



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA,  
GEOLOGÍA Y EDAFOLOGÍA

ESTRATEGIAS PARA LA RECUPERACIÓN DE SUELOS  
DEGRADADOS EN AMBIENTES SEMIÁRIDOS: ADICIÓN DE  
DOSIS ELEVADAS DE RESIDUOS ORGÁNICOS DE ORIGEN  
URBANO Y SU IMPLICACIÓN EN LA  
FIJACIÓN DE CARBONO

**Encarnación García Lucas**

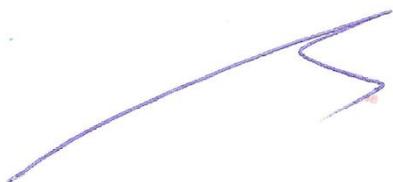
2013



D. Carlos García Izquierdo y D<sup>a</sup>. María Teresa Hernández Fernández, profesores de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estrategias para la recuperación de suelos degradados en ambientes semiáridos: adición de dosis elevadas de residuos orgánicos de origen urbano y su implicación en la fijación de carbono”, realizada por D<sup>a</sup> Encarnación García Lucas, bajo su dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 07 de Junio de 2013.



Fdo.: D. Carlos García Izquierdo



Fdo.: D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Teresa Hernández Fernández



A mis padres



"Realmente la vida es generosa con quien vive su leyenda personal"

(El Alquimista - Paulo Coelho)



## Agradecimientos

Quisiera mostrar mi agradecimiento a las siguientes personas que, por medio de su dirección, sabiduría, consejos, ayuda, compañerismo, alegría, complicidad, esperanza, decisión, esfuerzo, sentido común, sinceridad, experiencia, optimismo, comprensión y voluntad, han participado de forma activa a que el presente trabajo pudiera llevarse a cabo:

Me gustaría expresar mi agradecimiento a mis directores, Dra. M<sup>a</sup> Teresa Hernández Fernández y Dr. Carlos García Izquierdo, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis. Sin vuestra ayuda, orientación, dedicación y consejos, esta Tesis Doctoral no habría sido posible.

El mayor de mis agradecimientos va para mis padres, los cuales me han demostrado un amor incondicional entregándolo todo para que pudiera hacer y ser todo aquello que yo quisiera sin tener más límites que los míos propios. Quería aprovechar esta oportunidad para agradecer a mi madre su cariño, paciencia, enseñanzas y apoyo; todo lo que soy y espero ser te lo debo a ti.

A continuación, agradecer al resto de personas que están o han formado parte de mi grupo de "Enzimología y Biorremediación de Suelos y Residuos Orgánicos" durante estos años y que me han apoyado desde el primer día que llegué. Algunas personas entran en la vida de otras dejando una gran huella en su corazón y consiguen que nunca vuelvan a ser las mismas, esas personas habéis sido vosotras, Lola, Carmen, Sara, Irene, Eva, Marili y Annia. El agradecimiento que os debo es grande por la gran aportación que habéis hecho a mi vida. Ha sido un placer y una suerte trabajar estos años con vosotras y llevarme conmigo el mejor de los regalos, vuestra amistad.

Me gustaría también agradecer todo lo aportado por la gente que he tenido la suerte de conocer durante estos años, a Keiji, Yessica, Alberto, Cesar, Luisa, Felipe, José Luis, Miguel Ángel, Nuria, Eva, Beni, Pilar, Natali, Maca, Laura. Por supuesto, quiero extender mi gratitud a todos aquellos que habéis dedicado vuestro tiempo y paciencia a ayudarme cuando lo he necesitado como Antonio Roldán (dándome sabios consejos que tanto me han ayudado), Rubén (aportando su permanente predisposición para ayudar y aportando sus conocimientos de botánica) a Marga (estando siempre dispuesta para cualquier consulta) y a Marta (ayudándome siempre que te lo he pedido). Quería hacer extensible mi agradecimiento a todos los que han estado y están en la cuarta planta, compañeros con los que siempre he podido contar.

También quiero extender mi gratitud a las personas que me permitieron vivir dos inolvidables experiencias a nivel personal y profesional. Al grupo del "Istituto per lo Studio degli Ecosistemi" - "Consiglio Nazionale delle Ricerche" (CNR) (Pisa-Italia) especialmente a la Dra. Graziana y al Dr. Brunello por su cercanía y apoyo en todo momento que junto a Cristina, Selena y Mariarita me hicieron sentir una más y me

permitieron compartir muy buenas experiencias tanto a nivel científico como humano. Agradecer también a todos los miembros del departamento de Ecología Microbiana de la Universidad de Lund (Suecia) en especial al Dr. Erland Bääth y al Dr. Johannes Rousk, por permitirme tener una estancia agradable e instructiva.

Como dijo "el principito" *"No era más que un zorro semejante a cien mil otros. Pero yo le hice mi amigo y ahora es único en el mundo"*. Esas personas únicas para mí sois vosotros a los que yo llamo amigos, agradeceros que me hayáis permitido ser parte de vuestras vidas, dedicando especial agradecimiento a Maribel, Marcos, Carlos, Nuria y Eva por vuestro permanente interés en mi vida y en mi trabajo.

Y a vosotros, mis hermanos Toni y David, por ser mi familia y yo saber que siempre estáis y estaréis ahí, y a mis sobris, Toni, Sergio, Álvaro y Sonia, el futuro sois vosotros y a Jose y Nieves. No puedo olvidar a Noa, ese pequeño ser que entro en mi vida al comienzo de esta tarea, pasando todas las horas a mi lado, que han sido muchas, haciéndome sentir siempre acompañada.

Finalmente, gracias a las instituciones CEBAS-CSIC, Universidad de Murcia y Ministerio de Ciencia e Innovación (Research Project Ref. CTM2007-60061), que han hecho posible este trabajo. Y también, mi agradecimiento al Ministerio de Educación por la beca FPI y su soporte económico.

---

# ÍNDICE

---



# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	9
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	17
ELSUELO.....	17
CALIDAD DEL SUELO .....	17
Propiedades que inciden en la calidad de los suelos .....	19
LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO Y SU IMPORTANCIA .....	20
Origen y función .....	20
Estabilización de la materia orgánica. Fijación de carbono en el suelo.....	23
IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS Y SU ACTIVIDAD PARA LA CALIDAD DE UN SUELO .....	25
Las enzimas del suelo .....	27
Las enzimas inmovilizadas en el suelo.....	29
La biomasa microbiana del suelo y la medida de su actividad .....	30
DIVERSIDAD DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DEL SUELO .....	31
Análisis de la diversidad funcional de la comunidad microbiana (BIOLOG).....	33
Análisis de la diversidad estructural de la comunidad microbiana (PLFAs) .....	34
LA DEGRADACIÓN DEL SUELO .....	35
Concepto de degradación y desertificación.....	36
Magnitud de la problemática de la degradación del suelo.....	36
La degradación en el área mediterránea.....	37
Factores determinantes de la degradación del suelo .....	38
Procesos de degradación.....	39
NECESIDAD DE INCREMENTAR EL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA DE LOS SUELOS DEGRADADOS.....	40
RESIDUOS ORGÁNICOS.....	42
Concepto y problemática de los residuos.....	42
Los residuos orgánicos urbanos como fuente de materia orgánica .....	43
RESIDUOS ORGÁNICOS URBANOS DE ORIGEN DOMÉSTICO .....	44
Origen y tratamiento de los residuos orgánicos de origen doméstico .....	44
Destino de los residuos orgánicos de origen doméstico.....	45
Lodos DE DEPURADORA .....	46
Origen y tratamiento de los lodos de depuradora.....	46
Destino de los lodos de depuradora .....	46
reciclaje en el suelo de los residuos orgánicos urbanoS. Impacto ambiental .....	47
Saneamiento de residuos orgánicos mediante su estabilización (Compostaje).....	49
EFECTOS DE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS SOBRES SUELOS Y PLANTAS .....	50
Efecto sobre las propiedades físicas .....	51

Efecto sobre las propiedades fisico-químicas .....	52
Efecto sobre las propiedades químicas .....	52
Efectos sobre las propiedades microbiológicas y bioquímicas .....	53
Efectos de los residuos orgánicos sobre las plantas .....	53
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	57
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA .....	63
CAPÍTULO 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	97
CAPÍTULO 4.1.- ENSAYO PRELIMINAR: EFECTO DE LA ADICIÓN DE DOSIS ELEVADAS DE ENMIENDA ORGÁNICA A UN SUELO DEGRADADO (LABORATORIO)	
INTRODUCCIÓN .....	101
OBJETIVO.....	102
DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES UTILIZADOS.....	102
Suelo.....	102
Enmendantes orgánicos .....	103
DISEÑO EXPERIMENTAL .....	104
RESULTADOS .....	105
Parámetros químicos .....	105
pH y conductividad eléctrica .....	105
Carbono y sus fracciones.....	106
Contenido en carbono orgánico total (C <sub>org</sub> ).....	106
Carbono orgánico hidrosoluble .....	107
Carbohidratos y polifenoles hidrosolubles .....	107
Actividad general de las poblaciones microbianas .....	108
Respiración microbiana del suelo .....	108
Contenido de ATP .....	111
Actividades enzimáticas en los suelos .....	112
Medida de la ecotoxicidad .....	114
CAPÍTULO 4.2. ENSAYO A NIVEL DE CAMPO: INCIDENCIA DE LA APLICACIÓN DE DOSIS ELEVADAS DE C (ENMIENDA ORGÁNICA) EN LA RECUPERACIÓN DE UN SUELO DEGRADADO	
INTRODUCCIÓN .....	119
OBJETIVOS .....	119
DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	120
Área de estudio y materiales utilizados .....	120
Suelo.....	121
Enmendantes orgánicos .....	121
DISEÑO DEL EXPERIMENTO.....	122
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	123
Efecto sobre la cobertura y diversidad vegetal.....	123
Parámetros físicos.....	129
Parámetros físico-químicos.....	132

pH y conductividad eléctrica .....	132
Parámetros químicos .....	136
Estado nutricional del suelo .....	136
Nitrógeno total y sus fracciones .....	136
Fosforo total y extraíble .....	141
Potasio total y extraíble .....	144
Micronutrientes y metales pesados en los suelos .....	146
Elementos totales .....	147
Efecto sobre el contenido de carbono orgánico y las propiedades microbiológicas del suelo .....	150
Evolución del carbono orgánico y sus fracciones .....	150
Tamaño y actividad general de las poblaciones microbianas .....	155
Actividades específicas en los suelos: actividades hidrolasas .....	162
Evaluación de la recuperación de la calidad microbiológica del suelo .....	168
Íncidencia de las enmiendas en la formación y características de los ácidos húmicos del suelo .....	171
Análisis elemental de los ácidos húmicos .....	174
Caracterización estructural y química de los ácidos húmicos .....	176
Caracterización estructural (FT-IR) de los ácidos húmicos .....	177
Caracterización química (CPMAS <sup>13</sup> C-NMR) de los ácidos húmicos .....	181
Íncidencia de las enmiendas en la formación a largo plazo de complejos humus-enzima .....	188
Caracterización de los complejos humus-enzimas como indicadores de los cambios en la calidad del suelo .....	188
Íncidencia de las enmiendas en la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas del suelo .....	198
Análisis de la diversidad funcional de las comunidades microbianas del suelo mediante placas Biolog Ecoplate .....	199
Análisis de la estructura de la comunidad microbiana mediante PLFAs .....	209
Análisis de correlaciones .....	221
<b>CAPÍTULO 4.3 NUEVA PERSPECTIVA: IMPORTANCIA DE LA ENMIENDA ORGÁNICA EN EL SECUESTRO DE C. ENSAYO DE INCUBACIÓN</b>	
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>225</b>
<b>DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES UTILIZADOS .....</b>	<b>226</b>
Suelo .....	226
Enmendantes orgánicos .....	227
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>227</b>
<b>DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO PARA EL FRACCIONAMIENTO FÍSICO DEL SUELO</b>	<b>228</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>228</b>
Fijación y compartimentación del carbono y nitrógeno en el suelo y sus fracciones de diferente tamaño de partícula .....	228
Evolución del carbono y sus fracciones y del nitrógeno en el suelo completo .....	229
Fijación del carbono y el nitrógeno en las fracciones de diferente tamaño de partícula del suelo	234
Actividad microbiana en el suelo completo y en sus fracciones de diferente tamaño de partícula .....	239

Actividad de las poblaciones microbianas en el suelo completo .....	239
Carbono de la biomasa microbiana, respiración basal y actividad deshidrogenasa.....	240
Actividad metabólica específica en el suelo completo: Actividades enzimáticas.....	242
Actividad general y específica de las poblaciones microbianas en las diferentes fracciones de tamaño de partícula del suelo .....	244
Respiración basal y actividad deshidrogenasa.....	244
Actividades específicas en los suelos fraccionados: actividades enzimáticas .....	245
Incidencia de las enmiendas en la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas del suelo.....	250
Análisis de la diversidad funcional de las comunidades microbianas del suelo mediante placas Biolog Ecoplate.....	250
Análisis de la estructura de la comunidad microbiana mediante PLFAs .....	258
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....	269
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA .....	279
ANEXO .....	321

---

**RESUMEN**

**SUMMARY**

---



## RESUMEN

El incremento en la generación de residuos, especialmente de residuos orgánicos urbanos, es un problema que demanda una inmediata solución. Por otro lado, otro problema de igual importancia es el alto nivel de degradación existente en extensas áreas de España y de la zona sureste de Europa, debido principalmente a una agresiva actividad humana llevada a cabo durante años, lo cual debe ser añadido a la climatología adversa (semiárida) que padecen estas zonas.

El factor clave en la degradación es el bajo nivel de materia orgánica que presentan estos suelos. Dado que en extensas zonas de España y otros países europeos, en particular en los del sur de Europa, las fuentes tradicionales de materia orgánica (turba y el estiércol) son escasas, la pregunta, de gran interés, que surge es si ambos problemas, degradación de suelos y generación de residuos orgánicos, pueden ser tratados en conjunto. Más particularmente, la idea sería utilizar la materia orgánica contenida en los residuos orgánicos como fuente de materia orgánica del suelo, en particular aquella contenida en los residuos orgánicos urbanos (lodos de depuradora y los residuos orgánicos de origen doméstico), ya que son baratos y frecuentes en el suministro. El objetivo sería mejorar la calidad y fertilidad del suelo al tiempo que se eliminan los residuos orgánicos de una manera racional y respetuosa con el medio ambiente. Esta estrategia favorecería, al mismo tiempo, el secuestro de carbono mediante el aumento de la reserva de carbono estable en el suelo, ayudando a mitigar los efectos negativos derivados de las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera.

Por tanto, una forma de mejorar la calidad de los suelos degradados, mejorando sus propiedades tanto físicas y químicas, como microbiológicas, es agregando materia orgánica exógena. Mediante estas aportaciones se consigue proporcionar a estos suelos materia orgánica lábil en cantidad suficiente como para estimular la vida de los microorganismos que puedan existir en los mismos. Esta aceptado de forma general los beneficios que en cuanto a calidad y fertilidad aportan los residuos orgánicos al suelo, por lo que se les considera una fuente inestimable de materia orgánica para conseguir la mejora de la calidad de los suelos degradados.

La aplicación de enmiendas orgánicas mejora las propiedades físicas del suelo, aumentando la estabilidad estructural y la retención de agua, disminuyendo la densidad aparente y aumentando por tanto la porosidad. El aporte de estas enmiendas también consigue mejorar las características químicas y microbiológicas del suelo, enriqueciendo a los suelos tanto con compuestos similares a las sustancias húmicas como con macro y micronutrientes, al tiempo que estimulan el desarrollo y actividad de las poblaciones microbianas presentes en los mismos.

Los microorganismos del suelo son los responsables de importantes ciclos en el suelo debido a su papel clave en casi todas las reacciones que tienen lugar en el suelo, interviniendo tanto en los procesos de descomposición de la materia orgánica a nivel de ecosistema como en los procesos de humificación. El control de las modificaciones que experimentan estos microorganismos resulta de gran utilidad en el estudio de los cambios que experimenta el suelo tras una determinada perturbación como la adición de materiales orgánicos, presencia de un contaminante, sequía etc., ya que son los microorganismos los primeros en

responder ante cualquier cambio que se produzca en el ecosistema. Una forma eficaz de obtener información sobre cómo afecta a las poblaciones microbianas del suelo cualquier actuación que se realice sobre el mismo es a través de la estimación de la actividad enzimática ya que son las enzimas del suelo las responsables de catalizar las reacciones químicas que se producen en el mismo. La medida de las actividades enzimáticas nos ofrece información sobre la capacidad potencial del suelo para llevar a cabo reacciones específicas, las cuales son importantes en el ciclo de nutrientes. La actividad de las enzimas relacionadas con el ciclo de los elementos (carbono, nitrógeno, fósforo o azufre) son de suma importancia en la calidad del suelo. Por otra parte, indicadores del tamaño de la comunidad microbiana (carbono de la biomasa microbiana) o de su actividad metabólica global (respiración basal, el ATP y la actividad deshidrogenasa) o de su estructura (perfil de ácidos grasos de fosfolípidos, PLFAs) o de su funcionalidad (Biolog) pueden dar idea precisa del impacto de la adición de enmiendas orgánicas sobre la comunidad microbiana del suelo. También es importante el conocimiento del estado y las propiedades de la materia orgánica en los suelos semiáridos, y especialmente de la fracción de humus, la cual es de suma importancia para la evaluación de la calidad del suelo.

