

Efecto de la contaminación por nitratos y la variación estacional en la desnitrificación y en la emisión de gases de efecto invernadero en el arroyo de La Rocina (Parque Nacional de Doñana, España)

Germán Tortosa^a, David Correa^a, A. Juan Sánchez-Raya^a, Antonio Delgado^b, Miguel A. Sánchez-Monedero^c, Eulogio J. Bedmar^a

^aDepartamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18080 Granada, España.

^bDepartamento de Geoquímica Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18080 Granada, España.

^cDepartamento de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, 30100 Murcia, España.

Email: german.tortosa@eez.csic.es

Resumen:

Las alteraciones ambientales como el calentamiento global o el descenso de las precipitaciones pueden incrementar los efectos toxicológicos de la contaminación en sistemas acuáticos lacustres, en especial la producida por los nitratos procedentes de los fertilizantes agrícolas. En este trabajo se analizaron las propiedades fisicoquímicas de las aguas superficiales y de los sedimentos en cuatro localizaciones del arroyo de La Rocina, situado en las proximidades de la Marisma del Rocío, perteneciente al Parque Nacional de Doñana (España). El estudio se realizó durante un año hidrológico, muestreando cada tres meses (otoño, invierno, primavera y verano). Entre los parámetros analizados, la conductividad eléctrica, el pH, el contenido en macro y microelementos, el carbono orgánico y el nitrógeno total y disuelto presentaron valores muy variables dependiendo del lugar y el tiempo de muestreo. El arroyo de la Cañada fue donde la concentración de nitrato disuelto fue mayor, con valores comprendidos entre 61,1-106,6 mg l⁻¹, de naturaleza fundamentalmente inorgánica al representar cerca del 90% del contenido total de nitrógeno disuelto. El origen de este nitrato fue probablemente debido a los fertilizantes aplicados en las zonas agrícolas colindantes según se dedujo de los valores de la relación isotópica ¹⁵δ N-NO₃⁻. Los cambios en la estacionalidad y las condiciones hidrológicas también afectaron a las actividades biológicas de los sedimentos tales como la actividad deshidrogenasa, β-glucosidasa, aril-sulfatasa, fosfatasa ácida y ureasa, así como a la emisión de los gases de efecto invernadero (GEIs) CO₂, CH₄ y N₂O. Tanto la materia orgánica como el contenido en nitrato influyeron positivamente en dicha emisión. El proceso de desnitrificación se incrementó conforme lo hizo la concentración de nitrato, siendo mayor la emisión de GEIs durante la estación más seca del año en todos los puntos estudiados.

Palabras clave:

Parque Nacional de Doñana, aguas superficiales y sedimentos, contaminación por nitratos, gases de efecto invernadero, actividades biológicas, desnitrificación

1. Introducción.

La alteración antrópica del ciclo biogeoquímico del nitrógeno puede provocar graves efectos ambientales como el incremento en las emisiones de gases de efecto invernadero (GEIs), la acidificación de suelos y aguas, la pérdida de diversidad biológica, así como problemas de salud pública y pérdidas económicas relacionadas con los ecosistemas (Vitousek y col., 1997; Galloway y col., 2008; Mulhally y col., 2008). En los sistemas acuáticos, la acidificación de las aguas, la eutrofización, incluyendo la proliferación de algas tóxicas, y la toxicidad de compuestos nitrogenados como el amonio, el nitrito y el nitrato, son los tres principales problemas medioambientales motivados de la contaminación por nitrógeno inorgánico (Camargo y Alonso, 2006). Es más, el incremento del calentamiento global y el descenso de las precipitaciones en determinadas áreas continentales puede incrementar los efectos ecológicos y toxicológicos de este tipo de contaminación (Camargo y Alonso, 2006). El abuso de la utilización de los fertilizantes nitrogenados industriales ha generado un incremento en la emisión de gases de dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nítrico (N_2O) (Thornton y Valente, 1996; Merbach y col., 1996, 2001; Davidson y Verchot, 2000; Liu y Greaver, 2009). Además, se ha demostrado que la emisiones de GEIs a la atmósfera induce los cambios en las precipitaciones, en la temperatura, en las estaciones, sequías, en la deforestación a escala regional, el calentamiento global y eventos como el Niño (Christensen y col., 1990; Smith y col., 2003; Davidson y col., 2004).

Los humedades son los ecosistemas más importantes de la Tierra ya que tienen un rol fundamental en la regulación de los ciclos biogeoquímicos. El cambio climático y los efectos antropogénicos pueden tener un impacto significativo en los humedades costeros y de interior (Mitsch y Gosselink, 2007; Olías y col., 2008). De acuerdo con esto, el estudio de las propiedades fisicoquímicas y de las actividades biológicas de las aguas y sedimentos es necesario para evaluar los riesgos ecológicos que produce la contaminación del agua y así, proveer de la máxima información necesaria para la adecuada protección de los sistema acuáticos (Camargo, 1994). Numerosos estudios han demostrado que la contaminación por nitratos en suelos y aguas, tanto superficiales como subterráneas es cada vez más intensa y frecuente, debido al gran consumo de nitrógeno inorgánico, principalmente sales de nitrato y amonio de los fertilizantes minerales usados en la agricultura (Spalding y Exner, 1993; European Commission, 2002). La desnitrificación es un proceso biológico por el cual el nitrato puede transformarse en nitrógeno molecular N_2 mediante la formación intermedia de nitrito, óxido nítrico y óxido nítrico. Por lo tanto, este proceso representa el principal ruta para la eliminación de los nitratos en suelos y aguas, evitando su acumulación y la contaminación que producen. A pesar de eso, una incompleta transformación del nitrato en N_2 puede generar emisión de gases invernadero como el NO y el N_2O como efecto secundario (Aulakh y col., 1992; Conrad, 1996; Groffman y col., 2006).

La directiva europea 91/676/CEE sobre contaminación por nitratos de origen agrícola define las llamadas “zonas vulnerables” como áreas referentes de especial protección ambiental para prevenir la contaminación por nitratos del suelo y de las aguas.. Un ejemplo de esto lo encontramos en Parque Nacional de Doñana (PND), uno de los humedades más importantes de toda Europa que abarca cerca de 60000 hectáreas, en el suroeste de España, en el estuario del río Guadalquivir. Estas masas de agua son vulnerables a la contaminación procedente de los pequeños núcleos urbanos de las zonas colindantes y de las prácticas agrícolas permitidas en el ecotono, donde la agricultura ecológica de fresa y arroz es común y muy abundante. Esta área es la más fértil y productiva de la zona de Doñana como resultado de su humedad permanente y de la fertilización que recibe de los animales que viven o que pasean por la zona (Suso y Llamas, 1993).

Algunos autores ya han constatado la contaminación creciente de las aguas superficiales y subterráneas del humedad del DNP durante los últimos 20 años. Suso y Llamas (1993) constataron

que algunos humedales y pequeños arroyos del DNP se reducían considerablemente debido al bombeo de aguas subterráneas para uso agrícola, lo que afectó negativamente a la calidad de sus aguas. Olías y col. (2008) evaluaron la calidad del agua del acuífero Almonte-Marismas, (donde está situado el DNP) y observaron que ha sufrido contaminación de origen agrícola y urbano. Detectaron algunas lagunas situadas en zonas agrícolas con una elevada concentración de nitrato y sulfato procedente de los fertilizantes. También, Serrano y col. (2006) estudiaron los sistemas acuáticos del DNP y se centraron en los procesos que afectaban a la calidad del agua. Observaron que se había producido un incremento notable de nitrato en los flujos de agua en los arroyos de La Rocina y de El Partido en la última década, muy probablemente por la influencia de las zonas cultivadas y la aplicación de fertilizantes. Advertieron que esa contaminación podría generar eutofización de dichas zonas y que esto no debería pasarse por alto.

Con todo lo expuesto anteriormente, nuestro trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia antropogénica (especialmente la procedente de la agricultura) así como la variación estacional en el arroyo de La Rocina, más concretamente como puede afectar a las características fisicoquímicas y biológicas de las aguas superficiales y sus sedimentos, haciendo especial énfasis en la contaminación por nitratos y su efecto en la emisión de GEIs (CO_2 , CH_4 y N_2O), así como en el proceso de desnitrificación.

2. Material y métodos

2.1. Descripción y selección de los lugares de muestreo.

En 1982, DNP fue declarado Reserva de la Biosfera por la UNESCO y Humedal de Interés Internacional por la convención RAMSAR. El humedal del DNP tiene tres importantes entradas de agua superficial (Arambarri y col., 1996; Serrano y col., 2006): Dos arroyos naturales denominados La Rocina y El Partido en el eje norte del parque, y el río Guadiamar, el cual representa la principal aportación al humedal y que en 1998 sufrió el desastre ambiental de la ruptura de la mina de Aznalcollar (Cabrera y col., 1999; Grimalt y col., 1999; Sierra y col., 2003; Olías y col., 2005).

