

TESI GUANYADORA DEL

“VII PREMI CÀTEDRA AGROBANK A LA MILLOR TESI DOCTORAL”

eman ta zabal zazu

Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Nitrification control in the framework of sustainable agriculture: the use of synthetic and biological nitrification inhibitors with ammonium-based fertilizers

Autor
Adrián Bozal Leorri

Directores
**Dra . Carmen González Murua
Dr. Pedro Aparicio Tejo**

NH_4^+ NO_3^- N_2O

Tesis Doctoral
2022

RESUM DE LA TESI GUANYADORA DEL “VII PREMI CÀTEDRA AGROBANK A LA MILLOR TESI DOCTORAL”

Autor: Dr. Adrián Bozal Leorri

Director: Dra. Carmen González Murua i Dr. Pedro Aparicio Tejo

Títol: Nitrification control in the framework of sustainable agriculture: the use of synthetic and biological nitrification inhibitors with ammonium-based fertilizers.

Introducció

La disponibilitat de nitrogen és, juntament amb la de l'aigua, un dels principals factors limitants per a la productivitat dels cultius, raó per la qual l'agricultura intensiva és dependent de l'ús de fertilitzants nitrogenats per a maximitzar el rendiment de les collites. Per a l'any 2050 s'espera que la seva aplicació aconseguixi les 300.000 tones de nitrogen per any, requerint una gran aportació d'energia, ja que, aproximadament, el 2% de l'energia mundial s'empra per a la síntesi de dites fertilitzants. No obstant això, la totalitat del nitrogen aplicat no és absorbit pel cultiu. Si bé l'aportació de fertilitzants s'ha multiplicat per 9 des de la dècada dels 60, l'ús de nitrogen per part dels cultius ha descendit des del 68% al 47%. El nitrogen no assimilat pel cultiu en la majoria dels sistemes agrícoles es perd en forma de nitrogen reactiu, convertint-los, així, en els principals responsables de la seva producció, superant a la quantitat originada pels processos naturals terrestres. Les vies majoritàries de pèrdues de nitrogen reactiu que causen un impacte mediambiental són la lixiviació de nitrat (NO_3^-), la volatilització d'amoníac (NH_3) i les emissions de gasos nitrogenats com l'òxid nítric (NO) i l'òxid nítrós (N_2O). Totes aquestes formes nitrogenades causen un impacte mediambiental que repercuteix en la salut dels ecosistemes i en la salut humana.

El N_2O és el principal gas d'efecte d'hivernacle generat en l'agricultura a conseqüència de l'ús excessiu de fertilitzants nitrogenats. S'estima que el sector agrícola és responsable de l'emissió de més de 11.500 tones de N_2O per any, la qual cosa suposa l'1% del nitrogen aplicat pels fertilitzants i representa al voltant del 19% del total de N_2O emès mundialment i el 49% de les emissions de N_2O d'origen antropogènic. El N_2O és una molècula amb gran potencial d'escalfament global, sent 298 vegades superior al diòxid de carboni (CO_2); pel que petits canvis en el flux net d'aquest gas poden contribuir significativament al canvi climàtic. Els processos microbians dels sòls com la nitrificació i, majoritàriament, la desnitrificació són els responsables de la generació i emissió d'aquest gas a l'atmosfera.

La nitrificació és l'oxidació aeròbica seqüencial de formes reduïdes de nitrogen a NO_3^- . En sòls amb disponibilitat d'oxigen, l'amoní (NH_4^+) és oxidat a hidroxilamina (NH_2OH) per l'acció de l'enzim amoni monooxigenasa (AMO) que posseeixen arqueges i bacteris oxidants d'amoní (AOA i AOB). La NH_2OH s'oxida a nitrit (NO_2^-) i, finalment, els bacteris oxidants del nitrit (NOB) l'oxiden a NO_3^- . El NO_3^- format és un anió carregat negativament que es repel·leix pels col·loides del sòl, que també presenten càrrega negativa i, per tant, és susceptible de perdre's per lixiviació, causant eutrofització i contaminació de les reserves d'aigües subterrànies. En sòls poc airejats, és a dir, amb baixa concentració o absència d'oxigen, el NO_3^- és utilitzat per organismes desnitrificants com a últim acceptor d'electrons. Així, durant la desnitrificació, el NO_3^- és seqüencialment reduït a NO_2^- , NO , N_2O i/o a nitrogen molecular (N_2).