Uno de los efectos beneficiosos de las mencionadas sustancias húmicas aportadas al añadir enmiendas orgánicas al suelo, es que las enzimas que puedan sintetizarse pueden quedar protegidas en esos compuestos orgánicos durante largo tiempo, preservándolas así de la posible desnaturalización por proteólisis en el suelo. Estos complejos humus-enzimas se consideran de gran importancia en la fertilidad del suelo ya que representan el "punto de cruce" entre el mineral y las reacciones orgánicas en el suelo.

Estudios ya realizados indican que la adición al suelo de residuos urbanos domésticos puede ser una forma eficaz para recuperar los suelos degradados. Sin embargo, se dispone de poca información sobre si los suelos degradados de ambientes semiáridos son capaces de admitir grandes cantidades de materia orgánica, así como sobre la incidencia del grado de estabilización y dosis de aplicación de estos residuos en la recuperación del suelo y en la fijación de este carbono exógeno en el suelo.

Por esta razón, **el objetivo general** de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido estudiar la incidencia de la estabilidad de los residuos orgánicos urbanos, así como la de la adición de cantidades elevadas de tales residuos en la fijación de carbono en forma estable en suelos semiáridos, y en la recuperación de su calidad física, química y microbiológica.

Los objetivos específicos planteados han sido los siguientes:

- (i) evaluar los posibles riesgos asociados a la aplicación de dosis elevadas de estos residuos al suelo;
- (ii) evaluación al nivel de campo de la eficacia de la enmienda en incrementar la capacidad del suelo para mantener una cubierta vegetal estable, estableciendo la densidad de cobertura vegetal y la diversidad de las especies vegetales desarrolladas;
- (iii) evaluar como se ve afectada la actividad enzimática general del suelo y la asociada al coloide orgánico e inorgánico del suelo por la enmienda y dosis de aplicación;
- (iv) determinar la incidencia de la enmienda y dosis de aplicación en la diversidad funcional y estructural de las poblaciones microbianas del suelo;
- (v) determinar en qué medida la enmienda y dosis de aplicación afecta al contenido de humus de estos suelos y a sus características;

- (vi) determinar cómo influye el modo de aplicación de la enmienda (aplicación en superficie o mediante mezcla con la capa arable del suelo) en la dinámica de la materia orgánica añadida y la calidad microbiológica del suelo;
- (vii) establecer la incidencia a corto-plazo del nivel de estabilización de la materia orgánica incorporada con la enmienda y la dosis de aplicación en la mineralización de la materia orgánica añadida y su incorporación en las diferentes fracciones de tamaño de partícula del suelo.

Para tal fin se han estudiado los efectos producidos por la aplicación de la fracción orgánica de basura doméstica sin compostar y de un compost obtenido a partir de una mezcla de lodos de depuración de aguas residuales urbanas y de la fracción orgánica de la basura doméstica, tanto en un experimento de campo como en un experimento a nivel de microcosmos bajo condiciones controladas, usando en ambos casos un suelo degradado de la zona del sudeste español (Cañada Hermosa).

La presente Tesis Doctoral se compone de 3 capítulos en los que se engloban los ensayos llevados a cabo para la consecución de los objetivos propuestos:

### **Capítulo 1. Estudio a nivel de microcosmo del efecto de la aplicación de altas dosis de enmiendas orgánicas en suelos degradados**

El objetivo de este experimento era evaluar la viabilidad del empleo de dosis elevadas de enmiendas orgánicas en la recuperación de suelos degradados sin que de ello se deriven efectos negativos para el medio ambiente y el ecosistema, y en particular, para el desarrollo y actividad de los microorganismos del suelo. Para ello, un suelo degradado típico de ambientes semiáridos fue enmendado con dosis crecientes (30, 60, 90, 150, 240, 450 y 600 t ha<sup>-1</sup>) de dos materiales orgánicos de origen urbano (fracción orgánica de la basura doméstica, RF, y compost de lodo de EDAR y RF) y sometido a un periodo de incubación de dos meses durante el que se monitorizaron periódicamente, diversos parámetros físico-químicos, químicos y microbiológicos. Tras comprobar que el empleo de dosis altas de este tipo de enmiendas en los suelos no provocaba efectos ecotóxicos sino que mejoraba el contenido de carbono orgánico total y de las diferentes fracciones lábiles de carbono así como la calidad microbiológica del suelo, aumentando la cantidad y actividad, tanto global como específica, de las poblaciones microbianas del suelo sin que se observase efecto negativo sobre esta actividad microbiana por la adición de estas enmiendas a las dosis más elevadas, 450 y 600 t/ha, se optó por motivos prácticos de manejo y para evitar problemas de salinidad por la dosis de 450 t/ha (peso fresco) como dosis elevada de residuo, y la de 150 t/ha como dosis más habitual utilizada en la recuperación de suelos degradados para profundizar en el estudio del efecto que estas dosis provocan en situaciones reales de campo.

### **Capítulo 2. Ensayo a nivel de campo: incidencia de la aplicación de dosis elevadas de c (enmienda orgánica) en la recuperación de un suelo degradado**

El objetivo de este capítulo ha sido la realización de un estudio comparativo de la efectividad de la aplicación de materiales orgánicos en la recuperación de la calidad de suelos semiáridos degradados (una

única adición de enmienda orgánica a dosis normales y elevadas), en particular de la calidad microbiológica de dichos suelos, ya que es precisamente la parte microbiológica del suelo la que en mayor grado se verá negativamente afectada por la degradación que sufra ese recurso natural, dando una más pronta respuesta a dicha degradación, y todo ello con la finalidad de profundizar sobre la conveniencia de la aplicación de enmiendas orgánicas en dosis elevadas como una verdadera biotecnología apta para la recuperación de suelos degradados y la fijación de C.

El experimento se llevó a cabo en parcelas de 30 m<sup>2</sup> a las que se adicionaron con tres replicas de cada tratamiento, dos enmiendas orgánicas con diferente grado de estabilización (fracción orgánica de la basura doméstica (RF), y compost de lodo de EDAR y RF (RC)), en dosis consideradas como adecuada tras el estudio previamente realizado: una dosis que puede ser considerada como “normal-media” para recuperación de suelos (150 t/ha), equivalente a 1% de Corg, y otra dosis “alta-muy alta” (450 t/ha), equivalente a 3% de Corg. Tres parcelas sin adición de enmienda fueron utilizadas como control. Las enmiendas orgánicas se extendieron de modo adecuado sobre la superficie de la parcela incorporándolos a continuación a los 15-20 cm superficiales del suelo mediante un rotovator. Al mismo tiempo se establecieron otra serie de parcelas de igual tamaño y con los mismos tratamientos de enmienda pero con diferente manejo del suelo ya que en este caso las enmiendas no fueron incorporadas a la capa arable del suelo sino que se extendieron sobre la superficie del suelo (mulching).

Durante 60 meses se llevó a cabo un seguimiento de las parcelas, monitorizando diversos parámetros físicos, químicos, físico-químicos, microbiológicos y bioquímicos así como parámetros específicos indicadores de las comunidades microbianas del suelo, tales como los perfiles de FAME y ensayos de Biolog, tanto en los suelos enmendados como en los suelos control. También se ha profundizado en el estudio de la composición y estructura de los ácidos húmicos (AH) (las técnicas empleadas en este estudio han sido la resonancia magnético nuclear de C<sup>13</sup> (CPMAS-<sup>13</sup>C-NMR), junto con la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)), así como de las enzimas inmovilizadas en estos ácidos, presentes en los suelos semiáridos enmendados y sin enmendar a nivel de campo.

A partir de este estudio se puede concluir que la adición de enmiendas orgánicas al suelo supone una mejora en diversas propiedades del suelo, tanto en aquellas físicas (mejora de la densidad, porosidad, capacidad de retención hídrica y estabilidad de agregados) como en las microbiológicas (estimulando el desarrollo y actividad de los microorganismos de los suelos) y en las bioquímicas. Las enmiendas aportadas presentan una serie de sustratos capaces de activar diversas enzimas, cuya actividad permite poner en movimiento a elementos de interés agronómico en el suelo (carbono, nitrógeno y fósforo) imprescindibles para su funcionalidad.

Vemos así que el hecho de incorporar enmiendas orgánicas en los suelos degradados provoca un aumento en las actividades enzimáticas en los suelos demostrando fundamentalmente una mejora en el estatus biológico, microbiológico y bioquímico del suelo, y con ello mejoras en su calidad. Además, se ha puesto de manifiesto que 5 años después de la enmienda, los suelos enmendados presentaban un mayor contenido de sustancias húmicas y una mayor cantidad de enzimas inmovilizadas (protegidas) en este coloide, con lo que estos suelos incrementan su pool enzimático, pudiendo intervenir dichas enzimas en el ecosistema cuando sea necesario. Los resultados obtenidos han permitido demostrar que la aplicación de estos materiales orgánicos de origen urbano presentan más beneficios que desventajas en la recuperación de

suelos semiáridos debido al alto contenido en nutrientes y materia orgánica que aportan a unos suelos realmente pobres, promoviendo, no sólo el contenido en nutrientes, sino también la actividad de la comunidad microbiana, lo que podría relacionarse con un mejor estatus de estos suelos.

Cabe destacar que los ácidos húmicos de los suelos enmendados sufrieron modificaciones con relación a los del suelo control, mostrando un enriquecimiento en grupos alifáticos, polisacáridos y estructuras de lignina así como en grupos que aportan S y N, y una menor presencia de grupos aromático que los AH del suelo control. No obstante, tras 5 años de la incorporación de la enmienda, las diferencias no son muy marcadas lo que nos hace intuir una tendencia de estas fracciones a igualarse con las de los suelos nativos, por lo que podemos pensar que realizar la incorporación de estas enmiendas, tanto en altas como en bajas dosis en los suelos, beneficia el reciclado de estos materiales y favorece la fijación química del C en la fracción húmica de estos suelos.

Un efecto a señalar es el distinto efecto observado sobre las características del suelo en función de que el residuo orgánico se aplique fresco o compostado. Así, mientras que la adición de compost da lugar a un incremento en todos los parámetros indicadores de calidad en los suelos cuando es aplicado en dosis alta, los suelos enmendados con RF presentaron un comportamiento adecuado cuando la adición se había realizado a la dosis más baja (1%  $C_{org}$ ) pero presentaban valores inferiores cuando la aportación se había realizado a la dosis más alta. Además, la adición de compost dio lugar a un mayor incremento de sustancias húmicas con respecto a la adición de RF, hecho este de gran interés para la fijación de carbono en los suelos. Señalar que cuando la adición de la enmienda se realizó mediante mulching, las mejoras fueron reseñables para los tratamientos con compost y con RF a la dosis más baja, mientras que el suelo enmendado con RF a la dosis más elevada mostró una menor recuperación. Por todo esto vemos la conveniencia de realizar un compostaje para mejorar la calidad de la enmienda orgánica cuando la aplicación se realice en dosis altas.

De forma general, las enmiendas orgánicas estimularon la proliferación bacteriana y fúngica, observándose un aumento de cada ácido graso, indicativo de la mencionada proliferación, en los suelos enmendados con respecto al suelo control. Hay que destacar que los suelos enmendados con compost en dosis alta presentaron, de forma general, los mayores valores para los diferentes PLFAs mientras que para los suelos enmendados a la dosis más baja, las diferencias entre los dos tipos de enmiendas eran poco acusadas, no presentando para la mayoría de los PLFAs diferencias significativas. Para los suelos enmendados con la dosis más alta de RF el comportamiento fue más ambiguo, presentando un incremento en la comunidad bacteriana pero no presentando ese incremento en la comunidad fúngica, llegando a presentar para los hongos valores inferiores a los presentados por el suelo control.

En definitiva, la adición de estas enmiendas orgánicas a un suelo degradado es una estrategia válida para la recuperación del suelo y puede evitar el fenómeno de degradación y desertificación, presentándose como una alternativa viable para mitigar la degradación de suelos semiáridos.

### Capítulo 3. Nueva perspectiva: importancia de la enmienda orgánica en el secuestro de C. ensayo de incubación

Este capítulo tiene como objetivo contribuir al conocimiento de la distribución de la materia orgánica en el suelo tras la aplicación de enmiendas orgánicas de diferente grado de estabilización a un suelo semiárido degradado, estableciendo la protección y estabilización de dicha materia orgánica en las fracciones de diferente tamaño de partícula del suelo. Se evalúa, en este capítulo, la influencia de la dosis y de la estabilidad de las enmiendas orgánicas en estos procesos. También se incide en el estudio de la posible saturación en la asociación del carbono orgánico con las diferentes fracciones de tamaño de partícula en este tipo de suelos al añadir dosis elevadas de enmienda, así como en los cambios provocados por estas enmiendas en la diversidad microbiana del suelo.

Para este experimento los suelos se incubaron a temperatura ambiente durante 9 meses, manteniendo la humedad del suelo entre el 40-60 % de su capacidad de retención hídrica, empleando, al igual que en el experimento de campo, dos dosis diferentes para la aplicación de la enmienda, una dosis "normal-media" para recuperación de suelos (150 t/ha), equivalente a 1% de C<sub>org</sub>, y otra dosis "alta-muy alta" (450 t/ha), equivalente a 3% de C<sub>org</sub> con dos diferentes grados de estabilización (fracción orgánica de la basura doméstica (RF), y compost de lodo de EDAR y RF (RC)). Este ensayo nos ha permitido estudiar el grado de asociación de la materia exógena a las partículas de suelo de diferente tamaño de partícula. Además, el análisis de parámetros microbiológicos tales como la respiración de la comunidad microbiana en las diferentes fracciones de tamaño de partículas y actividades enzimáticas específicas, nos han permitido evaluar la calidad de la materia orgánica asociada con las distintas fracciones de tamaño de partícula del suelo.

Este estudio puso de manifiesto que la adición de enmiendas orgánicas incrementaba el contenido de C<sub>org</sub> de todas las fracciones de diferente tamaño de partícula del suelo, siendo este incremento superior en la fracción arcillosa y en la fracción de arena gruesa. También se puede concluir que los residuos orgánicos compostados son más adecuados para fomentar la fijación de C<sub>org</sub> en el suelo en general y para favorecer la presencia de carbono protegido en las fracciones finas del suelo, que la parte orgánica de los residuos domésticos. En cuanto a la dosis se refiere, la adición de enmiendas orgánicas en alta dosis (3% C<sub>org</sub>) produce un mayor nivel de fijación de C<sub>org</sub> en todas las fracciones de tamaño de partícula del suelo que la adición a una menor dosis (1% C<sub>org</sub>), así como un mayor incremento en el contenido del ácido húmico en el suelo. Sin embargo, la eficiencia de la fijación C<sub>org</sub> es inferior para las dosis más altas debido a que presentan una mayor pérdida de C<sub>org</sub> como consecuencia de una mineralización más intensa. Por otra parte, se ha observado que si bien se produce un importante incremento de C<sub>org</sub> en las fracciones finas del suelo, quedando así protegido este carbono frente al ataque microbiano, en las dosis elevadas de enmiendas parece existir un umbral más allá del cual la fracción de arcilla no puede fijar más C<sub>org</sub>.

Con respecto a la actividad microbiana asociada a los distintos tamaños de partícula del suelo presentaron un comportamiento relacionado con la disponibilidad de sustratos, variando en función de la enzima y de la fracción de suelo estudiada. No obstante, estas enzimas parecen encontrarse en gran medida, asociadas a la fracción arcilla del suelo. En cuanto a la diversidad funcional y estructural de los suelos enmendados también se vieron incrementadas debido probablemente al incremento en la disponibilidad de C.

En base a los resultados obtenidos del estudio sobre actividad y estructura de la comunidad microbiana, podemos señalar que la aplicación de materiales orgánicos con diferente grado de estabilización (RC y RF) a un suelo ha demostrado ser una estrategia útil para la restauración, a corto plazo, de de la vida microbiana de los suelos degradados.

Como conclusión a este trabajo de investigación se puede decir que los suelos semiáridos degradados son capaces de admitir grandes cantidades de residuos orgánicos urbanos sin riesgo para la “vida” del suelo, siempre que tales residuos urbanos orgánicos tengan suficiente calidad. Estas enmiendas pueden mejorar la calidad de los suelos suponiendo una mejora en sus condiciones físicas, químicas, microbiológicas y bioquímicas, aportando sustancias húmicas capaces de inmovilizar enzimas, colaborando en la reactivación y mejora de los procesos de la vida del suelo, y contribuyendo al incremento del pool de C estable en el suelo.