Nuestro estudio se realizó en el arroyo de la Rocina, situado en la zona norte del humedal de DNP, el cual es uno de los principales afluentes de la marisma del Rocío (Fig. 1). Para la selección de los lugares de estudio, se realizó un estudio previo de los nitratos a lo largo de los 462 km² del curso del arroyo usando un kit portátil para la determinación de nitratos (Nitrate Test Kit, CHEMetrics Inc.). Con los resultados obtenidos, se seleccionaron cuatro puntos de estudio con grandes diferencias en la concentraciones de nitrato (Fig. 1). Las coordenadas UTM de los lugares son las siguientes: 29S 0718632, 4114294 para la Laguna del Palacio del Acebrón (S1); 29S 0717797, 4113881 para el pequeño arroyo de La Cañada (S2); 29S 0722653, 4111704 para intersección entre ese arroyo y la marisma de Rocío, denominado Vado de la Canariega (S3); y 29S 0723654, 4111088 para la marisma de El Rocío (S4). Los puntos S1 y S2 fueron los que presentaron menor y mayor concentración de nitrato respectivamente, mientras que para S3 y S4 fueron intermedios. Los puntos elegidos presentaron diferentes morfologías hidráulicas (S1: un pequeño arroyo; S2: una laguna; S3 La unión entre un arroyo y una marisma; S4: una marisma) y también, diferencias entre la vegetación de ribera (S3 y S4 no tenían, mientras y que S1 y S2 si).

Las muestras se tomaron entre octubre de 2008 (T1), enero de 2009 (T2), abril de 2009 (T3) y julio de 2009 (T4), con la intención de abarcar un año fluvial (seco y lluvioso). Los datos de pluviosidad, humedad relativa y la temperatura del aire se recogieron de la estación meteorológica Manecorro RM1, la cual pertenece a las instalaciones de la Infraestructura Científica y Técnica singular (ITS) (<http://icts.ebd.csic.es/>) del parque Nacional de Doñana situada entorno a escasos 200 m de distancia del punto S3, y también, de la Estación Manual Palacio de Doñana (EM05, <http://www.rbd.ebd.csic.es>).

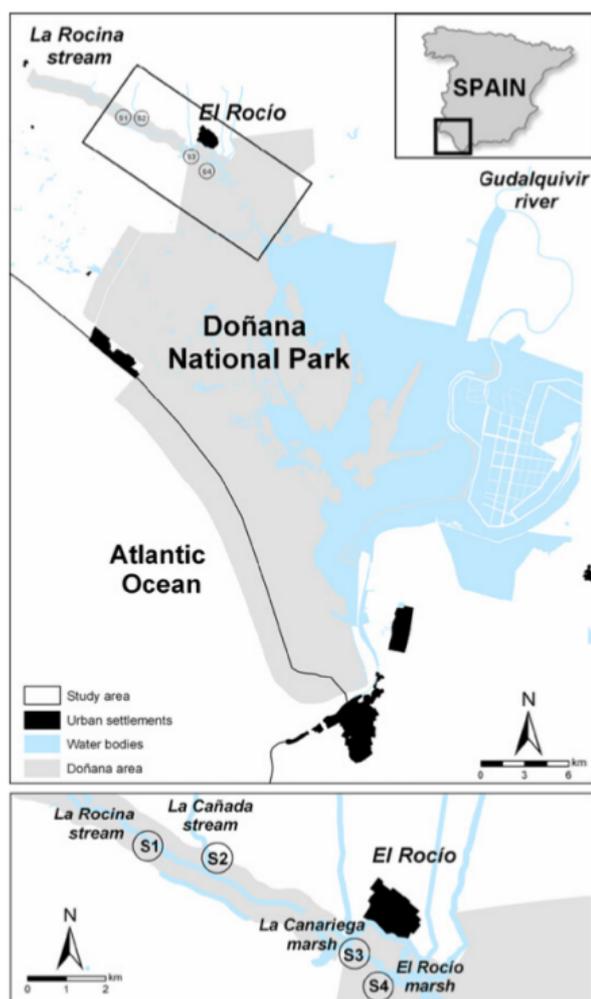


Fig. 1. Geographical situation of Doñana National Park (DNP) and La Rocina Stream. Sampling sites: Palacio del Acebrón (S1), Arroyo de la Cañada (S2), Vado de la Canariega (S3) and Marisma del Rocio (S4).

2.2. Propiedades fisicoquímicas.

Cuatro réplicas de las aguas superficiales, tomadas aproximadamente entre 1-2 m desde la orilla en los arroyos y 3-4 m desde las lagunas, y una muestra semiperturbada de los sedimentos, tomada en el perfil de 0-10 cm de la capa superficial usando un muestreador EIJKELKAMP, se tomaron en cada lugar de estudio. Las muestras se transportaron en una nevera portátil hasta el laboratorio para ser procesadas durante las siguientes 24 horas. Una submuestra de los sedimentos se congeló a -20°C y se liofilizó para usarse en los correspondientes análisis de actividades enzimáticas.

En las muestras de agua, se analizó el pH, la conductividad eléctrica (EC) usando un pHmímetro y conductímetro Crison 20 y Basic 525 Crison respectivamente. El agua se filtró a $0,45\ \mu\text{m}$ y se determinó el carbono orgánico disuelto (DOC) y el nitrógeno total disuelto (TDN) usando un analizador automático Shimadzu TOC-VCSN. La

concentración de NO_3^- y NO_2^- se determinó con un cromatógrafo líquido (HPLC) equipado una columna IC-Pac anion HC (Waters) disponible en el Servicio de Análisis de la EEZ-CSIC. El contenido en NH_4^+ se determinó colorimétricamente según el método de la reacción de Berthelot (Kempers y Zweers, 1986; Sommers y col., 1992), añadiendo citrato sódico a las muestras para complejar los cationes divalentes. Los macro y microelementos (P, K, Ca, Mg, Na, S, Fe, Cu, Mn, y Zn) se analizaron mediante un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-óptico) modelo Varian ICP 720-ES.

La textura de los sedimentos se determinó según lo descrito en los Métodos Oficiales de Análisis de Suelos y Aguas (MAPA, 1974). El NH_4^+ se extrajo mediante una extracción mecánica durante 2 h con KCl 2N con una relación de extracción de 1:20 (peso/volumen). Para el NO_3^- y NO_2^- , la extracción se realizó de forma similar pero usando con agua destilada. Tanto el NH_4^+ como el NO_3^- y NO_2^- se determinaron según la metodología comentada anteriormente. Todos los análisis de los sedimentos se realizaron después de someter a las muestras a liofilización, molienda y tamizado a 0,2 mm. El pH y la EC se midieron después de una extracción acuosa durante 2 h con una relación de extracción de 1:5 (p/v). El contenido en carbono orgánico (TOC) y el nitrógeno total (TN) se determinaron con un analizador elemental marca LECO TruSpec CN Elemental Analyzer.

El DOC y TDN se obtuvieron mediante extracción acuosa durante 2 horas usando una relación de extracción de 1:20 (p/v) y se analizó de igual manera que para las aguas superficiales. Los macro y microelementos se analizaron mediante ICP-OES después de una digestión por microondas usando una mezcla de HF:HCl (1:1). El nitrógeno orgánico (N_{ORG}) se calculó tanto en las aguas superficiales como en los sedimentos por diferencia entre el el TN y el nitrógeno inorgánico (N_{INORG}), siendo este la suma del $N\text{-NO}_3^- + N\text{-NO}_2^- + N\text{-NH}_4^+$.

2.3. Análisis enzimáticos en los sedimentos.

Para conocer la actividad metabólica de los principales ciclos biogeoquímicos en los sedimentos, se analizaron las siguientes actividades enzimáticas: La actividad deshidrogenasa, que se usó como una estimación de la actividad total microbiana, β -glucosidasa como la enzima que cataliza la hidrólisis de disacáridos (ciclo del C), aril-sulfatasa como medida de las enzimas que catalizan la hidrólisis de los ésteres orgánicos sulfatados (ciclo del S), fosfatasa ácida como medida de la enzima responsable de la sobreutilización de los fosfatos orgánicos (ciclo de P) y ureasa, la cual cataliza la hidrólisis de urea en CO_2 y NH_3 (ciclo del N). La actividad deshidrogenasa se determinó según lo descrito por García y col. (1997), β -glucosidasa, aril-sulfatasa y fosfatasa ácida según lo descrito por Tabatabai (1982) y la actividad ureasa según lo descrito por Kyeler y Gerber (1988). De forma resumida, estas técnicas se basan en hacer incubaciones de los sedimentos en condiciones controladas en presencia de los sustratos iniciales de las propias enzimas: (INT: 2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-tetrazolium para la deshidrogenasa, pNG: 4-nitrophenyl-beta-d-glucopyranoside para β -glucosidasa, pNPS: p-nitrophenyl sulphate para la aril-sulphatase, pNPP: 4-nitrophenyl phosphate para la fosfatasa ácida y urea para la ureasa respectivamente), y posterior medida colorimétrica del producto resultante de la actividad (INTF: iodonitrote-trazolium formazan para la deshidrogenasa; pNP: p-nitrophenol para la β -glucosidasa, aril-sulfatasa y fosfatasa ácida; y NH_4^+ , medido como se ha comentado anteriormente para las muestras de aguas y sedimentos, para la actividad ureasa.).

