect on ammonia emission from slurry applied to cereal fields and grassland. *Agron. Sustain. Dev.* 28, 373–378.

- Unión Europea, 1986. Directiva del Consejo, de 12 de junio de 1986, relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura (86/278/CEE). DOCE. L181, 6–12.
- Unión Europea., 2013. Reglamento (UE) No 1306/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013 sobre la financiación, gestión y seguimiento de la Política Agrícola Común, por el que se derogan los Reglamentos (CE) no 352/78, (CE) no 165/94, (CE) no 2799/98, (CE) no 814/2000, (CE) no 1290/2005 y (CE) no 485/2008. DOCE. L347, 549–607.
- Unión Europea, 2016. Directiva 2016/2284 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 14 de diciembre de 2016, relativa a la reducción de las emisiones nacionales de determinados contaminantes atmosféricos, por la que se modifica la Directiva 2003/35/CE y se deroga la Directiva 2001/81/CE. DOCE. L344, 1–31.
- Unión Europea, 2012. Informe de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones. Aplicación de la Estrategia Temática para la Protección del Suelo y actividades en curso. [acceso 2019 Mar 6] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52012DC0046&from=EN>
- VandenBygaart, A.J., Fox, C.A., Fallow, D.J., Protz, R., 2000. Estimating earthworm-influenced soil structure by morphometric image analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 982–988
- Viguria, M., Sanz-Cobeña, A., López, D.M., Arriaga, H., Merino, P., 2015. Ammonia and greenhouse gases emission from impermeable covered storage and land application of cattle slurry to bare soil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 199, 261–271.
- Webb, J., Pain, B., Bittman, S., Morgan, J., 2010. The impacts of manure application methods on emissions of ammonia, nitrous oxide and on crop response—A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 137(1–2), 39–46.
- Whalen, J.K., Parmelee, R.W., Edwards, C.A., 1998. Population dynamics of earthworm communities in corn agroecosystems receiving organic or inorganic fertilizer amendments. *Biol. Fertil. Soils.* 27, 400–407.
- Yagüe, M.R., Bosch-Serra, A.D., 2013. Slurry field management and ammonia emissions under Mediterranean conditions. *Soil Use Manag.* 29, 397–400.
- Yagüe, M.R., Domingo-Olivé, F., Bosch-serra, À.D., Poch, R.M., Boixadera, J., 2016. Dairy cattle manure effects on soil quality: porosity, earthworms, aggregates and soil organic carbon fractions. *Land Degrad. Develop.* 27, 1753–1762.

Capítulo 7

Conclusiones generales y recomendaciones

7.1 Conclusiones generales

Las conclusiones generales de la presente tesis son:

1. En aplicaciones de purines sobre suelo desnudo, la mitigación de las emisiones de amoníaco pasa por favorecer la inmediata incorporación del purín en el suelo.
2. La utilización de tubos colgantes como método de aplicación de purines reduce las emisiones de amoníaco en cobertera de cereal de invierno al reducir la superficie de exposición. Esta reducción puede equivaler a un 65% del N total aplicado respecto al método en abanico.
3. En sistemas agrícolas de secano cerealistas, el uso de purín de cerdo en dosis recomendadas por la Unión Europea ($170\text{--}210 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) procedente de fuentes orgánicas y aplicadas a largo plazo, mantienen la diversidad de la población y una abundancia de lombrices acordes a las condiciones del Mediterráneo semiárido, y además mejoran porosidad asociada a la bioturbación por la fauna del suelo.
4. La reducción de la diversidad de lombrices de tierra (ausencia de *Nicodrilus trapezoides*) en condiciones de sobrefertilización con purín de cerdo y con el uso de compost de lodos a largo plazo, podría ser indicativo de perturbaciones negativas que no se han identificado.
5. En nuestras condiciones mediterráneas de secano, los daños a nivel funcional de la comunidad de lombrices se manifiestan en una reducción de la bioturbación relacionada con los bioporos, cámaras y canales producidos por estos organismos del suelo.
6. La incorporación de biondicadores vinculados a la comunidad de lombrices permite un mejor entendimiento de las interacciones entre bioturbación y estructura del suelo (e.g. tipos de poros y microestructura), estudiadas mediante técnicas micromorfométricas.
7. La aplicación de purín de cerdo a largo plazo produce el desarrollo de una microestructura migajosa del suelo.

8. La aplicación de fertilizantes orgánicos (170 y 250 kg N ha⁻¹ año⁻¹ de fuentes orgánicas) a largo plazo afecta a la forma de los poros del suelo, aumenta su irregularidad, tortuosidad y elongación; además la dosis más elevada incrementa la porosidad total del suelo y de manera equitativa entre los rangos funcionales de poros (v.g. flujo de agua, gases y crecimiento radicular).

7.2 Recomendaciones para futuras investigaciones

1. Los compromisos adquiridos en la reducción de la volatilización de amoníaco en campo, en nuestras condiciones mediterráneas, plantean la necesidad de realizar ensayos en campo para cuantificar el impacto de la combinación de diferentes variables relacionadas con la aplicación de purines v.g. la interacción de la materia seca del purín, las condiciones de humedad del suelo, y el manejo del riego por aspersión inmediatamente después de la aplicación de purín.

2. La evaluación del uso a largo plazo de fertilizantes orgánicos requeriría profundizar en el estudio de variables relacionados a la comunidad de lombrices en distintas épocas del año, combinado con el estudio de potenciales contaminantes que pudieran estar relacionados con impactos negativos en aspectos funcionales y de diversidad de especies.

3. En sistemas intensivos con más de un cultivo anual, sería conveniente incluir diversas variables de suelos como, capacidad de retención de agua útil en el suelo, conductividad hidráulica, e infiltración, para conocer de qué manera influyen sobre ellas los cambios en porosidad y forma de los poros.