## Summary

The increase in the generation of waste, especially organic waste, is a problem that demands an immediate solution. Furthermore, the high level of degradation in large areas of Spain and southeastern Europe resulting from years of aggressive human activity and adverse weather conditions (semi-arid) is another equally significant problem.

The low level of organic matter in these soils is the key factor in their degradation. The fact that in extensive areas in Spain and in other European countries, particularly in southern Europe, the traditional sources of organic matter (peat and manure) are scarce raises an interesting question: can both problems, degradation and the generation of organic waste, be treated together? In an attempt to respond to this question, the idea in this study is to use the organic matter contained in organic waste as a source of soil organic matter, particularly the organic matter contained in municipal organic waste (sewage sludge and organic waste from households), as this is inexpensive and in ready supply. The goal is to improve the quality and fertility of the soil and simultaneously eliminate organic waste in a rational and environmentally friendly manner. At the same time, this strategy promotes carbon sequestration by increasing the stable carbon reserves in the soil, helping to mitigate the negative effects of CO<sub>2</sub> emissions in the atmosphere.

Adding exogenous organic matter is thus one way to improve the quality of degraded soils, improving not only their physical and chemical properties, but also their microbiological qualities. These additions provide such soils with enough labile organic matter to stimulate the life of microorganisms that may exist in the soil. The benefits of organic waste in terms of the quality and fertility it adds to the soil are generally accepted, and it is thus considered an invaluable source of organic matter for improving the quality of degraded soils.

Applying organic amendments improves the physical properties of soil, increasing structural stability and water retention and reducing apparent density, thereby increasing porosity. Adding these amendments also improves the chemical and microbiological characteristics of the soil, enriching soils with compounds similar to humic substances and with macro and micronutrients. At the same time, the amendments stimulate the development and activity of soil microbial populations.

Soil microorganisms are responsible for important cycles in the soil due to their key role in almost all reactions taking place in the soil. They intervene as much in the decomposition of organic matter at the ecosystem level as they do in processes like humification. Monitoring the modifications that these microorganisms undergo is extremely useful in studying changes in the soil after a given disturbance, such as the addition of organic materials, the presence of a contaminant, drought, etc., since microorganisms are the first to respond to any changes occurring in the ecosystem. An effective way to find out how any action performed on the soil affects soil microbial populations is to estimate the enzyme activity, since soil enzymes are responsible for catalysing the chemical reactions that occur in the soil. Measuring enzyme activity gives us information about the potential of the soil to perform specific reactions that are important in nutrient cycling. The activity of enzymes involved in element cycling (carbon, nitrogen, phosphorus or sulfur) is extremely important in terms of soil quality. Moreover, the following indicators can give us an accurate idea of the impact of the addition of organic amendments on the soil microbial community: indicators of microbial

community size (microbial biomass carbon); of its overall metabolic activity (baseline respiration, ATP and dehydrogenase activity); of its structure (fatty acid profile of phospholipids, PLFAs); or of its functionality (Biolog). It is also important to understand the state and properties of the organic matter in semi-arid soils, especially the humus fraction, which is critical for assessing soil quality.

One of the beneficial effects of the aforementioned humic substances provided by adding organic amendments to the soil is that enzymes that can be synthesized can be protected in these organic compounds for long periods of time, thus protecting the enzymes from possible denaturation due to proteolysis in the soil. These humus-enzyme complexes are considered to be very important in soil fertility since they represent the "crossing point" between the mineral content and the organic reactions in the soil.

Existing studies indicate that adding household waste to degraded soils can be an effective way to restore them. However, there is little information regarding whether degraded soils in semi-arid environments are capable of supporting large quantities of organic matter. Information is also scarce concerning the impact of the degree of stabilisation and rate of application of these residues on soil recovery and on the extent to which this exogenous carbon is fixed in the soil.

For this reason, **the overall objective** of this Doctoral Thesis was to study the impact of the stability of municipal organic waste and of the addition of substantial quantities of such waste on stable carbon fixation in semi-arid soils and on the recovery of the physical, chemical and microbiological qualities of these soils.

The specific objectives were as follows:

- (i) to assess the potential risks associated with applying high doses of these residues to the soil;
- (ii) to assess, at the field level, the effectiveness of the amendment in increasing the ability of the soil to maintain a stable vegetation cover, thus establishing vegetation cover density and the diversity of the plant species developed;
- (iii) to assess how the overall enzyme activity of the soil and that associated with the organic and inorganic colloids in the soil is affected by the amendment and rate of application;
- (iv) to determine the impact of the amendment and rate of application on the structural and functional diversity of soil microbial populations;
- (v) to determine to what extent the amendment and rate of application affects the humus content of these soils and their characteristics;
- (vi) to determine how the mode of application of the amendment (surface application or application through mixing with the top soil) influences the dynamics of the added organic matter and soil microbial quality;
- (vii) to establish the short-term effect of the level of stabilisation of the organic matter incorporated into the amendment and the rate of application on the mineralisation of the added organic matter and its incorporation into different particle-size fractions of soil.

To reach these objectives, we studied the effects of applying both the organic fraction of household waste without composting and compost obtained from a mixture of sewage sludge from municipal wastewater and the organic fraction of household waste, both in the field experiment and at the microcosm level under controlled conditions. In both cases, degraded soil from southeastern Spain (Cañada Hermosa) was used.

This Doctoral Thesis consists of the following three chapters describing the assays performed in order to achieve the set objectives:

### **Chapter 1. Preliminary assay: the effect of adding high doses of organic amendments to a degraded soil.**

The goal of this experiment was to evaluate the possibility of incorporating high doses of organic amendments into degraded soil as a strategy for recovery of the soil and for fixing C in it, without resulting in negative effects on the environment and the ecosystem, and in particular, on the growth and activity of soil microorganisms. To reach this goal, a degraded soil typical of semi-arid environments was amended with increasing doses (30, 60, 90, 150, 240, 450 and 600 t ha<sup>-1</sup>) of two organic materials of municipal origin (organic fraction of household waste (RF), and WWTP and RF sludge compost) and subjected to an incubation period of two months, throughout which various physico-chemical, chemical and microbiological parameters were periodically monitored. The use of high doses of such soil amendments were not found to cause ecotoxic effects. Instead, they enhanced the total organic carbon content and the different labile carbon fractions and soil microbial quality, increasing the amount and activity, both global and specific, of soil microbial populations. No negative effect on microbial activity was observed resulting from the addition of these amendments in the highest doses, 450 and 600 t/ha. Based on these results, the dose of 450 t/ha (fresh weight) was chosen as the high residue dose for practical handling reasons and to prevent salinity problems. The dose of 150 t/ha was chosen as the most typical dose used in the recovery of degraded soils. Both doses were selected in order to further study their effect in actual field situations.

### **Chapter 2. Field level assay: the effect of adding high doses of C (organic amendment) on recovering degraded soils and on the chemical fixation of C.**

The goal of this chapter was to conduct a comparative study of the effectiveness of applying organic materials (a single addition of organic amendments at both normal and elevated doses) in recovering the quality of degraded semi-arid soils, particularly their microbiological quality (since it is precisely the microbiological part of the soil that suffers the most adverse affects in soil degradation), thus improving the ability of the soil to respond to degradation. The aim of this study was to more deeply understand the suitability of applying organic amendments in high doses as a true biotechnological tool for the recovery of degraded soils and the fixation of C.

The experiment was conducted on 30 m<sup>2</sup> plots to which we added three replicates of each treatment – two organic amendments with different degrees of stabilisation (organic fraction of household waste (RF) and WWTP sludge compost and RF (RC)) in doses considered appropriate after the previously conducted study: one dose that can be considered "normal-average" for soil recovery (150 t/ha), equivalent to 1% of C<sub>org</sub>, and another dose that can be considered "high-very high" (450 t/ha), equivalent to 3% of C<sub>org</sub>. Three plots without added amendments were used as control. The organic amendments were spread over the surface of the plots using suitable methods and were then incorporated into the top 15-20 cm of the soil using a rotovator. At the same, a number of other plots of equal size were established with the same amendment

treatments but with different soil management techniques. In this case, the amendments were not incorporated into the top soil but spread over the soil surface (mulching).

The plots were monitored over a period of 60 months. During this time, various physical, chemical, physico-chemical, microbiological and biochemical parameters were tracked both in amended and control soils, in addition to specific parameters which are indicators of soil microbial communities. FAME profiles and Biolog analyses were tracked as well. The composition and structure of humic acids (HA) were also studied in-depth (using  $C^{13}$  nuclear magnetic resonance (CPMAS- $^{13}C$ -NMR) together with Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy), as were the composition and structure of immobilized enzymes in these acids found in amended and unamended semi-arid soils at the field level.

Based on this study, it can be concluded that adding organic amendments to the soil improves various soil properties, including physical properties (improvement of density, porosity, water retention and stability of aggregates); microbiological properties (stimulating the development and activity of the microorganisms of the soil); and biochemical properties. The added amendments have a series of substrates that are able to activate various enzymes, whose activity makes it possible to set in motion various elements of agronomic interest in the soil that are essential for soil functionality (carbon, nitrogen and phosphorus).

We thus see that the act of incorporating organic amendments into degraded soils causes an increase in their enzyme activity, mainly resulting in an improvement in the biological, microbiological and biochemical status of the soils, thereby improving overall soil quality. Furthermore, it has been shown that 5 years after the amendment, amended soils have a higher humic substance content and a greater quantity of immobilized enzymes (protected) in the colloid. As a result, the enzyme pool of these soils is larger, and these enzymes are able to intervene in the ecosystem when necessary. The results show that the application of organic materials of municipal origin has more benefits than disadvantages in semi-arid soil recovery due to the high nutrient content and amount of organic matter that they contribute to truly poor soils. These organic materials not only promote nutrient content, but also microbial community activity, which could be related to improved soil status.

It is worth noting that the humic acids in the amended soils underwent changes that the control soil did not, showing enrichment in aliphatic groups, polysaccharides and lignin structures as well as in groups providing S and N. Furthermore, the presence of aromatic groups was lower in the HA in amended soils than in the HA of the control soil. However, after 5 years of incorporating the amendment, the differences are not very marked, which suggests that these fractions tend to level out with those of native soil. This leads us to believe that incorporating these amendments into the soil, both in high and low doses, contributes to the recycling of these materials and promotes the chemical fixation of C in the humic fraction of these soils.

It is also important to note the different effects observed on soil characteristics depending on whether the organic waste applied was fresh or composted. While adding compost gives rise to an increase in all quality indicator parameters in the soil when applied in high doses, RF amended soils showed adequate performance when the lowest dose was added (1%  $C_{org}$ ), but had lower scores when the highest dose was added. Furthermore, with respect to the addition of RF, the addition of compost resulted in a greater increase in humic substances, which is of great interest in terms of carbon fixation in soil. When the amendments were added through mulching, improvements were notable following the treatments with

compost and with RF in the lowest dose, while the soil amended with the highest dose of RF showed less recovery. These results indicate that composting is advisable for improving the quality of the organic amendment when it is applied in high doses.

In general, the organic amendments stimulated bacterial and fungal growth. An increase in each fatty acid, indicative of such growth, was observed in amended soils compared to control soil. It should be noted that soils amended with high doses of compost showed the highest values for the different PLFAs in general, while the differences between the two types of amendments were not very pronounced in soils amended with the lower dose, which did not show significant differences for most PLFAs. For soils amended with the highest dose of RF, behaviour was more ambiguous. These soils showed an increase in the bacterial community but not in the fungal community, and even showed lower values for fungi than the control soil.

In short, the addition of these organic amendments to a degraded soil is a valid strategy for soil recovery and can prevent the phenomenon of degradation and desertification. This addition is a viable alternative for mitigating the degradation of semi-arid soils.

### **Chapter 3. A new perspective: The importance of the organic amendment in C sequestration. Incubation assay**

The goal of this chapter is to contribute to knowledge concerning the distribution of organic matter in the soil after organic amendments of different degrees of stabilisation have been applied to a degraded semi-arid soil, thus establishing the protection and stabilisation of this organic matter in the different particle-size fractions of the soil. In this chapter, the influence of the dose and stability of organic amendments on these processes is evaluated. This study also focuses on the saturation potential in the association of organic carbon with the different particle-size fractions in this type of soil when adding high doses of amendment, as well as on the changes in soil microbial diversity these amendments cause.

For this experiment, soils were incubated at room temperature for 9 months. Soil moisture was maintained at 40-60% of water retention capacity. As in the field experiment, two different doses of amendment were applied, a "normal-average" dose for soil recovery (150 t/ha), equivalent to 1% of  $C_{org}$ , and another "high-very high" dose (450 t/ha), equivalent to 3% of  $C_{org}$ , with two different degrees of stabilisation (organic fraction of household waste (RF) and WWTP sludge compost and RF (RC)). This assay allowed us to study the degree of association between exogenous matter and soil particles of varying particle size. Furthermore, the analysis of microbiological parameters, such as microbial community respiration in the different particle-size fractions and specific enzyme activities, enabled us to evaluate the quality of the organic matter associated with the different particle-size fractions of soil.

This study showed that the addition of organic amendments increased the  $C_{org}$  content of all of the different particle-size fractions of soil, and that the increase was higher in the clay fraction and in the coarse sand fraction. It can also be concluded that composted organic waste is more suitable than the organic fraction of household waste for promoting  $C_{org}$  fixation in soil in general and for encouraging the presence of protected carbon in fine soil fractions. As far as the dose is concerned, adding a high dose of organic amendments (3%  $C_{org}$ ) produces a higher level of  $C_{org}$  fixation in all particle-size fractions in the soil than does adding a lower dose (1%  $C_{org}$ ). The higher dose also produces a greater increase in the humic acid content in the soil.

However, the efficiency of  $C_{org}$  fixation is lower for the highest doses, because such doses show greater loss of  $C_{org}$  resulting from more intense mineralisation. On the other hand, while a significant increase in  $C_{org}$  in fine soil fractions was observed, thus safeguarding this carbon against microbial attack, in the highest amendment doses, there appears to be a threshold beyond which the clay fraction cannot fix any more  $C_{org}$ .

In terms of microbial activity associated with the different soil particle sizes, behaviour was related to the availability of substrates and varied depending on the enzyme and the soil fraction studied. However, these enzymes seemed to be largely associated with the clay fraction of the soil. The functional and structural diversity of amended soils also increased, probably due to the increased availability of C.

Based on the results of the study concerning microbial community activity and structure, we can state that applying organic materials with different degrees of stabilisation (RC and RF) to soil has proven to be a useful strategy for restoring microbial life in the short term in degraded soils.

In conclusion to this study, it can be said that degraded semi-arid soils are capable of supporting large quantities of municipal organic waste without causing harm to soil microbial growth and activity, provided that the municipal organic waste is of sufficient quality. These amendments can improve soil quality, resulting in improvements in the physical, chemical, microbiological and biochemical conditions of the soil, providing humic substances capable of immobilizing enzymes, contributing to the revival and improvement of the processes of soil life and contributing to an increase in the stable C pool in the soil.

---

# INTRODUCCIÓN

---



## EL SUELO

El suelo es un ente natural complejo polifásico y polidinámico. En consecuencia, puede ser conceptualizado desde múltiples perspectivas. No existe ninguna definición inequívoca de suelo, como tampoco la atesoramos de la vida. Conforme vamos descubriendo nuevas perspectivas, va expandiéndose nuestra consciencia de la riqueza inherente al mundo de los suelos, de tal modo que se antoja irreducible a ser descrito mediante unas pocas líneas.

Pese a todo ello, una posible definición sería “El suelo es un sistema natural, organizado e independiente, cuya formación se debe a la acción conjunta del clima, los organismos, la vegetación, el relieve y el tiempo sobre la roca madre, constituye una matriz de componentes orgánicos y minerales que engloba una red porosa por donde circulan líquidos y gases, albergando numerosas poblaciones de organismos vivos en una situación de equilibrio dinámico” (Agencia Europea de Medio Ambiente, 2004).

Las funciones del suelo son muy diversas y pueden referirse a aspectos ecológicos, técnicos, industriales, socioeconómicos y culturales. Entre las principales destacan las siguientes (Seybold et al., 1998; Porta, 2005):

- *Función productiva*: ser suministro de nutrientes, aire y agua a las plantas y sostener la actividad, diversidad y productividad biológica de los ecosistemas.
- *Función Hidrológica*: regular la infiltración, almacenamiento y flujo de agua superficial y subsuperficial, junto a su calidad.
- *Función Medioambiental*: filtrar, amortiguar, degradar, inmovilizar y reducir la toxicidad de compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo subproductos urbanos e industriales y deposiciones atmosféricas.
- *Función Biológica*: hábitat de diferentes organismos, conservación de biodiversidad y reserva de genes.
- *Función Biogeoquímica*: almacenar y posibilitar el ciclo biogeoquímico de nutrientes y otros elementos con efectos sobre el equilibrio energético global.
- *Función Socioeconómica*: servir de base espacial para las actividades agrícolas, asentamientos humanos e infraestructuras así como ser fuente de materias primas.