2.4. Emisión gaseosa (CO_2 , CH_4 y N_2O) y potencial desnitrificante de los sedimentos.

La emisión de CO_2 , CH_4 y N_2O se midió durante una incubación aeróbica de 24 h a 25°C de 20-30 g de sedimentos recién muestreados en botes de cristal de 125 ml. La concentración de gases se analizaron en el espacio de cabeza de los botes usando un cromatógrafo de gases Varian 4900 Gas Chromatograph equipado con una columna PoraPlot Q (10 m de longitud y 0.15 mm de diámetro interno) y con un detector de conductividad térmica (TCD). La actividad enzimática desnitrificante (DEA) y el potencial de desnitrificación (DP) se analizaron en los mismos sedimentos recién recolectados mediante la técnica de inhibición de acetileno adaptada de Simek y col (2004). DEA es una medida de las enzimas desnitrificantes en los sedimentos y refleja las condiciones ambientales en el momento del muestreo que pueden inducir la actividad de las bacterias desnitrificantes, mientras que DP representa el potencial de desnitrificación a largo plazo, permitiendo un crecimiento de dichas bacterias (Tiedje, 1994). DEA fue determinado preparando un lodo de dichos sedimentos incubado en condiciones anaeróbicas. Se usó 25 g de sedimento y a los que se añadieron 25 ml de una disolución que contenía 1 mM de glucosa, 1 mM de KNO_3 y 1 g l^{-1} de cloranfenicol, usando como bacteriostático. Las incubaciones se realizaron en botes de 125 ml a los que se gaseó el espacio de cabeza con He, para posteriormente añadirles 10 ml de acetileno puro (10% del volumen del bote). Las muestras se incubaron a 25°C con agitación, midiendo los gases en el espacio de cabeza a los 30 y 60 minutos de la misma manera que se comentó anteriormente. La actividad DEA se calculó como el incremento de emisión de N_2O entre ambos tiempos, teniendo

en cuenta la corrección de la solubilidad del N₂O en agua (coeficiente de Bunsen a 25°C es 47%). DP se determinó mezclando 6 gramos del sedimento húmedo con 5 ml de una solución conteniendo 1 mM de KNO₃ y 1mM de glucosa en un bote de 125 ml. Después de cambiar la atmósfera del frasco cuatro veces con He, se añadió 10 ml de acetileno puro y las muestras se incubaron a 25 °C durante 48 h. La actividad DP se calculó como el incremento de N₂O en el espacio de cabeza después de dos días de incubación, teniendo en cuenta la corrección de la solubilidad del N₂O en el agua.

2.5. Medidas isotópicas.

El $\delta^{15}\text{N}$ del NO₃⁻ se determinó siguiendo la metodología descrita previamente por Silva y col. (2000) con ligeras modificaciones. Las muestras de agua superficial (entre 10-30 l) se filtraron a través de un papel Whatman de 0,45 μm (High Capacity GWV, Groundwater Sample Filter). Para eliminar las posibles interferencias debidas a la presencia de sulfatos y fosfatos, se añadió BaCl₂, y el exceso de CO₂ disuelto se eliminó añadiendo poco a poco HCl concentrado y calentado ligeramente. Después, las muestras de agua se eluyeron secuencialmente a través de una resina de intercambio catiónica (AG 50W X8 100–200 mesh, Bio-Rad) para eliminar la materia orgánica disuelta y el exceso de Ba²⁺, y a través de una resina de intercambio aniónico (AG1 X8 100–200 mesh, Bio-Rad) para retener el NO₃⁻. Finalmente, el NO₃⁻ se eluyó añadiendo a la columna HCl 1N, y se neutralizó el eluyente que contenía HNO₃ y HCl añadiendo Ag₂O. El precipitado de AgCl formado se filtró con una membrana de 0,45 micras dejando solamente Ag⁺ y el NO₃⁻ en la disolución, que se congeló y liofilizó para obtener AgNO₃ puro en estado sólido.

La relación isotópica del nitrógeno y el contenido total de AgNO₃ obtenido se analizó usando un analizador elemental Carlo Elba NC1500 acoplado en línea con un espectrómetro de masas Delta Plus XL (ThermoQuest, (EA-IRMS). La precisión de la medida fue de $\pm 0.1\%$ para $\delta^{15}\text{N}$. La relación isotópica $\delta^{15}\text{N}$ se expresa en valores por mil: $\delta = (R \text{ muestra} / R \text{ estándar} - 1) \times 1000$, donde $R = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ para $\delta^{15}\text{N}$. El contenido en nitrógeno de las muestras obtenidas de AgNO₃ fue del 8%, lo que significó que no existía contaminación en las muestras precipitadas. N₂ calidad comercial se usó como estándar interno para la determinación de los análisis isotópicos de nitrógeno, y los resultados se compararon con los estándares internacionales. Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ para todas las muestras se normalizaron usando los materiales de referencia (IAEA N1, $\delta^{15}\text{N} = +0.4\%$, IAEA N2, $\delta^{15}\text{N} = +20.3\%$). La relación isotópica del nitrógeno en el AgNO₃ obtenido se contrastó con el estándar IAEA-NO-3 nitrato potásico con $+4.65\%$ ($n = 12$), siendo similar a los valores obtenidos. Los análisis de la relación isotópica se realizaron por duplicado con una precisión mayor que $\pm 0.2\%$. Finalmente, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ se calcularon en relación con el N del aire.

2.6. Estudio estadístico.

Las diferencias entre los parámetros fisico-químicos se evaluaron calculando el análisis de la varianza (ANOVA), con el test de Tukey como *post-hoc* ($p < 0.05$). Los coeficientes de Pearson se calcularon para conocer la correlación entre variables con el software SPSS 17.0 disponible para Windows XP. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó para conocer la relación entre los parámetros fisico-químicos de los sedimentos y sus actividades enzimáticas, así como la emisión de gases.

3. Resultados.

3.1. Datos meteorológicos.

Traducción del trabajo *G. Tortosa, D. Correa, A. J. Sánchez-Raya, A. Delgado, M. A Sánchez-Monedero y E. J. Bedmar. 2011. Nitrate contamination, physicochemical properties and biological activities in surface waters and sediments of La Rocina stream (Doñana National Park, SW Spain): Greenhouse gas emissions and denitrification. Ecological Engineering. 37, 539-548. doi:10.1016/j.ecoleng.2010.06.029*

La cantidad total de lluvia caída en DNP durante el periodo de estudio fue de 299.9 mm, un valor menor de 477.5 mm, la media en los últimos cinco años. Las principales precipitaciones se registraron en octubre de 2008 (119.25 mm) y marzo-abril (49.99 y 30.90 mm) respectivamente, las cuales coincidieron con los tiempos de muestreo T1 y T3. El tiempo T2 (enero de 2009) presentó solo 9.3 mm y T4 (julio de 2009) 0.11 mm, siendo esta la estación más seca. Este régimen de lluvias afectó a la dinámica de los cauces de agua superficial en los lugares estudiados, en especial en el tiempo T4, transformándolos en zonas de agua estancada. Esto fue notable en S3, que presentó un elevado grado de eutofización. La humedad relativa fue mayor en los periodos de otoño e invierno (T1= 73.79% y T2= 79.69%) que en los de primavera y verano (T3= 65.38% y T4= 48.68%), descendiendo la temperatura ambiental (T1: 18.04 °C, T2: 9.73 °C, T3: 14.55 °C y T4: 25.31 °C).

3.2. Aguas superficiales: características fisicoquímicas y análisis isotópicos.

Las aguas superficiales mostraron unos valores de pH ligeramente básicos, especialmente S2, S3 y S4 (medias de 7.94 y 7.83 en S2, S3 y S4, respectivamente, Tabla 1a). La EC se relacionó con la concentración total de K, Ca, Mg, Na y S presentes en las aguas, y sus valores variaron entre 0.12 y 1.22 dS m⁻¹, dependiendo del tiempo de muestreo. Los valores mayores de EC (3.11 dS m⁻¹) se dieron en la sesión más lluviosa (T1), con la excepción de la registrada en S3 durante la época más seca (T4), debido a la eutrofización observada en la zona encharcada. En general, la materia orgánica disuelta fue mayor en T1 (S1= 17.7; S2= 28.3 y S4= 77.7 mg l⁻¹ de DOC) para todos los lugares de muestreo, con la excepción de S3, que presentó 135.2 mg l⁻¹ de DOC en T4, debido a la alta eutrofización observada, que produjo un elevado contenido en suspensión de algas cuyo aspecto visual era verdoso. De hecho, la concentración de P en esta localización fue la mayor de todas las estudiadas.