Per tot això resulta crucial orientar l'agricultura cap a criteris de sostenibilitat que ens permetin mantenir uns nivells de producció adequats alhora que reduïm la quantitat de nitrogen reactiu que s'allibera en el medi ambient. Des de la indústria s'ha potenciat la utilització de noves formulacions de fertilitzants amb l'objectiu de millorar la seva eficiència i reduir el seu impacte ambiental.

Principalment existeixen dues línies d'actuació: l'addició de fertilitzants d'alliberament lent i l'ús d'inhibidors sintètics de la nitrificació (SNIs) com el 3,4-dimetilpirazol fosfat (DMPP) i la mescla isomèrica 2-(3,4-dimetil-1H-pirazole-1-il) succinat (DMPSA). El DMPP i el DMPSA són compostos sintètics afegits als fertilitzants de base amoniacal amb la finalitat d'inhibir l'activitat de l'enzim AMO el que permet mantenir el nitrogen en forma amoniacal en el sòl durant períodes de temps més prolongats. S'ha constatat que els SNIs augmenten l'ús eficient del nitrogen per part de la planta entre un 7% i un 16% de mitjana, alhora que redueixen les emissions de N₂O entre un 35% i un 40%.

Desafortunadament, l'ús dels SNIs no és una pràctica estesa entre els agricultors de tot el món, sobretot en països en desenvolupament, ja que presenten diversos inconvenients com el seu cost d'aplicació i, a vegades, falta de rendibilitat. La seva eficiència es veu seriosament afectada per les característiques fisicoquímiques del sòl, la temperatura i la volatilitat del compost. No obstant això, les substàncies alelopàtiques d'exsudats d'arrels de cultius com el sorgo (*Sorghum bicolor*), conegudes per la seva activitat com a inhibidors biològics de la nitrificació (BNIs), s'han mostrat com una alternativa prometedora. Els BNIs del sorgo es traspuen directament en la rizosfera, que és el principal lloc de nitrificació a causa de la gran abundància de AOA i AOB. A més, aquests BNIs poden alliberar-se fins prop de la maduresa fisiològica del cultiu, la qual cosa asseguraria la seva presència durant totes les etapes de desenvolupament d'aquest. L'acció inhibidora de la nitrificació d'aquestes molècules sembla ser relativament estable en un rang de pH de 3,0 a 9,0 i per a temperatures entre 20 i 30 °C. A causa de tots aquests avantatges que ofereix l'exsudació de BNIs, s'advocaria per l'ús del sorgo en la rotació de cultius, en intercultiu o com a cultiu de cobertura.

Lamentablement, els cereals de major interès agrícola, com per exemple el blat, no posseeixen la capacitat de produir BNIs a causa de la gran domesticació que han sofert al llarg de la història. El seu cultiu requereix una fertilització intensiva a causa de la seva alta dependència de nitrogen i és, per això, un dels cultius on més s'ha recomanat l'ús de SNIs. Recentment, una xarxa d'investigadors pertanyents a una col·laboració entre el Centre Internacional de Millorament de Blat de moro i Blat (Mèxic), el Japan International Research Center for Agricultural Sciences (el Japó) i la Universitat del País Basc (UPV/EHU) ha aconseguit identificar la regió cromosòmica que confereix capacitat de traspuar BNIs a *Leymus racemosus*, un parent silvestre del blat. Després d'aquest assoliment i amb la idea de dotar a les cultivars modernes de blat de la capacitat de traspuar BNIs, es va aconseguir posteriorment transferir, mitjançant retrocreuament, aquesta regió cromosòmica a dues cultivars de blat elit, ROELFS i MUNAL, amb producció superior a 10 tones de gra per hectàrea. Finalment, es van aconseguir les línies ROELFS-*BNI i MUNAL-*BNI, amb capacitat de produir BNIs al mateix temps que mantenen totes les característiques d'un blat d'alt rendiment. ROELFS-*BNI i MUNAL-*BNI són capaços d'augmentar la disponibilitat de NH₄⁺ en sòls àcids i reduir la formació de NO₃⁻, disminuint la seva probabilitat de pèrdua per lixiviació o emissions gasoses. A més, s'ha observat que la capacitat de produir BNIs no té un cost metabòlic per a les noves línies ROELFS-*BNI i MUNAL-*BNI ja que presenten un nivell similar de producció de gra.