El suelo no sólo es la base para la agricultura y para los diferentes ecosistemas, sino que además, de él depende toda la vida del planeta. Las prácticas de manejo convencionales como el arado, los patrones de cultivo y el uso de plaguicidas y fertilizantes, han tenido influencia sobre la calidad del agua y de la atmósfera, ya que han generado cambios en la capacidad del suelo para producir y consumir gases como CO<sub>2</sub>, óxido nitroso y metano (Wienhold et al., 2004, Bastida, 2008).

## CALIDAD DEL SUELO

El suelo es un recurso natural no renovable, al menos en una escala de tiempo humano. Tenemos por tanto la obligación de mantenerlo y conservarlo para presentes y futuras generaciones. Esto implica la necesidad

de adaptarlo a diversos usos (agricultura, bosque, suelo urbano, industria, etc.), pero siempre tendiendo hacia un manejo sostenible de dicho recurso natural, de manera ordenada y controlada, manteniendo su calidad.

Es importante destacar la relevancia de los microorganismos y de su actividad en la calidad de un suelo, y por tanto, en su conservación y mantenimiento, así como en su recuperación cuando se encuentre sometido a procesos degradativos (Powelson et al., 1987; Ros et al., 2000). Los microorganismos ejercen una gran influencia en numerosas reacciones de oxidación, hidrólisis y degradación de la materia orgánica, que a su vez tienen un claro reflejo en los ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y otros elementos (Schloter et al., 2003), estableciendo con ello las condiciones idóneas para el desarrollo de una cubierta vegetal estable, imprescindible para que un suelo posea una calidad adecuada y por supuesto, para que mantenga una fertilidad natural conveniente. Indiscutiblemente, la acción que ejercen los microorganismos se va a ver influenciada por las propiedades físicas existentes (un buen microhábitat conlleva un óptimo desarrollo microbiano), o las químicas, pero eso resalta aún más la importancia del estudio y conocimiento de la actividad metabólica, dentro del contexto de la calidad, conservación, o recuperación de suelos, es decir, de su "Sostenibilidad".

Las definiciones más recientes de calidad del suelo se basan en la multifuncionalidad del suelo y no sólo en un uso específico, pero este concepto continúa evolucionando (Singer & Ewing, 2000). Estas definiciones fueron sintetizadas por el Comité para la Salud del Suelo de la Soil Science Society of America (Karlen et al., 1997) como la capacidad del suelo para funcionar dentro de los límites de un ecosistema natural o manejado, sostener la productividad de plantas y animales, mantener o mejorar la calidad del aire y del agua, y sostener la salud humana y el hábitat.

La preocupación por la calidad del suelo no es nueva (Lowdermilk, 1953; Doran et al., 1996; Karlen et al., 1997; Singer & Ewing, 2000). Tradicionalmente, la calidad del suelo ha sido evaluada por su capacidad para generar productos agrícolas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el suelo juega un papel crítico en el mantenimiento local y global de la calidad medioambiental y por último, en la salud humana y ambiental. Todo ello hace que los estudios de suelos tengan una gran dificultad, debido a que estamos hablando de una matriz sumamente compleja formada por una parte viva en constante movimiento, y otra parte mineral que tiene una dinámica mucho más lenta; pero ambas partes tienen su función de manera inequívoca (Bastida, 2008). En consecuencia, es muy difícil que pueda existir una sola medida ya sea biológica, física o química que sea útil para determinar el estatus de un suelo, pudiendo a partir de dicha medida decidir cuál sería su salud y calidad (Nannipieri et al., 1990; Ceccanti & García, 1994; Puglisi et al., 2006).

De todos los parámetros que pueden contribuir a aportar información sobre aspectos de la calidad de los suelos, aquellos relativos a su actividad metabólica son los que tienen una mayor sensibilidad frente a procesos no deseables tales como contaminación, degradación diversa, e incluso desertificación (Dick & Tabatabai, 1993; Trasar-Cepeda et al., 1998; García et al., 2000). La componente física y química del suelo puede considerarse muy estable en lo que a su medida se refiere, haciendo falta tiempo para que cambien de forma apreciable. Por ello, pensamos que la flexibilidad del ecosistema suelo puede ser detectada en primer lugar por la componente microbiológica existente en dicho suelo, ya que dicha componente microbiológica es sin duda altamente sensible a degradaciones incipientes. Debido a ello, un cambio en la

fracción microbiológica del suelo puede ser considerado como una “alerta” ante un posible colapso ambiental, permitiéndonos entonces reaccionar a tiempo antes de que pueda ocurrir un daño irreversible en el suelo. Sin embargo, hay que señalar que medidas como las propuestas no resultan sencillas debido a lo complicado que es el estudio de los microorganismos y de sus reacciones a nivel del microhabitat, y que la medida de un solo parámetro es difícil que pueda resultar útil y satisfactoria como reflejo de la calidad microbiológica del suelo (Nannipieri et al., 1990; Gil-Sotres et al., 1992).

### **Propiedades que inciden en la calidad de los suelos**

Todo tipo de vida depende de la calidad del suelo para su supervivencia. Por ende, la protección de este recurso natural debe ser una política nacional e internacional. Para lograr lo anterior y, al mismo tiempo, un manejo adecuado del suelo, es necesario contar con indicadores que permitan evaluar su calidad.

Ya que el suelo está formado por material inorgánico (arena, limo y partículas arcillosas), materia orgánica, agua, gases y organismos vivos (lombrices, insectos, algas, bacterias, hongos, etc.), entre los que se produce un intercambio continuo de moléculas mediante procesos físicos, químicos y biológicos, es lógico pensar que para poder establecer su calidad es imprescindible el estudio de todo tipo de propiedades (físicas, químicas, biológicas y microbiológicas). Por tanto, dada la multiplicidad de factores químicos, físicos, biológicos y microbiológicos que controlan los procesos biogeoquímicos y su variación en intensidad con respecto al tiempo y espacio, la identificación de unos adecuados indicadores de calidad del suelo es compleja (Doran *et al.*, 1996).

Ya en 1994 Doran y Parkin señalaron que para que determinadas propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo puedan ser consideradas buenos indicadores de la calidad del mismo debían cubrir las siguientes condiciones:

- a) describir los procesos del ecosistema;
- b) integrar propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo;
- c) reflejar los atributos de sostenibilidad que se quieren medir;
- d) ser sensibles a variaciones de clima y manejo;
- e) ser accesibles a muchos usuarios y aplicables a condiciones de campo;
- f) ser reproducibles;
- g) ser fáciles de entender;
- h) ser sensibles a los cambios que ocurren en el suelo como resultado de la degradación antropogénica;
- i) y, cuando sea posible, ser componentes de una base de datos del suelo ya existente.

Para poder cuantificar en lo posible la calidad de un suelo, es necesario disponer de una serie de parámetros (Índices de Calidad de Suelo) que puedan reflejar problemas de producción en las diferentes áreas existentes, además de ser capaces de monitorizar cambios en la calidad sostenible y ambiental relacionados con el manejo del suelo. Todo ello contribuirá a marcar directrices de políticas adecuadas en

torno a la productividad y la agricultura sostenible del suelo, y en definitiva, para un uso del mismo lo más racional posible (Granatstein & Bezdicek, 1992, Ros, 2000).

Es por tanto de gran utilidad llegar a conocer aquellas propiedades que identifican la calidad de un suelo, capaces de determinar si dicha calidad es o no aceptable para que el suelo tenga una funcionalidad aceptable. Existe por ello una necesidad palpable de investigar los diversos criterios a tener en cuenta para valorar la calidad del suelo.

Las características o parámetros que, según nuestro criterio, podrían servir de “mínimo” con objeto de calibrar la calidad de un suelo, serían:

#### Propiedades físicas

Las características físicas del suelo son una parte necesaria en la evaluación de la calidad de este recurso porque no se pueden mejorar fácilmente (Singer & Ewing, 2000). Las propiedades físicas que pueden ser utilizadas como indicadores de la calidad del suelo son aquellas que reflejan la manera en que este recurso acepta, retiene y transmite agua a las plantas, así como las limitaciones que se pueden encontrar en el crecimiento de las raíces, la emergencia de las plántulas, la infiltración o el movimiento del agua dentro del perfil y que además, estén relacionadas con la distribución de las partículas y los poros. La estabilidad estructural, porosidad, capacidad de retención hídrica, textura, densidad y estabilidad de agregados son las características físicas del suelo que se han propuesto como indicadores de su calidad.

#### Propiedades químicas y fisico-químicas

Los parámetros químicos propuestos se refieren a condiciones que afectan las relaciones suelo-planta, la calidad del agua, la capacidad amortiguadora del suelo, y la disponibilidad de agua y nutrientes para las plantas y microorganismos.

Algunos de estos parámetros son pH, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico, “materia orgánica”, nitrógeno mineralizado y estado redox.

#### Propiedades biológicas y microbiológicas

Los parámetros microbiológicos propuestos integran gran cantidad de factores que afectan a la calidad microbiológica del suelo como son el C y N de la biomasa microbiana, la respiración, actividades enzimáticas, organismos vivos indicadores y biodiversidad funcional y estructural.

## **LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO Y SU IMPORTANCIA**

### **Origen y función**

Se puede definir la materia orgánica del suelo como un complejo sistema de sustancias en un estado dinámico permanente, producido por la incorporación al mismo de residuos orgánicos, principalmente de origen vegetal, y en menor cuantía animal, en diferentes estados de descomposición y evolución (Moreno, 1997). La materia orgánica que se aporte al suelo es de donde todos los microorganismos del mismo obtendrán sus fuentes energéticas, y a partir de ella dichos microorganismos organizarán toda la vida del suelo.

La materia orgánica del suelo tiene su origen en el carbono atmosférico fijado a través de las reacciones de fotosíntesis y que es incorporado fundamentalmente con los restos vegetales y los exudados radiculares; otras fuentes, aunque de menor importancia cuantitativa, son de origen animal y microbiano. La composición de la materia orgánica es por tanto muy variada: almidón, celulosa, hemicelulosa, lignina, quitina, pectina, exopolisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, etc. Los procesos de mineralización devuelven el carbono a la atmósfera como dióxido de carbono principalmente, mientras que una fracción del mismo es asimilada en tejidos microbianos (biomasa del suelo) y parte se transforma a través de los procesos de humificación en formas estables (sustancias húmicas), que se pueden también mineralizar aunque de manera más lenta.

Según Mustin (1987), la materia orgánica representa del 95 al 99% del total del peso seco de los seres vivos, pero su presencia en los suelos suele ser escasa y son contadas las excepciones en las que supera el 2% (Navarro et al., 1995). Para Gros & Domínguez (1992), el nivel deseable de materia orgánica en los suelos arcillosos medios es del 2%, pudiendo descender a 1,65% en suelos pesados y llegar a un 2,5% en los arenosos.

La materia orgánica de un ecosistema maduro presenta un estado en evolución permanente, que tiende a alcanzar un equilibrio dinámico cuando las entradas de carbono al suelo por los aportes de los residuos vegetales y animales son iguales a las salidas debidas a los procesos de mineralización y lixiviación de sus fracciones solubles (Schulze & Freibauer, 2005). En un ecosistema en equilibrio dinámico, el contenido de materia orgánica del suelo se mantiene en un nivel más o menos constante mientras este ciclo se mantiene activo. Un cambio inadecuado en el manejo o en el uso del suelo puede provocar un desajuste de este estado de equilibrio y provocar grandes pérdidas de materia orgánica.

Para poder comprender las consecuencias derivadas de una pérdida de materia orgánica en los suelos, basta con mencionar algunas de las funciones que desempeña en relación a su potencial productivo y su fertilidad. Entre sus propiedades más destacadas está la de aumentar la capacidad calorífica y la retención hídrica del suelo debido a su naturaleza coloidal, a la vez que mejora la permeabilidad del mismo a gases y agua por la disminución de la densidad aparente; incrementa la capacidad de intercambio catiónico, la estabilidad de los agregados y el poder tampón del suelo. La materia orgánica del suelo es vital en la formación de agregados estables y de un sistema poroso secundario que permite que el agua se filtre en el perfil del suelo, para una mejor aireación y retención de humedad (Ellies, 2004; Annabi et al., 2007). El aporte de materia orgánica y el aumento de la estabilidad de agregados pueden reducir la tendencia del suelo a la compactación y aumentar la resistencia del suelo a la deformación, debido a que la degradación es controlada, en gran parte, por la presencia y abundancia de macroagregados estables al agua (Bayhan et al., 2005).

Desde un punto de vista biológico, favorece la actividad microbiana y los procesos bioquímicos implicados en el cierre de los ciclos de nutrientes, activando la fauna edáfica que, a su vez, incrementa la porosidad del suelo (Costa et al., 1991; Labrador, 1996). Como consecuencia de estos efectos, se favorece un desarrollo mayor de la cubierta vegetal y radicular, lo cual contribuye a disminuir la erosividad del suelo. Por consiguiente, la evolución de la materia orgánica en el suelo se puede considerar como indicador del grado de estabilidad alcanzado entre los distintos balances de materia y energía en un ecosistema, dada la enorme diversidad funcional que desempeña en los mismos.

La materia orgánica del suelo se puede clasificar en grupos diferentes, dependiendo de su facilidad para ser degradada por los microorganismos (Smith et al, 1997):

- I) los compuestos fácilmente degradables, que se consideran la parte más activa de la materia orgánica y son los hidratos de carbono, aminoácidos y las pectinas,
- II) la reserva intermedia de la materia orgánica, que corresponde a los compuestos orgánicos con degradación lenta (celulosa, hemicelulosa, quitina, etc) y
- III) la reserva pasiva de la materia orgánica, constituida por los compuestos orgánicos más resistentes a la degradación, tales como anillos aromáticos (lignina) y cadenas alifáticas (lípidos).

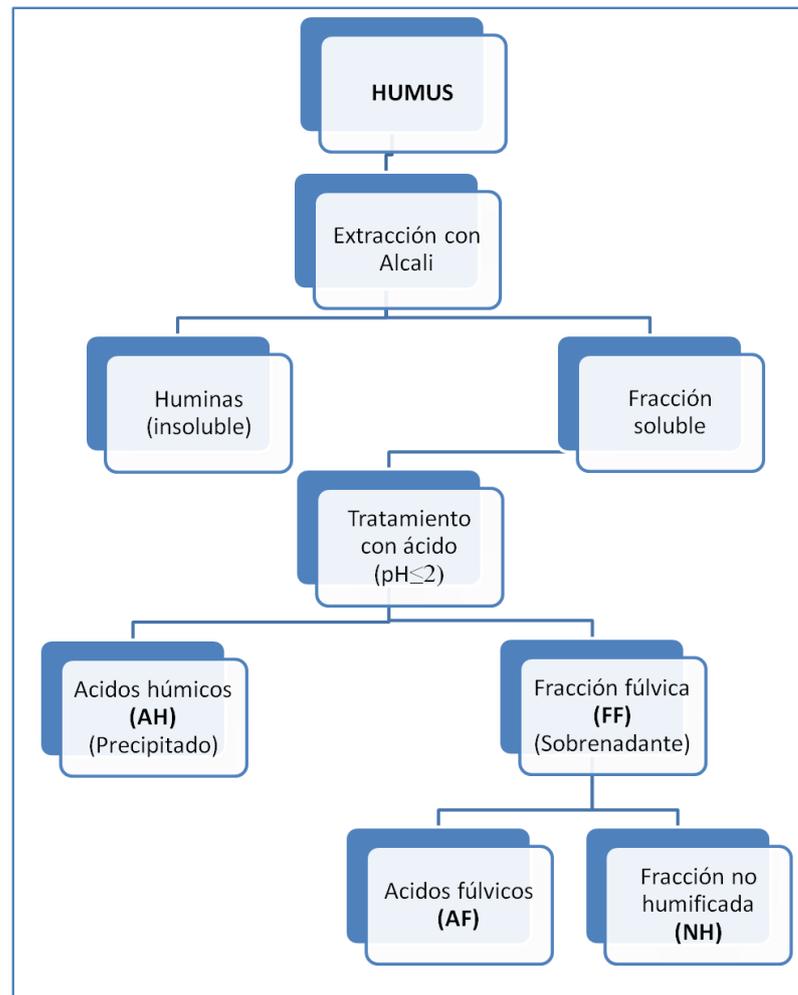
El humus constituye la fracción más estable de la materia orgánica del suelo, pudiendo persistir en el mismo durante décadas, cientos o incluso miles de años. Las sustancias húmicas generalmente representan desde 1/3 a 3/4 partes del total de la materia orgánica del suelo, y pueden definirse como una mezcla de polímeros orgánicos biogénicos de hidrocarburos alifáticos mixtos y de naturaleza aromática, ricos en grupos funcionales carboxílicos y fenólicos, formados por reacciones secundarias de síntesis (el proceso de humificación) de biomoléculas procedentes del proceso de desintegración, las transformaciones de organismos muertos, y la actividad microbiana (Senesi & Loffredo, 1999; Bertoncini et al, 2005). Son de naturaleza lignoproteica y tienen capacidad para formar coloides con grandes áreas superficiales externa e interna con una gran capacidad reactiva.