S2 presentó los mayores valores de TDN (comprendido entre 21.6 y 9.4 mg l⁻¹) en comparación con las otras tres localizaciones estudiadas (S1, S3 y S4), las cuales presentaron valores medios de 0.5, 6.2 y 2.3 mg l⁻¹, respectivamente (Tabla 1b). En S3, durante el periodo más seco (T4), TDN mostró un valor de 18.1 mg l⁻¹, debido fundamentalmente al alto valor de NH₄⁺ detectado (Tablas 1a y 1b). S2 presentó la mayor concentración de NO₃⁻ (61.6, 106.6, 101.6 y 68.8 mg l⁻¹ en T1, T2, T3 y T4, respectivamente), con respecto al resto de lugares estudiados (menos de 6 mg l⁻¹, Tabla 1a). Estas concentraciones representaron cerca del 90 y 97 % del TDN de las muestras superficiales (Tabla 1b). Además, este hecho se notó en la relación DOC/TDN, cuyos valores fueron menores en S2 (media de 0.6) que en S1, S3 y S4 (con 23.7, 12.9 y 10.2 respectivamente). En estos puntos de muestreo presentaron una importante fracción de nitrógeno orgánico (medias de 74.6, 68.9 y 50.1 % respectivamente), pero no S2, que fue predominantemente inorgánico (media de 92.4 % de NO₃⁻ respecto al TDN).

El análisis isotópicos del N-NO₃⁻ solo se pudo realizar en S2, el lugar con mayor concentración. Los valores de δ¹⁵N estuvieron comprendidos en el rango de -1.6 y +6 ‰ con una media de -0.78 ‰. Este valor bajo, parecido al valor atmosférico, indicó que la contaminación por nitratos provenía de un origen inorgánico (Vitoria y col. 2004). Es más, la media de los valores de δ¹⁵N para los principales fertilizantes inorgánicos varía entre -4 y +6 ‰ (Otero y col., 2005). Así, el valor de la relación isotópica de nitrógeno indicó que el origen se debe principalmente a los fertilizantes minerales usados en las fincas agrícolas colindantes.

Table 1a
Physicochemical properties of the surface waters at the sampling sites.

Sampling site	Times	pH	EC ^a	DOC ^b	NO ₃ ^{-b}	NO ₂ ^{-b}	NH ₄ ^{+b}	P ^b	K ^b	Ca ^b	Mg ^b	Na ^b	S ^b	Fe ^b	Cu ^b	Mn ^b	Zn ^b	
S1	T1	6.62b	0.63a	17.7a	0.2c	nd	0.1	<0.6	9.0a	49.3a	20.9a	66.8a	61.2a	0.0d	nd	0.9	<0.01	
	T2	6.57b	0.26c	16.7b	0.3b	0.6	nd	<0.6	4.8c	12.6b	6.0c	43.8b	7.0c	0.3a	0.1	<0.01	0.3	
	T3	6.99b	0.12d	5.7d	0.6a	nd	nd	nd	<0.6	2.0d	7.2c	3.3d	16.8c	2.4d	0.1c	0.1	<0.01	0.2
	T4	7.60a	0.33b	8.9c	nd	nd	nd	nd	<0.6	5.2b	3.4d	8.6b	8.6d	46.6b	0.2b	<0.01	<0.01	0.2
S2	T1	7.75c	0.52c	28.3a	61.6d	0.1c	0.1	<0.6	10.9c	38.5b	6.8d	20.5c	16.2c	nd	nd	<0.01	<0.01	
	T2	7.15d	0.57b	3.6c	106.6a	nd	nd	1.9a	16.0b	36.5c	11.2c	28.7b	18.5c	<0.01	0.1	0.1	<0.01	
	T3	8.89a	0.62a	6.7b	101.6b	0.5b	0.1	1.2b	27.7a	56.9a	20.3b	51.6a	30.0b	<0.01	0.1	0.1	<0.01	
	T4	7.96b	0.50d	3.1c	68.8c	1.2a	nd	0.6c	14.4b	15.1d	58.7a	16.6c	46.2a	0.1	<0.01	0.1	0.1	
S3	T1	8.03b	1.22b	68.1b	1.9	0.5	0.3b	<0.6	24.3b	71.2a	25.3b	144.2a	84.1b	nd	<0.01	<0.01	nd	
	T2	7.30c	0.44c	12.3c	3.0	0.4	nd	<0.6	5.5d	24.2d	7.9b	37.9c	14.9b	nd	0.1	<0.01	0.1	
	T3	8.38a	0.34d	21.0c	nd	nd	0.2b	<0.6	9.7c	28.8c	12.2b	53.1b	9.2b	0.52	0.3	<0.01	0.5	
	T4	8.03b	3.11a	135.2a	nd	nd	4.7a	2.3	41.3a	43.0b	30.1a	30.2d	581.3a	0.22	<0.01	<0.01	<0.01	
S4	T1	7.95a	0.90a	77.7a	1.1c	0.1a	0.8b	<0.6	21.2a	70.3a	25.6b	103.4a	42.9b	<0.01	<0.01	0.2b	nd	
	T2	7.54b	0.34d	6.8d	3.6b	0.2a	0.3d	<0.6	4.5d	23.0c	6.3d	25.4c	9.6d	<0.01	<0.01	0.2b	<0.01	
	T3	8.32a	0.60c	12.9c	5.7a	nd	0.1c	<0.6	13.7c	51.4b	21.6c	79.4b	24.7c	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
	T4	7.51b	0.83b	16.3b	nd	nd	0.9a	<0.6	17.3b	14.1d	59.2a	26.0c	105.3a	<0.01	<0.01	1.2a	0.1	
S		*	*	*	*	-	*	-	*	*	*	*	*	-	-	-	-	
T		*	*	*	*	-	*	-	*	*	*	*	*	-	-	-	-	
S × T		*	*	*	*	-	*	-	*	*	*	*	*	-	-	-	-	

Sampling sites: Palacio del Acebrón (S1), Arroyo de la Cañada (S2), Vado de la Canariega (S3) and Marisma del Rocío (S4). Sampling times: October 2008 (T1), January 2009 (T2), April 2009 (T3) and July 2009 (T4). For each variable, at a given sampling site, values followed by the same letter are not statistically different according to Tukey's test at $p \leq 0.05$.

^a Values of electrical conductivity (EC) are expressed in dS cm^{-1} .

^b Values of dissolved organic carbon (DOC), NO_3^- , NO_2^- and NH_4^+ are expressed in mg L^{-1} . nd: no detected.

* $p \leq 0.05$.

Table 1b
Total dissolved nitrogen (TDN), dissolved organic carbon (DOC) and organic nitrogen (N_{ORG}) in the surface waters at the sampling sites.

Sampling site	Times	TDN (mg L^{-1})	DOC/DN	N_{ORG} (%)	N- NO_3^- (%)	N- NO_2^- (%)	N- NH_4^+ (%)
S1	T1	0.6b	29.5	79.5	7.5	-	13.0
	T2	0.7a	23.9	64.2	9.7	26.1	-
	T3	0.3d	19.0	54.8	45.2	-	-
	T4	0.4c	22.3	100.0	-	-	-
S2	T1	15.6b	1.8	10.1	89.2	0.2	0.5
	T2	15.3b	0.1	3.7	96.3	-	-
	T3	21.6a	0.3	4.2	94.7	0.7	0.4
	T4	9.4c	0.2	8.6	89.3	2.1	-
S3	T1	4.4b	15.5	81.5	9.8	3.5	5.3
	T2	1.1b	11.2	27.3	61.6	11.1	-
	T3	1.2b	17.5	87.0	-	-	13.0
	T4	18.1a	7.5	79.8	-	-	20.2
S4	T1	3.6a	21.6	75.0	6.9	0.8	17.3
	T2	1.1d	6.2	20.6	73.9	5.5	-
	T3	2.1c	6.1	35.0	61.3	-	3.7
	T4	2.3b	7.1	69.6	-	-	30.4

Sampling sites: Palacio del Acebrón (S1), Arroyo de la Cañada (S2), Vado de la Canariega (S3) and Marisma del Rocío (S4). Sampling times: October 2008 (T1), January 2009 (T2), April 2009 (T3) and July 2009 (T4). For TDN, at a given sampling site, values followed by the same letter are not statistically different according to Tukey's test at $p \leq 0.05$. $\text{N}_{\text{ORG}} = \text{TDN} - \text{N}_{\text{INORG}}$, where N_{INORG} (inorganic nitrogen) = $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^- + \text{N-NH}_4^+$. nd, no detected.