Hipòtesi principal i objectius

La hipòtesi d'aquesta tesi va ser que el control de la nitrificació mitjançant l'ús d'inhibidors sintètics o biològics permet aconseguir una agricultura sostenible en reduir les pèrdues de nitrogen reactiu al medi ambient derivades de l'ús de fertilitzants amb base amoniacal. Per a ser testada, es va dividir el treball en 5 objectius.

1. Molts estudis informen que l'augment de la concentració de CO₂ modifica l'assimilació fotosintètica i el metabolisme de les plantes, així com el cicle del carboni del sòl, la qual cosa també podria interferir amb el cicle del nitrogen del sòl. Per tant, no és clar si l'eficàcia dels

SNIs DMPP i DMPSA també podria veure's afectada en condicions climàtiques futures d'augment de CO₂.

Objectiu 1: Verificar que els SNIs DMPP i DMPSA continuen sent igual d'eficaços amb concentracions atmosfèriques elevades de CO₂. El mode d'acció de DMPP i DMPSA sembla estar relacionat amb la seva capacitat per a quelar els cations Cu²⁺ que necessita l'enzim AMO i, encara que s'ha demostrat la seva capacitat quelant, no s'ha confirmat que el seu mode d'acció depengui d'aquesta capacitat.

Objectiu 2: Avaluar en cultius purs del bacteri nitrificant *Nitrosomonas europaea* l'efectivitat de la inhibició de DMPP i DMPSA, així com estudiar si un augment de la concentració de Cu²⁺ en el mitjà la redueix.

3. L'exsudació de BNIs en el sorgo es manté durant tot el creixement del cultiu. No obstant això, els estressos abiòtics que afecten el creixement dels cultius, com la sequera, podrien modificar la taxa d'exsudació de BNIs que està relacionada amb l'estat fisiològic i el desenvolupament de la planta.

Objectiu 3: Determinar l'efecte que una sequera moderada produeix en l'exsudació de BNIs de plantes de sorgo.

4. Els SNIs són eines eficaces per a reduir les pèrdues de nitrogen. No obstant això, no són àmpliament adoptats pels agricultors a causa de la seva falta de rendibilitat i a la seva limitada estabilitat i mobilitat en el sòl. D'altra banda, els BNIs semblen ser una alternativa prometedora, ja que s'alliberen directament en el lloc on es duu a terme la nitrificació.

Objectiu 4: Analitzar els efectes d'una rotació veça-sorgo-blat, amb ús del sorgo com a cultiu de cobertura durant l'estiu, en comptes de guaret, sobre les poblacions nitrificants del sòl, així com en les emissions de N₂O i producció de blat.

5. L'assoliment de les noves línies ROELFS-*BNI i MUNAL-*BNI suposa una nova fita per a l'agricultura sostenible. No obstant això, és necessari validar la seva eficàcia en diferents condicions edafoclimàtiques i tipus de fertilitzants, ja que el seu ús potencial pretén arribar a agricultors de tot el món.

Objectiu 5: Estudiar el comportament de les línies ROELFS-*BNI i MUNAL-*BNI en sòl alcalí i amb fertilització amoniacal i nítrica, i el seu efecte sobre les poblacions nitrificants i contingut de nitrogen mineral.

Resultats

L'ús de DMPP i DMPSA va aconseguir inhibir el creixement dels microorganismes nitrificants en totes dues concentracions de CO₂, sent lleugerament més efectiva en elevat CO₂. L'addició dels SNIs també va aconseguir que el manteniment de NH₄⁺ en el sòl fos major en elevat CO₂ i, per consegüent, es produís un menor contingut de NO₃⁻. Això va conduir a una disminució del substrat que pot ser part de la desnitrificació i, per tant, es van reduir encara més les emissions de N₂O. A més, l'augment de la disponibilitat de carboni en elevat CO₂ va permetre una assimilació més eficient de NH₄⁺. Aquests resultats indiquen que l'ús de DMPP i DMPSA en escenaris climàtics futurs és molt recomanable amb l'objectiu d'aconseguir una agricultura sostenible.