Para el estudio de las propiedades químicas y coloidales de la materia orgánica en el suelo y más concretamente las sustancias húmicas o humus, es necesario su aislamiento de la matriz inorgánica con la que está asociada, mediante la extracción química con extractantes adecuados. En base a su solubilidad, las sustancias húmicas pueden clasificarse en tres grupos universalmente reconocidos (Figura 1.1):

*Ácidos húmicos (AH):* Extraíbles en medio alcalino y que precipitan al acidificar. La base de su estructura está formada por un gran grupo de estructuras aromáticas y cadenas alifáticas. Poseen diversos grupos funcionales tales como hidroxilos, carboxilos, metoxilos, fenólicos, etc. Son de color pardo oscuro y peso molecular muy alto.

*Ácidos fúlvicos (AF):* Extraíbles en medio alcalino y cuyos componentes permanecen en disolución después de acidificar el extracto. Poseen una estructura relativamente similar a la de los AH pero con un menor peso molecular. También están menos polimerizados y contienen una mayor proporción de cadenas alifáticas, a la vez que son más ricos en grupos fenólicos, hidroxílicos, carboxílicos y cetónicos.

*Huminas:* No son extraíbles con disoluciones alcalinas. Debido tanto a su insolubilidad como a su naturaleza macromolecular, la humina ha sido la fracción húmica menos estudiada de todas. Gracias a técnicas como la resonancia magnética nuclear ( $^{13}\text{C}$ -RMN) en estado sólido, se ha podido dilucidar en parte, su composición y estructura. Dependiendo de la naturaleza del material húmico, se considera, en general, que las huminas poseen una estructura muy similar a la de los AH, tanto por su composición elemental como por su contenido en grupos funcionales, diferenciándose de éstos por una menor aromaticidad, debida al mayor contenido de polisacáridos alifáticos (Hatcher et al., 1985)



**Figura 1.1. Fraccionamiento del humus.**

Dada la estrecha relación existente entre el contenido de materia orgánica de un suelo y su fertilidad, es fundamental el mantener un nivel adecuado de materia orgánica en los suelos. Para ello, es indispensable la búsqueda de nuevas fuentes de materia orgánica que permitan reponer las pérdidas derivadas de un manejo inadecuado en estos suelos, constituyendo esto, una prioridad a nivel mundial para recuperar la calidad de los suelos y preservar este recurso natural.

### **Estabilización de la materia orgánica. Fijación de carbono en el suelo**

Las existencias de carbono orgánico presente en los suelos naturales representan un balance dinámico entre la absorción de material vegetal muerto y la pérdida por descomposición (mineralización). En condiciones aeróbicas del suelo, gran parte del carbono que ingresa al mismo es lábil y sólo una pequeña fracción (1%) del que ingresa se acumula en la fracción húmica estable.

En los últimos años la preocupación por el incremento de las emisiones a la atmósfera de CO<sub>2</sub> y metano ha incrementado el interés sobre el potencial papel de los suelos como sumideros de carbono y el estudio de la

dinámica de la materia orgánica en relación a la fijación del carbono en el mismo. Incrementar la capacidad del suelo para secuestrar carbono constituye un medio de contrarrestar, a medio plazo la creciente emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, y contribuir asimismo a aliviar los impactos ambientales derivados el efecto invernadero (Swift, 2001).

La estabilización o protección de la materia orgánica en el suelo frente a la degradación microbiana se produce a través de dos mecanismos principales: Mecanismos físico-químicos de protección de la materia orgánica a través de la formación de agregados y estabilización bioquímica a través de la alteración de los compuestos orgánicos a formas químicas más resistentes, correspondiente al proceso de humificación (Stevenson, 1994; Fernández et al., 2009).

Los mecanismos de adsorción mineral y de agregación son importantes procesos que conducen a la estabilización del carbono en el suelo. La adsorción en los minerales del suelo protege a la materia orgánica frente al ataque microbiano (mineralización) incrementando el tiempo medio de residencia del carbono estabilizado en el mineral (Swift, 2001; Kaiser & Guggenberger, 2003). Diferentes estudios han indicado que el carbono orgánico asociado a las fracciones finas del suelo (limo y arcilla) es más antiguo o permanece durante más tiempo en el suelo que el asociado a otras fracciones del suelo de mayor tamaño de partícula (Kalbitz et al., 2005). Asimismo, estudios realizados utilizando carbono radiactivo e isótopos de <sup>13</sup>C han puesto de manifiesto que el carbono retenido en las fracciones del suelo de mayor tamaño de partícula presenta mayores tasas de mineralización (Bird et al., 2002). Los agregados también protegen al carbono del suelo, siendo los microagregados los que contienen un carbono más antiguo (Six & Jastrow, 2002; Pulleman & Marinissen, 2004).

La materia orgánica del suelo puede estar: (i) estabilizada físicamente o protegida frente a la descomposición mediante microagregación; (ii) estabilizada por estrecha asociación con partículas de limo o de arcilla, y (iii) bioquímicamente estabilizada a través de la formación de compuestos orgánicos recalcitrantes (humus) (Six et al., 2002). Numerosos estudios han indicado que la materia orgánica unida a la fracción gruesa del suelo (>250 μm) se encuentra poco protegida (bioquímica y físicamente), mineralizándose fácilmente y desapareciendo rápidamente del medio (Cambardella & Elliott, 1992; Solomon et al., 2000), mientras que la materia orgánica que se encuentra en los microagregados libres (<250 μm) o microagregados dentro de los macroagregados se encuentra físicamente protegida de la descomposición.

La protección física ejercida por los macro y/o microagregados sobre la materia orgánica puede ser atribuida a: (1) la compartimentación del sustrato y de la biomasa microbiana, (2) la reducida difusión de oxígeno dentro de los macroagregados y especialmente en los microagregados, que ocasiona que dentro de los microagregados exista muy baja actividad, y (3) la compartimentación de la biomasa microbiana (Six et al., 2000b).

Diversos estudios han puesto de manifiesto la capacidad de los suelos degradados de retener parte del carbono adicionado con la enmienda mediante su asociación con la fracción mineral del mismo quedando así protegido frente a la descomposición, aumentando el pool de carbono estable del suelo (Six et al., 2000a; Larney et al., 2009; Nicolás et al., 2012; García et al., 2012). Por tanto, sería de interés considerar, como se hace en este trabajo de Tesis doctoral, la posibilidad de restaurar la materia orgánica perdida en

suelos degradados mediante la adición de enmiendas orgánicas, que no sólo mejoren la calidad de los suelos, (García, 1990; Pascual et al, 1997) y su estructura (Caravaca et al, 2002;. García et al, 2005), lo que hace que sean adecuadas para sostener una cubierta vegetal, sino que también contribuya a favorecer la fijación estable en el suelo de una parte del C añadido (Van Noordwijk et al, 1993), contribuyendo de esta manera a disminuir los niveles de CO<sub>2</sub> liberado a la atmósfera, mitigando el efecto invernadero.

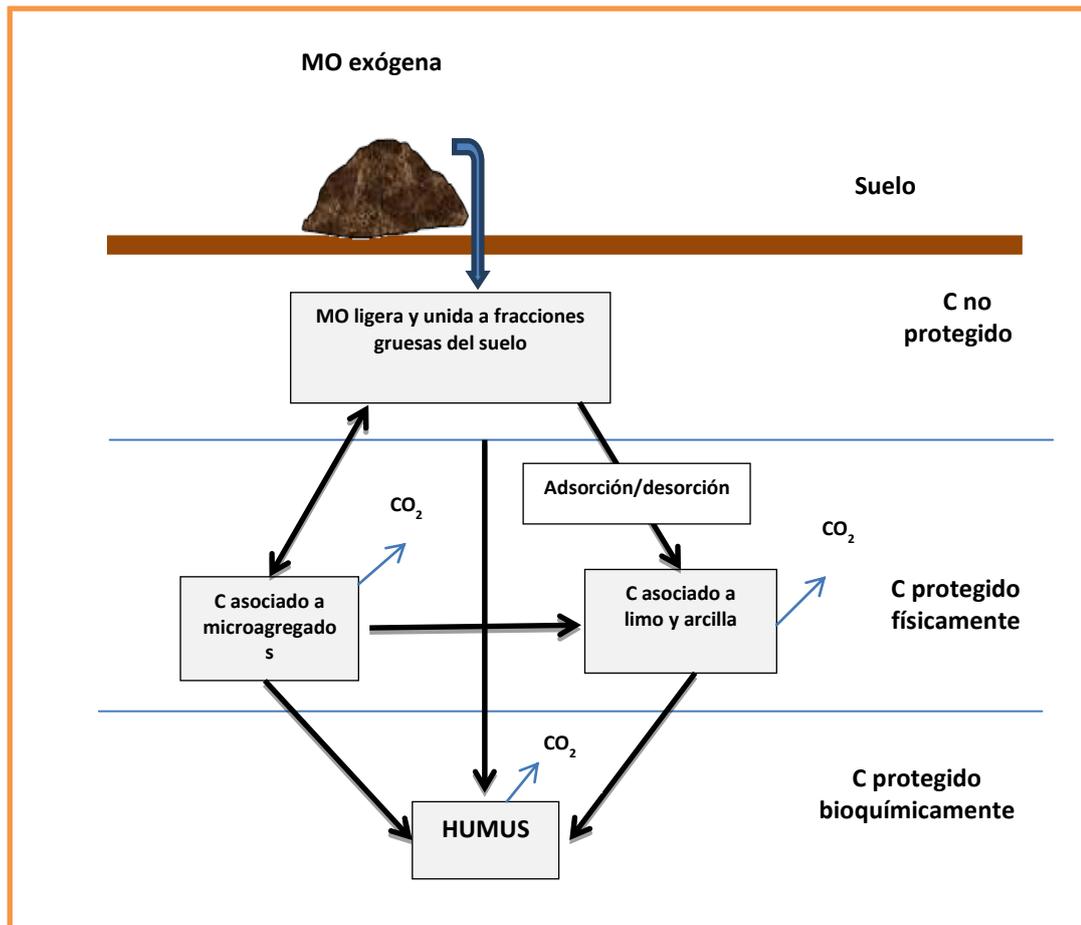


Figura 1.2. Dinámica de la materia orgánica en el suelo

## IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS Y SU ACTIVIDAD PARA LA CALIDAD DE UN SUELO

Los microorganismos juegan un papel fundamental en la formación, estructura y funcionalidad del suelo y de ahí su importancia. Así, la fertilidad biológica del suelo es el resultado de muchos procesos en los cuales intervienen los microorganismos, tales como los procesos de formación inicial del suelo a partir de la roca madre, formación y mantenimiento de la estructura del suelo, descomposición de la materia orgánica, fijación y transformación del nitrógeno, regulación de los ciclos de nutrientes y mejora del crecimiento vegetal mediante

la síntesis de factores de crecimiento y antagonismos con los microbios patógenos de plantas. Igualmente, es ampliamente conocida la estrecha relación existente entre la formación y la estabilidad de los agregados del suelo y la fertilidad del mismo, definida con frecuencia como fertilidad física del suelo. Los suelos con buena agregación, drenan bien, favorecen la difusión de gases y disoluciones y favorecen la fijación y el crecimiento de las raíces y el desarrollo de una población microbiana activa. La estructura del suelo y su biota son interdependientes, la estructura del suelo afecta la biota del suelo al tiempo que ésta contribuye a la formación y estabilidad de los agregados del suelo. Así, la actividad de la microflora del suelo interviene en la formación de agregados tanto directamente (las hifas de los hongos y actinomicetos mantienen unidas las partículas de suelo dispersas, y las células de capsulas microbianas fijan partículas minerales en sus capas de mucosa), como indirectamente, a través de la formación de productos extracelulares (polisacáridos, ácidos poliurónicos etc.) que actúan como cementantes orgánicos suaves, o de polímeros aromáticos del humus responsables de una acción cementante más fuerte

La mayoría de los organismos del suelo son saprofitos y juegan un papel fundamental en la descomposición y mineralización de los residuos orgánicos. Esto es particularmente importante en los ecosistemas naturales donde la descomposición de la materia orgánica es la principal fuente de nutrientes para el crecimiento vegetal. Los microorganismos utilizan el carbón, la energía y los nutrientes disponibles en la materia orgánica para producir nueva biomasa microbiana. La mineralización de los nutrientes por los microorganismos y a su vez, la degradación de los restos microbianos y la liberación de los nutrientes contenidos dentro de la biomasa microbiana por la fauna del suelo son elementos clave en la fertilidad del mismo.

Procesos tales como la mineralización y humificación de la materia orgánica se rigen en gran medida por reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, que como es sabido, son catalizadas por enzimas producidas por los microorganismos del suelo. La actividad enzimática del suelo es la responsable de la formación de moléculas orgánicas estables que contribuyen a la permanencia del ecosistema suelo, y está asimismo implicada en las reacciones relacionadas con el ciclo de nutrientes en el mismo.

Tanto los microorganismos del suelo como las actividades enzimáticas del mismo resultan de gran utilidad como indicadores de diferentes perturbaciones sufridas por el suelo, debido a que desempeñan un papel fundamental en el ecosistema. El estudio del estado biológico puede servir como un marcador del estatus del suelo, es decir, como un indicador de su calidad, lo cual irá ineludiblemente unido a la fertilidad natural de dicho suelo. Así, la estimación del estado biológico del suelo puede resultar útil tanto para detectar posibles procesos degradativos que no podrían detectarse con métodos tradicionales de detección (el estado de la cubierta vegetal, contenido en carbono orgánico total), como para el seguimiento de la recuperación de un suelo degradado.

No es sencilla la búsqueda de parámetros sensibles y útiles para diagnosticar cambios en la actividad microbiana del suelo, y por tanto en su calidad y fertilidad. La actividad enzimática del suelo ha sido considerada como el principal factor que contribuye a la actividad microbiológica total de un suelo y a su calidad. Parámetros de tipo biológico (carbono de la biomasa microbiana, respiración del suelo como medida del CO<sub>2</sub> desprendido, oxidoreductasas tales como deshidrogenasa y catalasa), así como otros parámetros bioquímicos (hidrolasas del ciclo del carbono: invertasa y  $\beta$ -glucosidasa; del ciclo del nitrógeno: ureasa y proteasa; del ciclo del fósforo: fosfatasa, o del ciclo del azufre: arilsulfatasa), podrían ser considerados, junto a

otros parámetros derivados directamente del estudio de la materia orgánica, como biomarcadores de la productividad y de la fertilidad del suelo.

### Las enzimas del suelo

Las enzimas son proteínas cuyo papel es catalizar las reacciones químicas en los sistemas vivos, actúan sobre sustratos específicos transformándolos en productos necesarios para los ciclos biológicos. Su importancia fundamental radica en que el funcionamiento de los ecosistemas no se puede entender correctamente sin la participación de los procesos enzimáticos, ya que las enzimas determinan gran parte de las transformaciones químicas que se producen en el suelo (Stryer, 1995).

El estudio de Richard Burns sobre la localización y el comportamiento de las enzimas del suelo, y su interacción con los compuestos orgánicos e inorgánicos, publicado en 1978 y 1982, es una obra muy conocida y muchos autores han aplicado su teoría como un marco de base hasta el tiempo presente. Burns establece diez categorías diferentes de enzimas dependiendo del tipo de asociación y ubicación. La simplificación de estas 10 categorías conduce a la clasificación de las enzimas en cinco tipos:

1. Las enzimas asociadas con las células vivas. Hay cuatro sub-categorías, según la ubicación de la función enzimática:
  - i. La ubicación de las enzimas podría estar dentro del citoplasma, ligada a la pared celular de una célula viable (enzimas intracelulares). Muchas de estas enzimas están asociadas con los aspectos centrales del metabolismo, como la glucólisis y el ciclo de Krebs.
  - ii. Las enzimas unidas a la superficie exterior de las todavía células vivas cuyos sitios activos se extienden en el medio ambiente. También enzimas que están incrustadas en la superficie exterior de las membranas de las células de las raíces de las plantas y de los microorganismos están incluidas en esta categoría.
  - iii. Las secretadas por las células vivas durante el crecimiento y división celular normal y que se encuentran en la fase acuosa del suelo.
  - iv. Las enzimas liberadas de las células lisadas, cuya ubicación original era funcional dentro de la célula y que pueden sobrevivir durante un período corto de tiempo en la fase acuosa del suelo.
2. Las enzimas asociadas con células no proliferantes. Estas enzimas existen dentro de las esporas de hongos, protozoos, las semillas de las plantas, y las endosporas bacterianas.
3. Las enzimas asociadas temporalmente formando complejos enzima-sustrato solubles o insolubles.
4. Las enzimas unidas a las células muertas enteras o restos celulares.
5. Las enzimas inmovilizadas sobre coloides minerales o coloides húmicos. Estas enzimas tienen una larga vida media (en relación con las enzimas en la fase acuosa del suelo).