3.3. Sedimentos: propiedades fisicoquímicas, actividades enzimáticas y producción de gases.

Traducción del trabajo G. Tortosa, D. Correa, A. J. Sánchez-Raya, A. Delgado, M. A. Sánchez-Monedero y E. J. Bedmar. 2011. Nitrate contamination, physicochemical properties and biological activities in surface waters and sediments of La Rocina stream (Doñana National Park, SW Spain): Greenhouse gas emissions and denitrification. Ecological Engineering. 37, 539–548. doi:10.1016/j.ecoleng.2010.06.029

Los sedimentos estaban formados por cerca del 85% de arena, y de acuerdo con su contenido, así como el de limo y arcilla, los sedimentos S1 y S2 se clasificaron como arcilloso-arenoso, arenoso para S3 y arenoso-arcilloso para S4. Al igual que en las aguas superficiales, los valores de pH, CE y contenido en macro y micro nutrientes en los sedimentos variaron a lo largo de los lugares y tiempos estudiados (Tabla 2a). A pesar de esas diferencias, los valores de TOC y TN fueron siempre mayores en S1 que en el resto de puntos (Tabla 2b). Independientemente de los puntos y tiempos, más del 90% del contenido en nitrógeno de los sedimentos fue de naturaleza orgánica, al igual que para DOC y TDN (Tabla 2b). De forma similar, las actividades β -glucosidasa, deshidrogenasa, ureasa, fosfatasa ácida y aril-sulfatasa variaron considerablemente entre puntos y tiempos estudiados (Fig. 2). Mientras que S4 mostró los valores mayores de deshidrogenasa (media de 10.26 $\mu\text{g INTF g}^{-1}\text{h}^{-1}$), fosfatasa ácida (media de 23.5 $\mu\text{g pNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$), ureasa, (media de 600 $\mu\text{g pNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$) y aril-sulfatasa (media de 400 $\mu\text{g pNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$), S1 fue la que mostró un valor mayor en la actividad β -glucosidasa, con medias de 90 $\mu\text{g pNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Fig. 2).

Table 2a
Physicochemical properties of the sediments at the sampling sites.

Sampling site	Times	pH (1:5)	EC (1:5) ^a	P ^b	K ^b	Ca ^b	Mg ^b	Na ^b	S ^b	Fe ^b	Cu ^c	Mn ^c	Zn ^c
S1	T1	5.44	860	0.12d	5.07c	7.28a	3.09b	0.71b	7.75b	16.39a	11c	252a	25b
	T2	5.51	390	0.45b	5.51b	5.89b	2.88b	0.71b	3.34d	15.40b	25a	163c	27b
	T3	3.98	565	0.83a	4.43d	5.28c	1.96c	0.55c	9.66a	13.47c	11c	98d	44a
	T4	5.90	178	0.32c	6.71a	6.89a	3.40a	0.82a	5.61c	13.42c	11c	189b	22b
S2	T1	5.05d	628a	0.12d	2.92b	5.04bc	1.72a	0.28a	3.80a	10.32b	8a	136a	16b
	T2	7.13c	82c	0.45a	3.21a	3.86c	1.79a	0.24b	0.65b	12.26a	4b	136a	17b
	T3	7.59b	153b	0.21c	1.92c	5.75b	0.92c	0.21bc	0.48c	5.06d	10a	114b	16b
	T4	8.26a	113bc	0.27b	2.02c	36.83a	1.33b	0.21c	0.52c	5.81c	9a	107b	19a
S3	T1	8.58a	90b	0.12b	0.68b	0.44c	0.44bc	0.10b	0.16a	2.57ab	5a	58a	7c
	T2	7.72c	84c	0.45a	0.91b	0.96a	0.62b	0.10b	0.15a	4.11a	4a	82a	11a
	T3	6.75d	39d	0.02c	0.57b	0.25c	0.28c	0.11b	0.14a	2.07b	2a	65a	17b
	T4	8.20b	101a	0.04c	1.29a	0.68b	0.76a	0.25a	0.12a	3.61ab	2a	69a	4d
S4	T1	7.36c	117c	<0.01	1.92d	1.32d	1.08c	0.23a	0.20a	5.66d	3d	140c	13d
	T2	7.55b	165b	<0.01	8.72b	5.58a	5.19a	0.48b	0.67a	26.60a	26a	313a	56a
	T3	6.81d	115c	0.17b	7.61c	2.78c	3.51b	0.49b	0.59a	13.67c	19c	150c	34c
	T4	7.68a	221a	0.33a	10.95a	4.37b	5.12a	0.80a	0.65a	19.37b	23b	256b	46b
S		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
S × T		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Sampling sites: Palacio del Acebrón (S1), Arroyo de la Cañada (S2), Vado de la Canariega (S3) and Marisma del Rocío (S4). Sampling times: October 2008 (T1), January 2009 (T2), April 2009 (T3) and July 2009 (T4). For each variable, at a given sampling site, values followed by the same letter are not statistically different according to Tukey's test at $p \leq 0.05$.

- ^a Values of EC (electrical conductivity) are expressed in $\mu\text{S cm}^{-1}$.
^b For each variable, values are expressed in g kg^{-1} (sediment dry weight).
^c For each variable, values are expressed in mg kg^{-1} (sediment dry weight).
* $p \leq 0.05$.

Table 2b
Total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), organic nitrogen (N_{ORG}), dissolved organic carbon (DOC) and dissolved nitrogen (DN) in sediments at the sampling sites.

Sampling site	Season	TOC ^a	TN ^a	TOC/TN	N_{ORG} (%)	$\text{NO}_3^{-\text{b}}$	$\text{NO}_2^{-\text{b}}$	$\text{NH}_4^{+\text{b}}$	DOC ^b	DN ^b
S1	T1	183.4a	5.7b	31.9	99.4	nd	nd	41b	1137c	70b
	T2	154.2b	9.0a	17.1	99.5	34	nd	44b	2580a	144a
	T3	99.8c	3.7c	27.3	99.3	7	nd	30c	332d	30c
	T4	206.0a	6.9b	29.8	99.1	nd	nd	79a	1934b	138a
S2	T1	78.4a	3.1a	25.5	99.6	32	nd	6c	280b	22bc
	T2	18.3b	1.0c	18.8	97.5	54	nd	16b	258b	23b
	T3	38.4b	1.6bc	23.7	97.8	3	nd	45a	174c	16c
	T4	22.7b	0.5c	42.9	96.8	nd	nd	20b	412a	42a
S3	T1	3.1a	0.3a	11.7	98.5	32a	nd	6c	163b	15b
	T2	3.4a	0.3a	12.2	97.8	4b	nd	7c	147b	17b
	T3	1.8b	0.2a	8.3	92.3	3b	nd	20b	25c	3c
	T4	1.7b	0.2a	11.0	89.9	nd	nd	26a	206a	33a
S4	T1	5.4d	0.4c	10.8	97.3	nd	nd	14c	310c	27c
	T2	16.6c	1.5b	10.9	98.6	4	nd	25b	382b	43b
	T3	25.2a	1.9a	12.6	97.7	nd	nd	55a	196d	19c
	T4	20.1b	1.9a	10.5	98.8	nd	nd	30b	669a	104a
S		*	*	*	*	-	-	*	*	*
T		*	*	*	*	-	-	*	*	*
S × T		*	*	*	*	-	-	*	*	*

Sampling sites: Palacio del Acebrón (S1), Arroyo de la Cañada (S2), Vado de la Canariega (S3) and Marisma del Rocío (S4). Sampling times: October 2008 (T1), January 2009 (T2), April 2009 (T3) and July 2009 (T4). For each variable, at a given sampling site, values followed by the same letter are not statistically different according to Tukey's test at $p \leq 0.05$.

- ^a Values of TOC and TN are expressed in g kg^{-1} (sediment dry weight).
^b Values of NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , DOC and DN are expressed in mg kg^{-1} (sediment dry weight). DOC and DN were obtained after 2 h water extraction (1:20, w/v) of the lyophilized sediments. $N_{\text{ORG}} = \text{TN} - N_{\text{INORG}}$, where N_{INORG} (inorganic nitrogen) = $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^- + \text{N-NH}_4^+$. nd, no detected.
* $p \leq 0.05$.

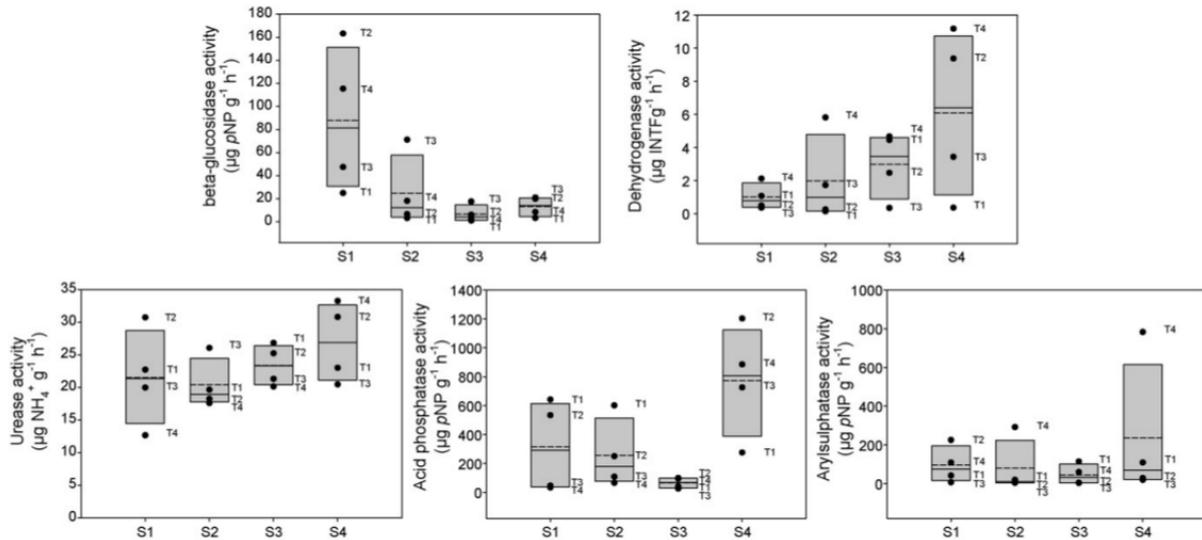


Fig. 2. β -Glucosidase, dehydrogenase, urease, acid phosphatase and arylsulphatase activities in sediments. Vertical boxes show the median (dash line), mean (solid line) and the 5th/95th percentiles. Sampling sites: Palacio del Acebrón (S1), Arroyo de la Cañada (S2), Vado de la Canaria (S3) and Marisma del Roció (S4). Sampling times: October 2008 (T1), January 2009 (T2), April 2009 (T3) and July 2009 (T4).