Malgrat l'eficiència demostrada pel DMPP i el DMPSA en el camp, el DMPSA no va ser capaç d'inhibir el creixement de microorganismes nitrificants en cultius purs de *Nitrosomonas europaea*. Perquè el DMPSA exercís el seu poder inhibitori va haver de trencar-se per a alliberar DMP, la qual cosa es va aconseguir mitjançant processos biològics dels microorganismes del sòl. No

obstant això, atès que la ruptura del DMPSA és realitzada per l'activitat biològica del sòl; el tipus de sòl i les condicions ambientals podrien modificar la seva eficiència. D'altra banda, la capacitat inhibidora del DMPP no es va veure alterada per un augment en les concentracions de Cu^{2+} . Per tant, sembla ser que el mode d'acció d'aquests SNIs no està relacionat amb la seva capacitat quelant. A més, es va demostrar que el DMPP és altament específic ja que inhibeix exclusivament l'enzim AMO.

L'exsudació de BNIs en sorgo sembla estar relacionada amb la disponibilitat d'aigua ja que, sota condicions de sequera, les plantes de sorgo van augmentar l'alliberament de BNIs per a augmentar la competència amb els microorganismes nitrificants pel NH_4^+ del sòl. Aquesta espècie podria ser considerada com una millor alternativa al guaret durant l'estiu en llocs de clima Mediterrani humit ja que va reduir l'excés de nitrogen del sòl del cultiu anterior i els seus residus van ser capaços d'evitar un augment en l'abundància de microorganismes nitrificants després de la fertilització nitrogenada amb la mateixa eficiència que el DMPP. A més, els BNIs de sorgo no van presentar cap efecte sobre l'abundància total de bacteris, ni sobre els microorganismes desnitrificants.

Desafortunadament, encara que els residus del cultiu de sorgo van aconseguir inhibir el creixement de microorganismes nitrificants, el seu ús com a cultiu de cobertura no va resultar ser una opció adequada per a mitigar la contaminació per nitrogen en una rotació de cultius de veça-sorgo-blat d'hivern. La major disponibilitat de carboni dels rostolls de sorgo va augmentar la desnitrificació heteròtrofa i, per tant, també van augmentar les emissions de N_2O . Per a contrarestar aquest major alliberament de N_2O derivada de l'ús del sorgo com a cultiu de cobertura suggerim l'aplicació de DMPP ja que això va retardar l'oxidació del NH_4^+ del sòl, va disminuir la formació de NO_3^- i, per tant, va mitigar l'augment de la desnitrificació heteròtrofa resultant d'una major disponibilitat de carboni en la rotació veça-sorgo-blat.

La solució per a evitar l'amenaça d'un augment de la desnitrificació a causa d'una major disponibilitat de carboni pels residus de cultius de cobertura és que sigui el propi cultiu qui traspuï BNIs. Les línies de blat ROELFS-*BNI i MUNAL-*BNI representen una tecnologia biològica eficient que va ser capaç de reduir l'abundància de microorganismes nitrificants en sòls bàsics, mantenint més alts els nivells de NH_4^+ en el sòl i provocant una reducció en la formació de NO_3^- . A més, les línies de blat ROELFS-*BNI i MUNAL-*BNI també van reduir el contingut de NO_3^- del sòl sota la fertilització amb nitrat potàssic (KNO_3). D'altra banda, a causa d'un major manteniment de NH_4^+ en el sòl, les línies de blat ROELFS-*BNI i MUNAL-*BNI van poder canviar el seu metabolisme per a tenir una nutrició més amoniacal. A més, poden millorar l'eficiència en l'ús del nitrogen del blat ja que van millorar l'absorció de nitrogen independentment de quin va ser la font d'aquest.

Conclusió general

Els resultats d'aquesta tesi demostren que tant els SNIs com els BNIs redueixen la pèrdua de nitrogen reactiu. Els SNIs continuaran sent efectius, fins i tot en condicions climàtiques futures, i els BNIs es presenten com una opció per a suplir les faltes dels SNIs, sent capaços de reduir la nitrificació durant tot el desenvolupament del cultiu. Per tant, es confirma la nostra hipòtesi inicial, ja que el control de la nitrificació mitjançant l'ús d'inhibidors sintètics o biològics permet aconseguir una agricultura sostenible en reduir les pèrdues de nitrogen reactiu al medi ambient derivades de l'ús de fertilitzants amb base amoniacal.