La asignación de las enzimas a estas categorías no es inequívoca, ya que algunas enzimas pueden pertenecer a varias categorías al mismo tiempo, mientras que otras enzimas pueden cambiar con el tiempo de una categoría a otra.

Podemos así establecer categorías con las enzimas del suelo según su función: hidrolasas, oxidoreductasas, liasas y transferasas (Skujins, 1978; Gianfreda & Bollag, 1996). Las enzimas del suelo más estudiadas son las oxidoreductasas (en particular, deshidrogenasas, catalasas y peroxidasas), y las hidrolasas (sobre todo invertasas, proteasas, fosfatasa y ureasas); menos estudios se han llevado a cabo sobre otras enzimas del tipo transferasas o liasas. Una parte de las enzimas del suelo son sin duda extracelulares siendo liberadas durante el metabolismo y muerte celular, mientras que otras son intracelulares, formando parte de la biomasa microbiana. Por último, existen las enzimas inmovilizadas que son las que pueden mantener un nivel constante y estable de actividad enzimática en el suelo, independiente de la proliferación microbiana y de las formas usuales de regulación de la síntesis y secreción de enzimas. Este tipo de enzimas inmovilizadas pueden permanecer unidas a coloides minerales (como la arcilla) u orgánicos (como las sustancias húmicas), siendo muy resistentes a procesos de desnaturalización (Ladd, 1978; Burns, 1982; Benítez et al., 2005). Por todo esto, vemos que es difícil usar un único valor de actividad enzimática para determinar el estado general de nutrientes en el suelo o para determinar su índice de actividad microbiológica. Sin embargo, la medición simultánea de varias enzimas puede ser útil como un marcador de la bioactividad y se puede utilizar como un índice de fertilidad bioquímica de un suelo (Gil-Sotres et al., 1992).

*Actividad ureasa.* La ureasa cataliza la hidrólisis de urea o sustratos tipo ureicos para dar dióxido de carbono y amoníaco como productos de reacción. Esta enzima se ha estudiado en profundidad ya que su síntesis puede resultar en grandes pérdidas de N en forma de amonio, lo que puede tener graves consecuencias económicas. En consecuencia, los estudios de la ureasa se han centrado en sus mecanismos de inhibición en un intento de disminuir estas pérdidas (Dick & Tabatabai, 1993).

*Actividad fosfatasa.* La importancia agronómica y biotecnológica de las fosfatasa es que activan la transformación del P orgánico en P inorgánico, convirtiendo de esta forma el P orgánico en disponible para las plantas. La actividad fosfatasa es inhibida por P inorgánico, el producto final de su reacción enzimática. Esto es debido a una inhibición de realimentación, de modo que, las fosfatasa se sintetizan sólo cuando el P disponible es deficiente (Nannipieri et al., 1979).

*Actividad  $\beta$ -glucosidasa.* Estas enzimas son una hidrolasas que intervienen en el ciclo del C, actuando específicamente en la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos de largas cadenas de carbohidratos. La hidrólisis de estos sustratos juega un papel importante en la consecución de la energía para los microorganismos (Eivazi & Zakaira, 1993).

*Actividad deshidrogenasa.* La oxidación biológica de los compuestos orgánicos se produce por medio de procesos de deshidrogenación, en los que las enzimas intracelulares llamadas deshidrogenasas toman parte. La actividad deshidrogenasa se ha propuesto como un indicador de la actividad microbiológica de un suelo (García et al., 1997b). Los suelos degradados de las áreas mediterráneas del SE de España, que muestran bajos valores de otros parámetros de la actividad microbiana (por ejemplo, el contenido de adenosín-tri-fosfato y la tasa de respiración basal), también muestran baja actividad deshidrogenasa (García et al., 2000b).

Las actividades enzimáticas pueden ser utilizadas como parte del conjunto de herramientas necesarias para asignar sostenibilidad, son de fácil determinación (a pesar de la dificultad añadida de no existir métodos

estándares) y responden rápidamente al manejo del recurso suelo, así como a diversas acciones antrópicas (Gianfreda & Bollag, 1996; Riffaldi et al., 2002; Poll et al., 2003; García et al., 2005; Allison & Jastrow, 2006; Kandeler et al., 2006; Tejada et al., 2006; Labud et al., 2007).

A pesar de la importancia que tiene el estudio de estos parámetros bioquímicos del suelo, debemos poner de manifiesto aquí uno de los mayores problemas que en la actualidad existen en este campo, y es precisamente su determinación analítica. La falta de estandarización de técnicas de medida para parámetros indicativos de actividad metabólica de suelos aparece como uno de los grandes problemas para popularizar más los estudios basados en su empleo. La mencionada falta de estandarización de metodologías se ve influenciada por una gran cantidad de factores, tanto ambientales (temperatura, humedad, etc.), como del propio trabajo analítico (uso de tampones, cantidad de sustrato, condiciones de trabajo, etc.), y todos ellos inciden sobre las determinaciones de los parámetros bioquímicos de suelos.

### **Las enzimas inmovilizadas en el suelo**

Todos los procesos metabólicos del suelo son impulsados por enzimas (Badaluco & Kuikman, 2001). Las principales fuentes de enzimas en el suelo son las raíces, animales y microorganismos. Una vez que las enzimas son producidas y excretadas por microorganismos o células de la raíz, se enfrentan a duras condiciones, siendo la mayor parte de ellas desnaturalizadas rápidamente por acción de las proteasas presentes en el suelo, condiciones adversas de pH, temperatura etc. Sin embargo, algunas de estas enzimas pueden ser adsorbidas en los coloides orgánicos, inorgánicos o por los coloides órgano-minerales del suelo quedando así protegidas contra la degradación microbiana. Estas enzimas extracelulares que se encuentran asociadas a los coloides del suelo se denominan enzimas estabilizadas o inmovilizadas y muestran una mayor resistencia a la degradación térmica y proteolítica (Nannipieri et al., 1996). La protección de estas enzimas inmovilizadas se basa fundamentalmente en su asociación con los coloides minerales inorgánicos, tales como superficies de arcilla, y/o su asociación con complejos orgánicos tales como las sustancias húmicas.

La adsorción de enzimas y otras proteínas en arcillas ha sido estudiada desde hace años por diferentes autores (Ensinger y Gieseking, 1939; McLaren, 1954; Esterman et al., 1959) quienes llegaron a la conclusión de que las arcillas protegen a las enzimas contra la degradación microbiana. Posteriormente se estableció la participación de la materia orgánica en la adsorción de enzimas mediante la formación de complejos humus-enzima por uniones covalentes durante la formación del polímero húmico o por uniones iónicas o de puente de hidrógeno al polímero ya formado (Ladd & Butler, 1975).

A finales de los años 80, la teoría de los complejos humus-enzima había sido confirmada y demostrada su importancia en la dinámica del suelo. El método de purificación y extracción de los complejos, así como los compuestos químicos de la matriz fueron desarrollados por algunos científicos usando las entonces nuevas técnicas como la pirólisis-cromatografía de gases (Py-CG) (Ceccanti et al., 1989; Bonmati et al., 1998). Más tarde, el avance tecnológico en el campo de la biología molecular ha contribuido a mejorar los conocimientos con respecto a la interacción entre proteínas, estructuras químicas, la relación de los coloides órgano-minerales y los microorganismos del suelo.

Existe un consenso general con respecto a que los complejos formados por los coloides órgano-minerales en los suelos presentan una mayor persistencia frente a la desnaturalización térmica (Rowell et al., 1973; Ladd & Butler, 1975; Sarkar y Burns, 1984; Jindo et al., 2011) así como contra el ataque proteolítico por enzimas tales como la pronasa o tripsina (Petit et al., 1976; Nannipieri et al., 1982 y 1986; Sarkar y Burns, 1984; Joachim et al., 2008) debido al incremento en la rigidez de la proteína (Ladd y Butler, 1975). Las enzimas inmovilizadas en las moléculas húmicas son de larga vida y no dependen de las variaciones de población microbiana o de su síntesis por las células vivas (Burns, 1982). Estas enzimas inmovilizadas están rodeadas por una red de moléculas húmicas con poros lo suficientemente grandes como para permitir la difusión de los sustratos y los productos pero no de enzimas proteolíticas (Burns et al., 1982). Estas enzimas persistentes pueden estar presentes en los suelos desde unos pocos días a varios años, dependiendo de la ubicación y las condiciones del suelo, tales como la temperatura, pH del suelo, y la profundidad (Gianfreda, 1996; Kandeler et al, 1999; Ekenler et al, 2003).

Los aportes de enmiendas orgánicas contribuyen a diferentes niveles a la rehabilitación del suelo mediante el suministro de diferentes sustratos (Brookes et al 2008), sin embargo todavía existe escasa información sobre la influencia de estas enmiendas en la formación y/o estabilización de los complejos humus-enzima (Ladd, 1975; Burns et al, 1982; Nannipieri et al. , 1996). Es de destacar que a día de hoy, los avances en este campo son escasos (Bonmatí et al, 2009). Además, a pesar del hecho de que el efecto de los residuos orgánicos de diferentes orígenes o con nivel de estabilización diferentes son un tema comúnmente tratado en la ciencia del suelo, los estudios realizados a largo plazo y que tengan en cuenta la dosis de aplicación, como es uno de los objetivos de este trabajo de Tesis doctoral, son escasos (Prasad et al 2008; Cwalina-Ambroziak et al, 2010). Es deseable y difícil de cubrir estos aspectos, importantes para lograr una mejor comprensión global de la respuesta del suelo a las enmiendas orgánicas en términos ecológicos.

### **La biomasa microbiana del suelo y la medida de su actividad**

El carbono de la biomasa microbiana pueden utilizarse de forma más efectiva que la materia orgánica en general, o el carbono orgánico total en particular, como indicador de las variaciones sufridas en la calidad de un suelo, ya que responde de forma más rápida y sensible a los cambios que se puedan producir en el mismo (degradación, contaminación, usos del suelo, etc).

La primera característica que llamó la atención sobre la biomasa microbiana fue su relativo gran tamaño, comprendido entre el 1 y 3% de la materia orgánica total del suelo (Powlson et al, 1987). A pesar de representar un pequeño porcentaje dentro del conjunto de la materia orgánica, son los componentes más activos del mismo. Martens, en 1995, definió a la biomasa microbiana como el almacén a través del cual deben de pasar nutrientes inorgánicos y compuestos orgánicos diversos.

Las medidas a corto plazo de la biomasa microbiana pueden marcar la tendencia de la materia orgánica a largo plazo (Powlson et al., 1987). También se ha empleado como índice de comparación entre sistemas naturales y degradados (Ross et al., 1982).

Dentro de las medidas de parámetros relacionados con la biomasa microbiana del suelo, la medida del adenosin-5-trifosfato (ATP) también constituye un método útil para estimar la cantidad de biomasa microbiana. El ATP es un compuesto común en todos los seres vivos, su misión principal es la de actuar

como molécula energética, y es utilizado en todos los procesos celulares bien como coenzima o como sustrato. Este parámetro se muestra correlacionado con otras estimaciones de biomasa microbiana, tanto en suelos sin enmendar (García et al., 1997), como en suelos enmendados con sustratos no estabilizados (Ocio y Brookes, 1990). Según Jenkinson (1988), el contenido de ATP de un suelo será un índice de biomasa microbiana siempre que las muestras de dicho suelo sean preincubadas bajo condiciones óptimas durante 7-10 días antes de su determinación, ya que en este caso, toda la biomasa microbiana estará en condiciones de máxima actividad fisiológica, lo que supone un contenido constante de ATP en las células microbianas. Por otra parte, según Eiland (1985) y Nannipieri et al. (1990) el contenido de ATP determinado inmediatamente después de muestrear un suelo, a la temperatura ambiente de dicho suelo y con su humedad (lo que se denomina comúnmente "muestra fresca"), representaría únicamente la biomasa microbiana activa del suelo en dichas condiciones de campo.

Otro parámetro relacionado con la actividad metabólica global de la biomasa microbiana es la actividad deshidrogenasa. La oxidación de sustratos orgánicos bajo condiciones aerobias en los suelos está unida a las membranas microbianas donde se integran las cadenas de transporte electrónico que contienen proteínas y oxidorreductasas, y entre ellas, enzimas deshidrogenasas que requieren NAD o NADP como coenzimas y flavoenzimas con FAD o FMN como grupos prostéticos (Lehninger, 1989). Estas enzimas deshidrogenasas son fundamentales en los sistemas enzimáticos de todos los microorganismos (Von Mersi & Schinner, 1991) y juegan un papel esencial en las primeras etapas de oxidación de la materia orgánica del suelo, transfiriendo electrones o hidrógeno desde los sustratos a los aceptores. La actividad de estas enzimas sirve como indicador de los sistemas redox microbianos en los suelos y pueden ser considerados como una buena medida de la actividad oxidativa de la biomasa (Tabatabai, 1994), estando muy correlacionada con la respiración basal de los suelos y siendo un buen índice de la actividad biológica de los mismos en áreas semiáridas como la que nos ocupa este estudio (García et al., 1994).

También con relación a la actividad de la biomasa microbiana de un suelo, otro parámetro ampliamente utilizado para medir dicha actividad es la respiración microbiana, la cual puede ser determinada mediante el desprendimiento de CO<sub>2</sub> o el consumo de O<sub>2</sub>. La degradación de materia orgánica es una propiedad de todos los microorganismos heterótrofos y el comportamiento de dicha descomposición se ha utilizado comúnmente para indicar el estado biológico de los suelos (Nannipieri et al., 1990). La medida del desprendimiento de CO<sub>2</sub> se ha empleado para estimar la biomasa microbiana del suelo que realmente es activa. La medida de respiración del suelo en presencia de productos potencialmente tóxicos empleados en agricultura, puede permitir evaluar los daños causados por estos productos sobre las funciones fisiológicas de los suelos (Nannipieri et al., 1990). La determinación del desprendimiento de CO<sub>2</sub> también es útil para conocer el efecto de determinadas variables sobre la oxidación de la materia orgánica *in situ* (Caravaca & Roldán, 2003; Ros et al., 2006; Liao & Xie, 2007), pero en ningún momento puede indicar qué sustrato orgánico en particular está siendo catabolizado.

## **DIVERSIDAD DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DEL SUELO**

La aplicación de técnicas de biología molecular al estudio de la microbiología del suelo ha representado un gran avance en el conocimiento de estos ecosistemas. El reconocimiento de la presencia de una gran diversidad de microorganismos en suelos, que resultaban totalmente desconocidos porque no se habían

obtenido en cultivos de laboratorio, es sólo el comienzo de una nueva era en la microbiología molecular de suelos. Uno de los grandes retos actuales es la determinación del papel funcional de los diferentes microorganismos que constituyen las comunidades edáficas.

La integración de técnicas de estudio de la microbiología más tradicional, junto con metodologías moleculares, incluyendo los avances que suponen las técnicas de genómica y metagenómica, sin duda contribuirá a un mejor conocimiento del funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo.

Los organismos del suelo no se distribuyen al azar sino que siguen patrones espaciales de agregación, a escalas diferentes (desde nm a km) que se superponen. Esta estructuración obedece al efecto causado por diferentes factores de control y es totalmente dinámica (Ettema, et al., 2002). Utilizando técnicas de observación de secciones ultrafinas de suelo mediante microscopía electrónica, tomografía, análisis geoestadístico y la elaboración de modelos, especialmente basados en fractales, se ha demostrado que la distribución de las bacterias edáficas está altamente estructurada, y que esta estructuración es importante para la funcionalidad del suelo. Las bacterias se organizan en microcolonias compuestas de pocas células que pueden pertenecer a diferentes morfotipos (Nunan, et al., 2003). Factores como la presencia de raíces, pequeños agregados, nutrientes y poros parecen gobernar la distribución de bacterias en microhábitats.

La complejidad del suelo como ecosistema (nivel microscópico incluido) junto con las especiales particularidades de los microorganismos, tales como su tamaño microscópico y las dificultades para una diferenciación basada en su morfología, habían proporcionado una visión del mundo microbiano edáfico como una caja negra, de la cual se sabía que cumplía una función aunque no se conociese su contenido (Insam, 2001). A lo largo del tiempo se han realizado análisis de biomasa microbiana empleando diferentes metodologías, así como determinación de enzimas, lo cual constituye una aproximación a la actividad y abundancia microbiana, y a los flujos de intercambio con la atmósfera y el subsuelo de compuestos importantes que permitían el análisis de procesos como respiración, desnitrificación, nitrificación, fijación de nitrógeno, etc. Pero el conocimiento de los microorganismos del suelo quedaba limitado a aquellos pocos que podían obtenerse en cultivos de laboratorio, y había, y aún sigue habiendo, importantes preguntas que resolver en cuanto a la composición y estructura de las comunidades microbianas edáficas, los cambios que se producen en dichas comunidades en respuesta a diferentes factores ambientales y/o perturbaciones y finalmente, al papel funcional de los diferentes tipos de microorganismos que integran la comunidad.