Los valores promedio de emisión de CO_2 en los puntos S1, S2, S3 y S4 fueron de 112, 89, 13, y 41 $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectivamente (Fig. 3). La producción de CH_4 fue también mayor en S1 (9.7 $\mu\text{g C-CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{d}^{-1}$) que en S3 y S4 (0.2 y 0.3 $\mu\text{g C-CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{d}^{-1}$ respectivamente), siendo la producción de S2 en general muy baja. Sorprendentemente, los valores obtenidos en S2 en el tiempo T3 fueron los mayores de todas las muestras analizadas (34.9 $\mu\text{g C-CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{d}^{-1}$) (Fig. 3). S2, el lugar con mayor contenido en nitrato en las aguas superficiales, y S4, mostraron los mayores valores de emisión de N_2O , con medias de 500 y 310 $\text{ng N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{d}^{-1}$ respectivamente. El potencial desnitrificante, medido por las actividades DEA y DP, mostraron que S1 y S2 fueron los lugares con mayor potencial de desnitrificación comparados con S3 y S4. Los valores mayores de DEA se obtuvieron en S4 durante la estación seca (T4), con 1115, 2246 y 719 $\text{ng N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{h}^{-1}$ en S1, S2 y S4, respectivamente. A pesar de las fluctuaciones observadas durante los tiempos de estudio, S1 y S2 mostraron también valores mayores en DP, con 218, 164, 58 y 89 $\mu\text{g N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{d}^{-1}$ en S1, S2, S3 y S4, respectivamente.

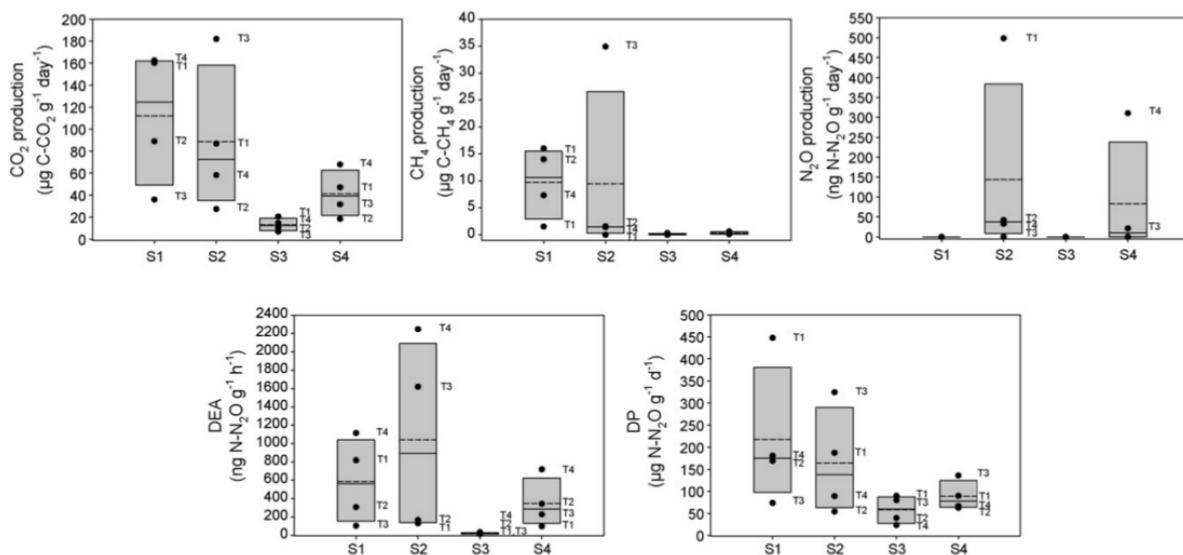


Fig. 3. CO_2 , CH_4 and N_2O emissions, denitrifying enzymatic activity (DEA) and denitrification potential (DP) in sediments. The vertical boxes show the median (dash line), mean (solid line) and the 5th/95th percentiles. Sampling sites: Palacio del Acebrón (S1), Arroyo de la Cañada (S2), Vado de la Canaria (S3) and Marisma del Roció (S4). Sampling times: October 2008 (T1), January 2009 (T2), April 2009 (T3) and July 2009 (T4).

3.4. Estudio estadístico.

La matriz de correlación de Pearson reveló que TOC, TN, NH_4^+ , DOC y TDN se correlacionaron positivamente ($p \leq 0.01$) con la emisión de CO_2 y con la actividad β -glucosidasa (Tabla 3). Después del análisis de PCA, excepto para el nitrato y el pH, todos los parámetros se agruparon en 3 bloques de datos diferenciados (Fig. 4a). El primero de ellos agrupó la mayoría de parámetros relacionados con la fracción orgánica de los sedimentos ((TOC, TN, DOC, TDN, NH_4^+ , CO_2 , CH_4 , DP y β -glucosidasa), el segundo con la fracción inorgánica (K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn), y el tercero, agrupó al resto de actividades enzimáticas como la deshidrogenasa, fosfatasa ácida, ureasa y aril-sulfatasa. El componente principal de la gráfica (PC1) consiguió explicar el 36.79 % de la varianza total de los datos, mientras que el componente secundario (PC2) explicó el 20.34%. De acuerdo con estos dos ejes, los lugares de muestreo se organizaron en función de los tres grupos anteriormente comentados (Fig. 4b). Consecuentemente, S1 mostró los valores mayores para la fracción orgánica y S4 en la fracción de actividades enzimáticas. A pesar de todo, los tamaños de los grupos indicaron que las variaciones estacionales influyeron notablemente más a S1 y S4 que a S2 y S3.

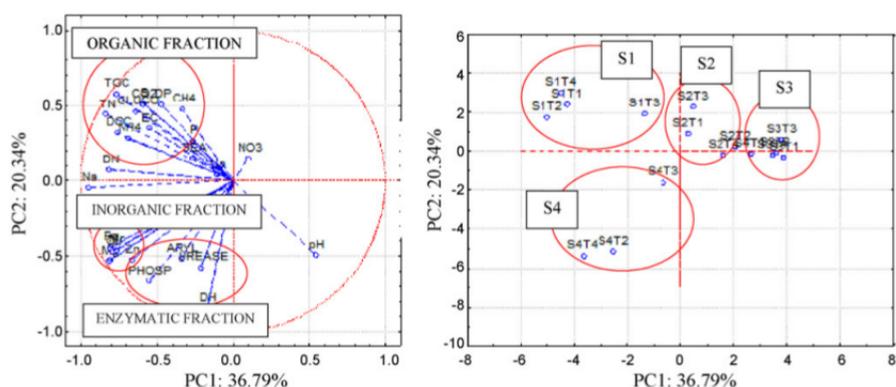


Fig. 4. (a) Principal component analysis performed on the whole set of measured sediments properties and (b), the spatial and seasonal distribution of the parameters. Sampling sites: Palacio del Acebrón (S1), Arroyo de la Cañada (S2), Vado de la Canariega (S3) and Marisma del Rocío (S4). Sampling times: October 2008 (T1), January 2009 (T2), April 2009 (T3) and July 2009 (T4).

4. Discusión.

Aunque en gran medida depende de los lugares de muestreo, las propiedades fisicoquímicas de las aguas superficiales analizadas a lo largo del arroyo de La Rocina dependieron del tiempo en el cual se realizó el muestreo, en especial durante el régimen de lluvias. Estos resultados están conformes con los encontrados por Espinar y Serrano (2009), que indicaron que el desarrollo de humedales temporales en DNP depende en gran medida del clima y de la geología de la región. Esto es especialmente importante en humedales situados en áreas semiáridas, como es el sur de España, donde la climatología es impredecible y produce un amplio rango de situaciones hidrológicas (Serrano y col., 2006). Así, es posible que el régimen de lluvia, la evaporación, las aguas subterráneas, las interacciones biogeoquímicas en la interfaz sedimento-agua pudiera afectar a la composición química de las aguas superficiales a lo largo del curso del arroyo de la La Rocina. La dinámica hidrogeológica en cada punto dependió del tiempo de muestreo, y esto se observó

claramente en S3 en T4, la estación más seca, donde las aguas del arroyo se transformaron en aguas estancadas, y también S4, donde prácticamente se secó la laguna de El Rocío.

Muchos autores han constatado el continuo incremento de la contaminación (Susó y Llamas, 1993; Olías y col., 2008), y más concretamente, la debida a los nitratos de origen agrícola en las aguas superficiales y subterráneas del DNP durante las últimas dos décadas (González-Quesada y col., 1987; Serrano y col., 2006). Recientemente, la contaminación debida a NO_3^- y SO_4^{2-} en el acuífero de Doñana se ha relacionado con el uso de agroquímicos durante las prácticas agrícolas que se realizan en la zona del ecotono del parque (Olías y col., 2008). En nuestro estudio, los valores de NO_3^- en S2 fueron mayores a 50 mg l^{-1} , valor definido en la directiva europea 91/676/CEE que implican contaminación de origen agrícola (European Commission, 1991). En este lugar, la concentración de nitrógeno inorgánico representó más del 90% del TDN. En este estudio y basado en los valores isotópicos del nitrógeno del nitrato presente en las aguas superficiales del arroyo de La Rocina, deducimos que ese nitrato es de origen inorgánico, y proviene presumiblemente de los fertilizantes químicos usados en las zonas agrícolas cercanas a DNP.

Por otro lado, la interpretación de la dinámica de los nutrientes en los ecosistemas acuáticos tiene importantes sesgos en las propiedades fisicoquímicas debido al efecto de la hidrología variable (Espinosa y Serrano, 2009). Por eso, un análisis de los procesos microbiológicos implicados en los principales ciclos son necesarios para conocer más en profundidad el estado de dichos ecosistemas (Faulwetter y col., 2009). Se conoce que los microorganismos del suelo median en numerosos procesos que son particularmente importantes en los humedales de agua dulce, donde los ciclos de nutrientes son muy dependientes de las fluctuaciones hidrológicas, y de la emisión de gases, haciendo que sean muy sensibles al cambio climático (Gutknecht y col., 2006). La determinación de las actividades enzimáticas en los sedimentos del arroyo de La Rocina variaron a lo largo de los tiempos y lugares de muestreo. Aunque hay pocos datos de esto, algunos estudios apuntan a que es un comportamiento común en muchos tipos de humedales (Gutknecht y col., 2006). En nuestro caso, la sequía y la temperatura ambiental afectaron positivamente a la actividad deshidrogenasa, siendo esta mayor en T4. De forma similar, la actividad β -glucosidasa se correlacionó significativamente con el contenido en materia orgánica, siendo los valores mayores detectados en S1 y S2, los lugares con mayor contenido de TOC. Estos resultados fueron similares a los observados por Williams y Jochem (2006), quienes vieron que a pesar de la complejidad de las relaciones entre los parámetros biológicos y ambientales, la cinética de muchas ectoenzimas, como la β -glucosidasa, estaban controladas por la disponibilidad de materia orgánica.

Los humedales tienen un papel muy importante en el ciclo global del carbono y en el cambio climático. La emisión de GEIs, en especial, CO_2 y CH_4 , mostró que existe una profunda variabilidad espacio-temporal debido a la compleja interacción con los procesos microbiológicos que producen la emisiones de dichos gases. El flujo de carbono se relaciona con muchos factores externos, incluidos el estado del suelo, las condiciones hidrológicas, el tipo de vegetación presente y las fuentes de nitrógeno exógenas (Ma y Lu, 2008). Como mostró la correlación de Pearson (Tabla 3), el CO_2 y CH_4 emitido mostraron un gran influencia estacional, especialmente en S1 y S2, los lugares con mayor TOC. Cabe resaltar que la concentración de NO_3^- incrementó la emisión de N_2O , pero también la de CO_2 y CH_4 . Estos resultados están conformes con los observados por Liu y Greaver (2009), las cuales mostraron que las alteraciones en los ciclos biogeoquímicos en la naturaleza puede propiciar flujos de emisión de CO_2 , CH_4 y N_2O , los principales GEIs involucrados en el calentamiento global.

Además de con el NO_3^- , la desnitrificación se correlacionó positivamente con el contenido en materia orgánica en los sedimentos. Así, se observó un incremento en el potencial de desnitrificación observado en los lugares donde el valor de TOC fue mayor. Valores similares fueron obtenidos en los sedimentos de tres humedales costeros estudiados por Dodla y col., (2008).

También, Sirivedhin y Gray (2006) encontraron que los potenciales de desnitrificación mostraban una correlación positiva con el carbono orgánico biodegradable y su concentración, producido por la presencia de algas periticas en humedales. En nuestro estudio, la desnitrificación también se vio afectada por el régimen pluvial, dando los mayores de DEA durante la estación más seca en todos los puntos estudiados. Hernández y Mitsch (2007) encontraron que la temperatura del suelo, la frecuencia del encharcamiento y la disponibilidad de nitrato eran los factores clave que afectan a la desnitrificación en humedales artificiales. Davidson (1991) observó un incremento en la producción de N_2O en la estación seca, y especialmente durante los ciclos de sequía-humedad de los suelos, causados por la acumulación temporal de nitrógeno mineral en la superficie, donde se desarrolla rápidamente la biomasa microbiana cuando el suelo seco se vuelve a hidratar.

5. Conclusiones.

Las aguas superficiales del arroyo de La Rocina presentaron una concentración de NO_3^- superior a 50 mg l^{-1} , indicando contaminación procedente de los fertilizantes inorgánicos usados en las zonas cercanas al DNP. Esta contaminación descendía a lo largo del curso del arroyo, no afectando a la masa de aguas superficiales de la marisma de la Rocio. De todas formas, se necesita más investigación para dilucidar su efecto en las aguas subterráneas del DNP. Las condiciones ambientales como la tasa de precipitación, la morfología hidrológica y el contenido en materia orgánica influyeron considerablemente en las propiedades fisicoquímicas de las aguas superficiales del humedal de DNP. La actividad biológica y la emisión de gases de efecto invernadero en los sedimentos acuáticos también mostraron grandes variaciones espacio-temporales, influidos por las condiciones ambientales, en especial la hidrología, siendo este efecto más notable durante la estación más seca. El proceso de desnitrificación se vio afectado por la actividad antropogénica (el nitrato procedente de fuentes agrícolas) y el régimen de lluvias, incremento la emisión de GEIs (CO_2 , CH_4 y especialmente N_2O) durante la estación seca en todos los lugares estudiados.

Agradecimientos.

Este trabajo se ha desarrollado gracias al apoyo económico de las ayudas CGL2006-06870 y CTM2009-1473-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación (España) y RNM-4746 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (España), todas ellas cofinanciadas con los fondos europeos para el desarrollo regional (FEDER). Además, la ayuda a nuestro grupo de investigación BIO-275 por parte de la Junta de Andalucía también se agradece. D. David Correa Galeote desea expresar su agradecimiento al Ministerio de Educación por su ayuda predoctoral (AP2007-03967). Los autores queremos agradecer a la Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC) y a los técnicos del Equipo de Seguimiento de Procesos Naturales (<http://icts-rbd.ebd.csic.es>), en especial a D. Miguel Ángel Bravo, por su ayuda de campo. También queremos agradecer al Dr. José Antonio Albuquerque y a la Dra. Pilar Bernal (CEBAS-CSIC), y a la Dra. Lourdes Sánchez por su ayuda en las determinaciones de DOC, TDN y NO_3^- , así como a la Dra. Belén Hinojosa, por su ayuda en el análisis estadístico. Además, queremos agradecer a los dos revisores anónimos sus comentarios que han permitido mejorar significativamente este manuscrito.

Referencias.

Arambarri, P., Cabrera, F., González-Quesada, R., 1996. Quality evaluation of the surface waters entering the Doñana National Park (SW Spain). *Sci. Total Environ.* 191, 185–196.