A partir de la década de los ochenta se produjo una revolución espectacular en el conocimiento de la diversidad microbiana en suelos debido a la incorporación de novedosas y potentes técnicas de estudio, que no requieren del cultivo previo de los microorganismos (Insam, 2001; Kirk, et al., 2004). Estas técnicas se basan en el análisis de marcadores moleculares como los ácidos grasos de fosfolípidos de membrana (PLFA). Estos marcadores se encuentran presentes en todas las células, se pueden extraer directamente de muestras de suelo sin necesidad de realizar cultivos previos y además, permiten diferenciar distintos grupos de microorganismos. Utilizando estos marcadores no sólo se puede determinar la composición de las comunidades microbianas sino que también se puede cuantificar la abundancia de microorganismos específicos.

Otra técnica de gran utilidad, utilizada para estudiar el perfil fisiológico de las comunidades bacterianas (CLPP) se basa en la utilización de placas con diferentes fuentes de carbono, EcoPlates BIOLOG. En este

tipo de análisis nos permite obtener el perfil fisiológico de la comunidad bacteriana mediante la inoculación de microorganismos, extraídos directamente de una muestra de suelo, a microplacas que contienen diferentes fuentes de carbono.

Mediante el estudio de la composición estructural y funcional de las comunidades bacterianas podemos conocer el estado del ecosistema; estas comunidades bacterianas se caracterizan por presentar actividades fisiológicas altas y rápidas respuestas a los cambios ambientales. La diversidad de las comunidades microbiológicas generalmente disminuye en respuesta a perturbaciones o estrés ambiental. El número de poblaciones sobrevivientes poseen propiedades específicas que le permiten persistir dentro de las comunidades perturbadas (Atlas *et al.* 1991).

Por ello, en los últimos años han aumentado las investigaciones interesadas en determinar la composición y función microbiológica de estas comunidades bacterianas (Zogg *et al.*, 1997; Balser & Firestone, 2005). Estudios previos indican que la composición microbiana está influenciada por factores como el pH (Högberg *et al.*, 2007) y la disponibilidad de carbono y nutrientes (Fierer *et al.*, 2007); posteriormente otros estudios han indicado que la composición de la comunidad microbiana del suelo puede estar influenciada por las especies vegetales (Waldrop *et al.*, 2000; Balser & Firestone, 2005).

### **Análisis de la diversidad funcional de la comunidad microbiana (BIOLOG)**

En los últimos años, el perfil fisiológico de las comunidades bacterianas (CLPP) del suelo ha sido determinado mediante la evaluación de su capacidad para utilizar diferentes sustratos carbonados (sistema BIOLOG) (Garland & Mills, 1991; Agnelli *et al.*, 2004; Grayston & Prescott, 2005). Con este sistema (BIOLOG) es posible estudiar la diversidad funcional microbiana, la cual está relacionada con las tasas de utilización del sustrato y con la presencia o ausencia de la utilización de sustratos específicos (Nannipieri *et al.*, 2002).

El sistema BIOLOG, desarrollado originalmente para ayudar en la descripción taxonómica de las bacterias en cultivo axénico, se basa en la capacidad de las células bacterianas para oxidar hasta 95 diferentes sustratos de carbono en placas de microtitulación (Bochner, 1989). Las placas se incuban durante un período adecuado de tiempo (generalmente 72 horas) y la oxidación del sustrato se mide debido a la reducción de un colorante de tetrazolium. La velocidad y la densidad del cambio de color dependerán de la cantidad y actividad de las células microbianas en el pocillo de la placa de microtitulación. El sistema BIOLOG se ha aplicado también a la evaluación de la diversidad funcional metabólica de las comunidades microbianas de los diferentes hábitats (Garland *et al.*, 1996) y tipos de suelo (Bossio & Scow, 1995), incluyendo la rizosfera (Grayston *et al.*, 1998) y los suelos de pastizales (Zak *et al.*, 1994). Las comunidades microbianas responden a patrones específicos de hábitat y su desarrollo depende del tipo de fuente de carbono, y por lo tanto, esta técnica es sensible para detectar las diferencias temporales y espaciales entre las comunidades microbianas del suelo (Insam, 1997; Nannipieri *et al.*, 2002).

Los resultados de esta técnica no están necesariamente relacionados con el potencial funcional de las bacterias presentes en el suelo (Smalla *et al.*, 1998) y es propensa a los sesgos inherentes a los métodos utilizados para medir la diversidad en condiciones de cultivo (Preston *et al.*, 2002) pero sin embargo, esta

técnica ha sido reconocida como una herramienta útil para la comparación de las comunidades bacterianas (Smalla et al, 1998; Ros et al, 2006).

### **Análisis de la diversidad estructural de la comunidad microbiana (PLFAs)**

#### *Abundancia fúngica y bacteriana estimada a través del análisis de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana (PLFA)*

Sabemos que los microorganismos del suelo juegan un papel importante en la descomposición de materia orgánica y los ciclos de nutrientes, y por lo tanto ofrecen una visión integrada de la calidad del suelo y de su salud. Por otra parte, las propiedades microbiológicas son los indicadores más sensibles y rápidos de las perturbaciones y los cambios de la calidad del suelo. En este sentido, una herramienta que puede ayudarnos a entender la respuesta ecológica del suelo es el perfil de ácidos grasos fosfolípidicos (PLFAs).

Los PLFAs son componentes esenciales de todas las células vivas y, por ello, mediante cambios en el perfil de estas moléculas, podemos caracterizar cambios en las comunidades microbianas. Además, los PLFAs tienen la ventaja de aportar información cuantitativa sobre la biomasa microbiana del suelo (Joergensen & Emmerling, 2006) y su estructura (Ebersberger et al., 2004) aportando una información útil sobre la biomasa microbiana viable, ya que los fosfolípidos son degradados rápidamente después de la muerte celular. Así, el estudio de PLFAs permite la identificación y cuantificación de grandes grupos microbianos, como pueden ser las bacterias Gram+ o Gram-, actinomicetos, hongos, etc, obteniéndose una “huella dactilar” de la comunidad microbiana edáfica (Zornoza, 2007) que puede ser estudiada mediante las adecuadas herramientas estadísticas. El perfil de PLFAs se ha mostrado sensible al tipo del suelo y su manejo (Bossio et al., 1998), a la contaminación por metales pesados (Frostegård et al., 1993a), a la composición vegetal (Tscherko et al., 2005), y a la incorporación de enmiendas orgánicas (Petersen et al, 2003). Debido a esto, la descripción cuantitativa de la estructura de la comunidad microbiana y su diversidad han despertado un gran interés en la evaluación de la calidad del suelo (Zelles, 1999;. Zornoza et al, 2009).

Alteraciones de los parámetros fisiológicos como respuesta a un determinado cambio en el medio ambiente pueden ser detectadas en los perfiles de PLFAs, que pueden ser utilizados para cuantificar las respuestas de estrés o períodos de actividad de las comunidades microbianas (Böhme et al., 2005).

Por todo esto, esta técnica ha demostrado ser una herramienta sensible y fiable para la evaluación de los cambios en la estructura de la comunidad microbiana de las muestras de suelo (Kandeler et al., 2008).

Estos análisis se llevan a cabo mediante la extracción de lípidos a partir de muestras de suelo, utilizando disolventes adecuados, y luego separándolos en diferentes clases de lípidos. Los ácidos grasos pueden ser liberados de la fracción de fosfolípidos y su determinación se realiza por cromatografía de gases (Frostegård et al. 1993a).

#### *Determinación del contenido de ergosterol*

El ergosterol es una molécula que juega un papel fundamental en el crecimiento de los hongos (Lees et al., 1995) y, también, de determinadas microalgas (Grant y West, 1986; Newell et al., 1988). De hecho, es un componente de naturaleza lipídica que se encuentra, principalmente, en su estado libre, formando parte de

las membranas celulares de los hongos, y, en menor medida, esterificado con ácidos grasos (Martin et al., 1990).

Así, el ergosterol es el esteroles que predomina en las membranas celulares fúngicas, permitiendo la función adecuada de muchas enzimas unidas a ella, como la quitina sintetasa, responsable de la síntesis de quitina; es por esto, por lo que la molécula de ergosterol favorece el crecimiento y división de los hongos. La cuantificación de la concentración de ergosterol en el suelo suele emplearse como bioindicador de la biomasa fúngica viva (Grant & West, 1986; Frostegard & Baath, 1996, Montgomery et al., 2000).

Generalmente, debido a que la molécula de ergosterol es rápidamente degradada tras la muerte celular y porque se asume que el área de la membrana esta correlacionada con el volumen de células (Tunlid & White, 1992), los componentes de las membranas celulares, como es el caso del ergosterol, se consideran atractivos indicadores de la biomasa de hongos en muestras ambientales. Además, los esteroides representan un componente bastante estable de la biomasa fúngica (entre 5 y 15 mg/g) en la mayoría de hongos (Weete & Gandhi, 1996). Sin embargo, hay autores que consideran que la determinación de ergosterol para cuantificar la biomasa fúngica del suelo no es un método adecuado (Olsson et al., 2002). Se basan en el hecho de que la aparición de ergosterol en las membranas celulares de los hongos se limita a los taxones de hongos más avanzados, mientras que otros esteroides aparecen en grupos de hongos más primitivos (Weete & Gandhi, 1996).

De cualquier forma, la determinación del contenido total de ergosterol en el suelo suministra información sobre el contenido de hongos en el mismo y puede permitir monitorizar un proceso de bioestimulación, debido al hecho de que este esteroles solo se presenta en células vivas y, por tanto, activas. La presencia de nutrientes aportados como bioestimulantes microbianos influye sobre el crecimiento de los hongos, que emplean estos materiales para su propio crecimiento y desarrollo. Un incremento o, incluso, una disminución del contenido de ergosterol en un suelo bioestimulado es un indicador de la actividad metabólica del suelo.

## **LA DEGRADACIÓN DEL SUELO**

La degradación es un problema multidisciplinar y multicausal que generalmente esconde un conjunto de procesos interrelacionados (físicos, químicos, etc.) que se manifiestan a diferentes niveles de resolución, tanto espacial como temporal (López-Bermúdez, 2006).

En condiciones naturales el suelo tiende a un estado de equilibrio tras su largo proceso de formación (edafogénesis), encontrándose en este estado de máxima evolución más o menos cubierto por una vegetación que le aporta una cantidad progresiva de materia orgánica y nutrientes contribuyendo a mantener e incluso mejorar su estructura, al tiempo que le sirve de protección frente a procesos degradativos de erosión. En estas condiciones los suelos mantienen una calidad adecuada, y realizan todas sus funciones de manera correcta, teniendo una gran capacidad para mantener su equilibrio y reaccionar frente a una perturbación externa (resistencia), volviendo con el tiempo a su estado inicial (resiliencia o elasticidad). Sin embargo, si estas agresiones son frecuentes o muy intensas, el suelo pierde esta capacidad de recuperación y comienza a degradarse.

### **Concepto de degradación y desertificación**

Degradación del suelo y desertificación no son sinónimos. En un sentido muy amplio se entiende por degradación del suelo la disminución de su capacidad para producir biomasa. Ésta pérdida de productividad se debe a un empeoramiento de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. La degradación del suelo puede definirse como “la alteración del equilibrio existente entre sus constituyentes debido a los cambios experimentados en sus propiedades físicas, químicas, biológicas o bioquímicas, que conducen a la pérdida o disminución de su fertilidad y que disminuye la capacidad actual o futura del suelo para generar, en términos de calidad y cantidad, bienes o servicios” (González-Quiñones, 2006). La degradación del suelo es, en definitiva, la disminución de su capacidad para soportar vida, no solo la vida vegetal, que es la más aparente, sino también la de la microflora y la de la fauna propia del suelo.

Por otra parte, de acuerdo con la Convención de Naciones Unidas para Combatir la Desertificación (UNCCD) y la Conferencia de Río, la desertificación puede definirse como “la degradación del suelo en áreas áridas, semiáridas y sub-húmedas, que tiene lugar debido a diversos factores, incluyendo las variaciones climáticas y las actividades humanas no tendentes a la sostenibilidad del ecosistema”. Por tanto, la degradación del suelo tiene lugar en muchos lugares del mundo pero solo se define como desertificación cuando se produce en las regiones secas.

Podemos decir que la desertificación es el empobrecimiento de los ecosistemas terrestres secos por impacto de la acción humana. Este deterioro se refleja en una disminución de la productividad de plantas deseables, en alteraciones indeseables en la biomasa y diversidad de la micro y macro fauna y de la flora, y en un deterioro acelerado de las características del suelo.

### **Magnitud de la problemática de la degradación del suelo**

En los últimos años la degradación del suelo está aumentando en severidad y extensión en muchas partes del mundo, con más del 20 por ciento de las tierras agrícolas afectadas, el 30 por ciento de los bosques y el 10 por ciento de los pastizales (Ruiz & Febles, G., 2004). La degradación del suelo tiene también importantes implicaciones para la mitigación y la adaptación al cambio climático, ya que la pérdida de biomasa y de materia orgánica del suelo desprende carbono a la atmósfera y afecta a la calidad del suelo y a su capacidad de mantener el agua y los nutrientes (FAO 2008).

La degradación y desertificación del suelo constituye un grave problema a nivel mundial que va incrementando de modo alarmante. Las regiones secas definidas como las regiones áridas, semiáridas y sub-húmedas secas (excluyendo los desiertos) cubren un tercio de los suelos del mundo y se encuentran distribuidas en todos los continentes. África tiene 37% de zonas áridas, Asia 33% y Australia 14%. También existen zonas áridas en América y el sur de Europa. En estas zonas donde los suelos son especialmente frágiles, la vegetación escasa, y el clima especialmente adverso, es donde la desertificación tiene lugar. Alrededor del 70% de los 5,2 billones de hectáreas de los suelos de las regiones secas del mundo están ya degradados, lo que significa que la desertificación afecta al 30% del total de los suelos a nivel mundial.

En la Unión Europea, se estima que más del 16 % del total del territorio (52 millones de ha) están afectadas por algún tipo de degradación siendo las zonas más afectadas el centro, este y sudeste de España, centro

y sur de Italia, sur de Francia y Portugal, y extensas áreas de Grecia. España es uno de los países europeos con mayor porcentaje de degradación de sus suelos áridos. Alrededor del 70% de las regiones áridas españolas presentan un grado moderado de desertificación y el 30% de estas regiones se encuentran altamente desertificadas.

Es necesario resaltar que la desertificación lleva emparejada un elevado costo humano. Según la UNCCD, más de 250 millones de personas están directamente afectadas por la desertificación, y casi 1000 millones de personas más, en más de 100 países, están en situación de riesgo. Estas personas por lo general, habitan los países más pobres, y corresponden a los ciudadanos más marginados y políticamente más débiles. La hambruna causada por la desertificación ha influido indudablemente en la desintegración social, la inestabilidad política y el desencadenamiento de conflictos armados en muchas zonas de los países menos desarrollados.

### **La degradación en el área mediterránea**

Tanto la agricultura intensiva realizada en gran parte de los suelos del área mediterránea, como el empleo agrícola de terrenos marginales propensos a la degradación ambiental y poco aptos para el cultivo, así como los fenómenos de contaminación de suelos, que por desgracia son bastante frecuentes, están forzando al empleo de técnicas inadecuadas de manejo para poder mantener la producción, dando lugar a una pérdida de la calidad y por tanto de la fertilidad de estos suelos; esta pérdida de productividad ha desembocado en el abandono y posterior degradación de muchos suelos, la contaminación de aguas subterráneas y superficiales, y la disminución de la biodiversidad. Como resultado, nos encontramos con extensas áreas de terreno que presentan síntomas severos de degradación, mostrando una reducción de su cubierta vegetal, lo cual está estrechamente relacionado con la escasez de materia orgánica de estos suelos (García et al., 1996). Es evidente que el mantenimiento de la capacidad productiva de estos agroecosistemas a corto y a largo plazo es de vital importancia y, para ello, es necesario que los procesos de degradación del suelo, naturales o antrópicos, se equilibren mediante la aplicación de prácticas de conservación en las que la materia orgánica tiene una importancia decisiva (Hernández, 2006).