Traducción del trabajo *G. Tortosa, D. Correa, A. J. Sánchez-Raya, A. Delgado, M. A. Sánchez-Monedero y E. J. Bedmar. 2011. Nitrate contamination, physicochemical properties and biological activities in surface waters and sediments of La Rocina stream (Doñana National Park, SW Spain): Greenhouse gas emissions and denitrification. Ecological Engineering.* 37, 539-548. doi:10.1016/j.ecoleng.2010.06.029

- Aulakh, M.S., Doran, J.W., Mosier, A.R., 1992. Soil denitrification: significance, measurement, y effects of management. *Adv. Soil Sci.* 18, 1–52.
- Cabrera, F., Clemente, L., Díaz Barrientos, E., López, R., Murillo, J.M., 1999. Heavy metal pollution of soils affected by the Guadiamar toxic flood. *Sci. Total Environ.* 242, 117–129.
- Camargo, J.A., 1994. The importance of biological monitoring for the ecological risk assessment of freshwater pollution: a case study. *Environ. Int.* 20, 229–238.
- Camargo, J.A., Alonso, A., 2006. Ecological y toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environ. Int.* 32, 831–849.
- Christensen, P.B., Nielsen, L.P., Sorensen, J., Revsbech, N.P., 1990. Denitrification in nitrate-rich streams: diurnal y seasonal variation related to benthic oxygen metabolism. *Limnol. Oceanogr.* 35, 640–651.
- Conrad, R., 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, y NO). *Microbiol. Rev.* 60, 609–640.
- Davidson, E.A., 1991. Fluxes of nitrous oxide y nitric oxide from terrestrial ecosystems. In: Rogers, J.E., Whitman, W.B. (Eds.), *Microbial Production y Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides y Halomethans*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 219–235.
- Davidson, E.A., Verchot, L.V., 2000. Testing the hole-in-the-pipe model of nitric y nitrous oxide emissions from soils using the TRAGNET database. *Global Biogeochem. Cycles* 14, 1035–1043.
- Davidson, E.A., Ishida, F.Y., Nepstad, D.C., 2004. Effects of an experimental drought on soil emissions of carbon dioxide, methane, nitrous oxide, y nitric oxide in a moist tropical forest. *Global Change Biol.* 10, 718–730.
- Dodla, S.K., Wang, J.J., DeLaune, R.D., Cook, R.L., 2008. Denitrification potential y its relation to organic carbon quality in three coastal wetly soils. *Sci. Total Environ.* 407, 471–480.
- European Commission, 1991. Council Directive 91/676/EEC of 12 December 1991, concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. *Official J. Eur. Communities* (L 375, 31/12/1991).
- European Commission, 2002. Implementation of Council Directive 91/676/EEC concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. *Official J. Eur. Communities*, http://ec.europa.eu/environment/water/water-nitrates/pdf/91_676_eec_en.pdf (accessed 01.06.10).
- Espinar, J.L., Serrano, L., 2009. A quantitative hydrogeomorphic approach to the classification of temporary wetlys in the Doñana National Park (SW Spain). *Aquat. Ecol.* 43, 323–334.
- Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M.D., Brisson, J., Camper, A.K., Stein, O.R., 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlys: a review. *Ecol. Eng.* 35, 987–1004.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A., 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, y potential solutions. *Science* 320, 889–892.
- García, C., Hernyecz, T., Costa, F., 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 28, 123–134.
- González-Quesada, R., Cabrera, F., Diaz, E., Arambarri, P., 1987. La calidad de las aguas del río Guadiamar y de los arroyos de la Rocina y el Partido en las proximidades de Doñana, SW de España. *Limnética* 3, 97–102.
- Grimalt, J.O., Ferrer, M., MacPherson, E., 1999. The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci. Total Environ.* 242, 3–11.
- Groffman, P.M., Altabet, M.A., Böhlke, J.K., Butterbach-Bahl, K., David, M.B., Firestone, M.K., Giblin, A.E., Kana, T.M., Nielsen, L.P., Voytek, M.A., 2006. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. *Ecol. Appl.* 16, 2091–2122.
- Gutknecht, J.L.M., Goodman, R.M., Balsler, T.C., 2006. Linking soil process y microbial ecology in freshwater wetly ecosystems. *Plant Soil.* 289, 17–34.
- Hernández, M.E., Mitsch, W.J., 2007. Denitrification in created riverine wetlys: influence of hydrology y season. *Ecol. Eng.* 30, 70–88.
- Kyeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils.* 6, 68–72.
- Kempers, A.J., Zweers, A., 1986. Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 17, 715–723.
- Liu, L., Greaver, T.L., 2009. A review of nitrogen enrichment effects on three biogenic GHGs: the CO₂ sink may be largely offset by stimulated N₂O y CH₄ emission. *Ecol. Lett.* 12, 1103–1117.
- Ma, A.N., Lu, J.J., 2008. The progress of research on carbon flux in wetly ecosystems. *Wetly Sci.* 6, 116–123.
- MAPA, 1974. *Métodos Oficiales de Análisis de Suelos y Aguas*. Ministerio de Agricultura, Spain.
- Merbach, W., Augustin, J., Kalettka, T., Jacob, H.J., 1996. Nitrous oxide y methane emissions from riparian areas of ponded depressions of Northeast Germany. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 70, 134–136.

- Merbach, W., Augustin, J., Gans, W., 2001. Nitrous oxide emission from fen mires in dependence of anthropogenic activities. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 75, 118–123.
- Mitsch, W.J., Gosselink, J.G., 2007. *Wetlys*, 4th ed. John Wiley & Son, Inc.
- Mulhally, P.J., Helton, A.M., Poole, G.C., Hall Jr., R.O., Hamilton, S.K., Peterson, B.J., Tank, J.L., Ashkenas, L.R., Cooper, L.W., Dahm, C.N., Dodds, W.K., Findlay, S.E.G., Gregory, S.V., Grimm, N.B., Johnson, S.L., McDowell, W.H., Meyer, J.L., Valett, H.M., Webster, J.R., Arango, C.P., Beaulieu, J.J., Bernot, M.J., Burgin, A.J., Crenshaw, C.L., Johnson, L.T., Niederlehner, B.R., O'Brien, J.M., Potter, J.D., Sheibley, R.W., Sobota, D.J., Thomas, S.M., 2008. Stream denitrification across biomes y its response to anthropogenic nitrate loading. *Nature* 452, 202–205.
- Olías, M., Cerón, J.C., Fernández, I., Moral, F., Rodríguez-Ramírez, A., 2005. State of contamination of the waters in the Guadiamar valley five years after the Aznalcóllar spill. *Water, Air*, 166, 103–119.
- Olías, M., González, F., Cerón, J.C., Bolívar, J.P., González-Labajo, J., García-López, S., 2008. Water quality y distribution of trace elements in the Doñana aquifer (SW Spain). *Environ. Geol.* 55, 1555–1568.
- Otero, N., Vitória, L., Soler, A., Canals, A., 2005. Fertiliser characterisation: major, trace y rare earth elements. *Appl. Geochem.* 20, 1473–1488.
- Serrano, L., Reina, M., Martín, G., Reyes, I., Arechederra, A., León, D., Toja, J., 2006. The aquatic systems of Doñana (SW Spain): watersheds y frontiers. *Limnética* 25, 11–32.
- Sierra, J., Montserrat, G., Martí, E., Garau, M.A., Cruañas, R., 2003. Contamination levels remaining in Aznalcóllar spill-affected soils (Spain) following pyritic sludge removal. *Soil Sed. Cont.* 12, 523–539.
- Silva, S.R., Kendall, C., Wilkison, D.H., Ziegler, A.C., Chang, C.C.Y., Avanzino, R.J., 2000. A new method for collection of nitrate from fresh water y the analysis of nitrogen y oxygen isotope ratios. *J. Hydrol.* 228, 22–36.
- Simek, M., Elhottová, D., Klimes, F., Hopkins, D.W., 2004. Emissions of N₂O y CO₂, denitrification measurements y soil properties in red clover y ryegrass stys. *Soil Biol. Biochem.* 36, 9–21.
- Sirivedhin, T., Gray, K.A., 2006. Factors affecting denitrification rates in experimental wetlys: field y laboratory studies. *Ecol. Eng.* 26, 167–181.
- Smith, R.S., Shiel, R.S., Bardgett, R.D., Millward, D., Corkhill, P., Rolph, G., Hobbs, P.J., Peacock, S., 2003. Soil microbial community, fertility, vegetation y diversity as targets in the restoration management of a meadow grassly. *J. Appl. Ecol.* 40, 51–64.
- Sommers, S.G., Kjellerup, V., Kristjansen, O., 1992. Determination of total ammonium nitrogen in pig y cattle slurry: sample preparation y analysis. *Acta Agric. Scy. B, Soil Plant Sci.* 42, 146–151.
- Spalding, R.F., Exner, M.E., 1993. Occurrence of nitrate in groundwater—a review. *J. Environ. Qual.* 22, 392–402.
- Suso, J., Llamas, M.R., 1993. Influence of groundwater development on the Doñana National Park ecosystems (Spain). *J. Hydrol.* 141, 239–269.
- Tabatabai, M.A., 1982. Soil enzymes. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical y Microbial Properties 2*. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 903–947.
- Thornton, F.C., Valante, R.J., 1996. Soil emissions of nitric oxide y nitrous oxide from no-till corn. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 1127–1133.
- Tiedje, J.M., 1994. Denitrifiers. In: Bigham, J.M. (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological y Biochemical Properties*. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 245–267.
- Vitoria, L., Otero, N., Soler, A., Canals, A., 2004. Fertilizer characterization: isotopic data (N, S, O, C, y Sr). *Environ. Sci. Technol.* 38, 3254–3262.
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H., Tilman, D.G., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources y consequences. *Ecol. Appl.* 7, 737–750.
- Williams, C.J., Jochem, F.J., 2006. Ectoenzyme kinetics in Florida Bay: implications for bacterial carbon source y nutrient status. *Hydrobiologia* 569, 113–127.