La degradación del suelo y ecosistemas que soporta, constituye el proceso más preocupante de la geopatología del dominio mediterráneo semiárido y puede acabar en la desertificación del territorio (Bermudez 1994). España, como ya se ha indicado, es el principal país europeo afectado por este proceso, presentando el 53% de la superficie del territorio nacional, unos 270.000 kilómetros cuadrados, un nivel de degradación medio, alto o muy alto. Concretamente, en la región mediterránea, los suelos manifiestan procesos de degradación debidos a factores climáticos de marcada aridez, con altas temperaturas, escasez e irregularidad de las precipitaciones, fuerte insolación y una evapotranspiración muy intensa, que favorecen el deterioro de sus propiedades, observándose procesos irreversibles de desertificación en el medio plazo (Zalidis et al., 2002). Además, estas condiciones ambientales favorecen y aceleran los procesos de mineralización de la materia orgánica existente en el sistema, lo que les confiere una escasa capacidad de retención hídrica y provoca una disminución progresiva de la cobertura vegetal, favoreciendo los procesos de erosión (Dunjó et al., 2003).

### Factores determinantes de la degradación del suelo

La degradación y desertificación del suelo no puede ser atribuida a una causa aislada sino que dicha degradación debe ser contemplada como la convergencia de factores climáticos, geomorfológicos y antrópicos sobre un medio vulnerable que presenta la tendencia a serlo aún más por el efecto invernadero global. (Bermudez 1994). En función de su origen, podemos considerar como principales causas de la degradación los siguientes factores:

#### *Factores naturales (edafoclimáticos)*

- *Clima.* Los climas áridos, semiáridos y sub-húmedos, con largos periodos de sequía y lluvias súbitas de gran intensidad y poder de arrastre, propician los procesos de degradación del suelo favoreciendo los procesos de erosión.
- *Radiación solar.* Aumento en los valores de la reflexión en la superficie del suelo
- *Antecedentes geomorfológicos.* Influencia del relieve y de las características de la subsuperficie influenciadas por la erosión. Los suelos en pendiente son más propensos a los procesos de erosión y escorrentía.
- *Características del suelo.* Suelos pobres con marcada tendencia a la erosión y a la formación de cortezas superficiales, elevada salinidad, suelos sueltos, bajo contenido en humus.
- *Características fitogeográficas.* La cobertura vegetal juega un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura del suelo y su protección frente a procesos erosivos, por tanto, favorecerá la degradación del suelo las siguientes características: baja densidad de cobertura vegetal; desarrollo estacional; predominio de especies xerófilas y suculentas; escasa producción de biomasa
- *Características hidrológicas.* Ausencia o baja densidad de caudal de ríos y arroyos; recurrencia de inundaciones y enfangamientos,
- *Influencia de los procesos naturales de erosión hídrica y eólica.*

#### *Factores antropogénicos*

- *Deforestación* por manejo no conservacionista de montes y bosques y por incendios: talas y quemas irracionales de bosques para la explotación de su madera o expansión de las fronteras agrícolas o urbanas, que llevan a la desaparición de los árboles que protegen y mantienen la estructura del suelo.
- *Prácticas agrícolas inadecuadas:* empleo excesivo de plaguicidas y fertilizantes inorgánicos que causan el empobrecimiento biológico del suelo con la consiguiente disminución de su fertilidad; quemas de rastrojos, que si bien incrementa el contenido en ciertos nutrientes también mata microorganismos; exceso de labranza, que favorece la mineralización de la materia orgánica; utilización de maquinaria pesada que compacta el suelo disminuyendo su porosidad; cultivos intensivos.
- *Desarrollo de sistemas y métodos de riego inadecuados* que originan procesos de salinización que afectan negativamente tanto a las plantas como a la estructura del suelo.
- *Utilización de zonas marginales* en principio poco aptas para la agricultura. Técnicas de cultivo inadecuadas para terrenos con mucha pendiente (falta de curvas de nivel o terrazas)

- *Excesiva carga animal*: Sobrepastoreo, pisoteo, introducción inadecuada del ganado, que compacta el suelo al tiempo que empobrece la cubierta vegetal. Este suelo, empobrecido y desnudo estará expuesto a fenómenos erosivos. Con frecuencia la agricultura ocupa las zonas más fértiles desplazando la ganadería a zonas más marginales y semiáridas. El pastoreo produce desequilibrios con facilidad en estos suelos más frágiles provocando rápidamente la pérdida de su fertilidad.
- *Explotación insostenible de los recursos hídricos*, que desemboca en la contaminación química, la salinización y el agotamiento de los acuíferos.
- *Factores sociales y políticos*: la densidad de población, el desarrollo de canales carreteras, y complejos industriales etc.)

### Procesos de degradación

Como ya se ha indicado, el factor inicial en los procesos de degradación es, en la mayor parte de los casos, una actuación humana inadecuada, pero hay también factores naturales, tales como la topografía del terreno, el clima, la temperatura, las lluvias, etc., que propician el desarrollo de determinados procesos degradativos. Estos procesos degradativos se pueden agrupar en función del tipo de degradación que producen como (Figura 1.3) :

#### Procesos de degradación física

- Motivados por un régimen hídrico termal adverso: erosión hídrica y eólica
- Compactación
- Formación de horizontes endurecidos: costra caliza, horizonte argílico

#### Procesos de degradación química

- Desequilibrio de bases
- Contaminación
- Lateritización (proceso de acumulación de laterita o ferralita, óxido de hierro y alúmina, formando una costra dura e impermeable)

#### Procesos de degradación biológica

- Degradación de la cubierta vegetal
- Disminución del contenido de materia orgánica
- Reducción de la macro y microfauna
- Aumento de las uniones de patógenos activos al suelo.

Estos procesos pueden ocurrir de manera simultánea, puesto que unos pueden inducir a otros, o simplemente estar sometidos a diferentes factores de degradación. La conjunción de varios procesos en un mismo suelo, intensifica mucho más la pérdida de calidad del mismo.

Los principales tipos de degradación a nivel mundial son la erosión hídrica (56%), la erosión eólica (28%), la degradación química (12%) y la degradación física (4%) (GACGC, 1994).

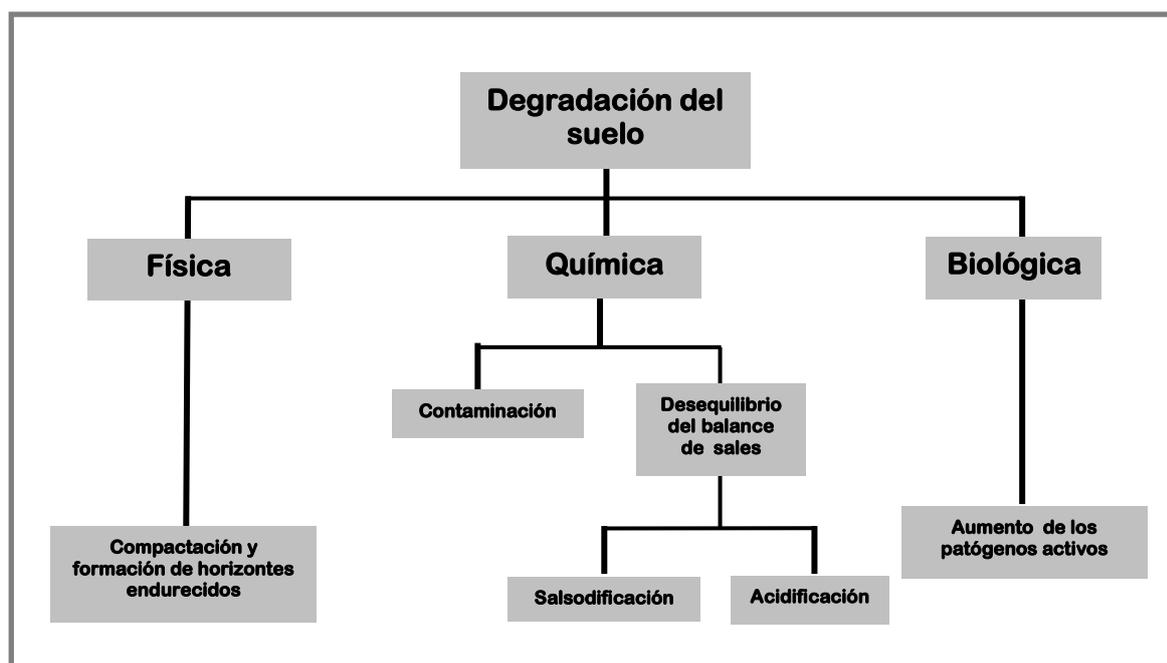


Figura 1.3. Procesos de degradación del suelo

## NECESIDAD DE INCREMENTAR EL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA DE LOS SUELOS DEGRADADOS

En zonas como la del sureste español, con un régimen climático semiárido, la progresiva degradación que sufren los suelos afectará de forma primordial a la vegetación que soportan, es decir, a la autóctona del lugar del que se trate. Si dicha vegetación desaparece, los suelos quedan entonces desprovistos de su principal barrera contra la degradación y erosión, y dichos procesos comenzarán a instalarse de forma predominante. Como parece lógico, la pérdida de cubierta vegetal conllevará una pérdida de materia orgánica en el suelo, al no existir entradas de carbono por vía natural (aportes vegetales), así como la pérdida de nutrientes como el N y el P. Todo ello dificultará, sin duda, el normal funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos de los elementos en el suelo, incidiendo negativamente sobre las condiciones biológicas del mismo (García y col., 1997, 2002, 2005). Por ello, la única vía de regenerar estos suelos y devolverles su estado "natural" de equilibrio es la revegetación. Sin embargo, los programas de revegetación con frecuencia fracasan, debido a que el suelo no está ya capacitado para crear y mantener un manto vegetal, lo que pone de relieve que es necesario regenerar la calidad y productividad del mismo antes de introducir las especies vegetales (Albaladejo & Díaz, 1990). Esto implica la necesidad de:

1. Mejorar las propiedades físicas del suelo con el fin de favorecer el desarrollo radicular, una adecuada aireación y un óptimo aprovechamiento de la limitada humedad del suelo.
2. Aumentar la fertilidad del suelo mediante un adecuado suministro de nutrientes para las plantas.
3. Reactivar la actividad microbiológica del suelo, ya que las poblaciones microbianas juegan un papel fundamental en la liberación de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas y en el mantenimiento de la estructura del suelo.

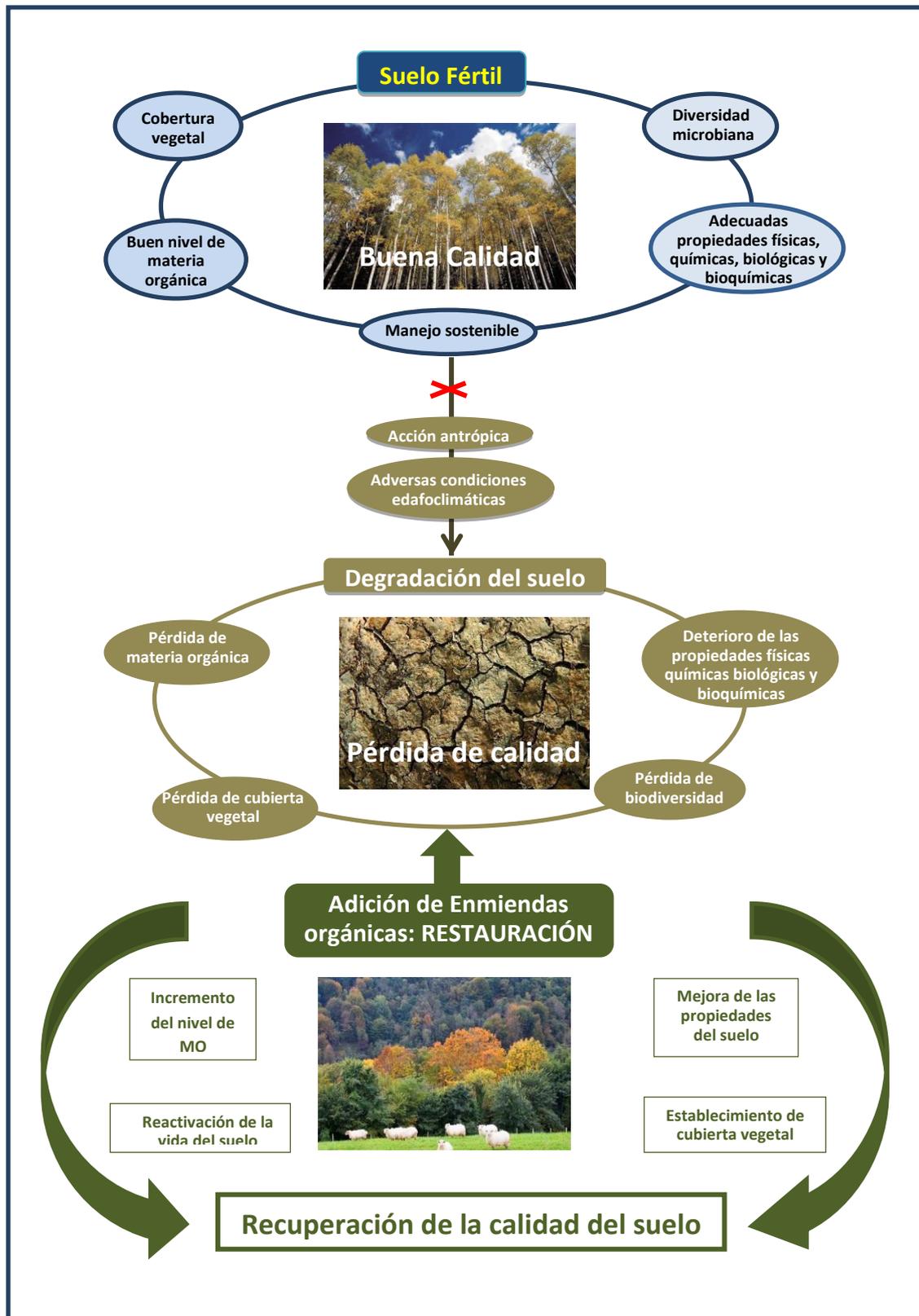


Figura 1.4. Necesidad de aportar materia orgánica para la Restauración de suelos degrad

La aportación de cantidades importantes de materia orgánica, mediante la adición de enmiendas que suplan la escasez de materia orgánica existente en estos suelos, mejorará notablemente las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo, así como el aprovechamiento del agua en el mismo, por lo que ha sido utilizada como una estrategia eficiente para la recuperación de suelos degradados y en la lucha contra la degradación del suelo (Figura 1.4).

## RESIDUOS ORGÁNICOS

Como se ha comentado anteriormente, existe una estrecha relación, ampliamente constatada, entre la pérdida de materia orgánica, la merma del potencial agrícola y el avance de la erosión, en especial cuando confluyen otros factores como la ausencia de vegetación, la pendiente del terreno y las condiciones climáticas (Stoate et al., 2001). Hoy en día, el uso de enmiendas orgánicas para restaurar, mantener o mejorar los contenidos de materia orgánica del suelo y sus funciones físicas, químicas y biológicas es una de las prácticas más comunes, eficientes y baratas (Senesi et al., 1996).

### Concepto y problemática de los residuos

La eliminación de la creciente producción de residuos orgánicos es un problema ambiental y logístico que demandan soluciones potentes e innovadoras a la vez que respetuosas con el medio ambiente y que sean económicas y viables. La creciente generación de residuos, especialmente de los residuos orgánicos urbanos, es un problema que exige una solución inmediata. Se trata pues de considerar a los residuos que generamos como un constituyente de nuestra propia actividad, y asumir nuestra responsabilidad sobre los mismos.

El ciclo natural de la materia es cerrado, de forma que con los mismos elementos químicos se hacen y deshacen toda una serie de estructuras, sin generar ningún tipo de residuo que no sea asimilable por la naturaleza. Por tanto, los sistemas naturales no generan productos residuales acumulables. La intervención humana ha roto el citado ciclo natural de la materia para obtener los bienes que necesita, ya que extrae las materias primas y después de utilizarlas y procesarlas, quedan una serie de residuos que no son asimilables pero sí acumulables.

El gobierno español, para determinar las prioridades y criterios para la gestión de residuos en España, promulgó la *Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados*, la cual sustituye al anterior régimen jurídico comunitario de residuos y a la promulgación de la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos.

Esta nueva Directiva (Directiva marco de residuos) establece el marco jurídico de la Unión Europea para la gestión de los residuos, proporciona los instrumentos que permiten disociar la relación existente entre crecimiento económico y producción de residuos, haciendo especial hincapié en la prevención, entendida como el conjunto de medidas adoptadas antes de que un producto se convierta en residuo, para reducir tanto la cantidad y contenido en sustancias peligrosas como los impactos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente de los residuos generados. Así, incorpora el principio de jerarquía en la producción y gestión de residuos que ha de centrarse en la prevención, la preparación para la reutilización, el reciclaje u

otras formas de valorización, incluida la valorización energética, y aspira a transformar la Unión Europea en una «sociedad del reciclado» y contribuir a la lucha contra el cambio climático (BOE 29 julio 2011, sec.I. pág 85650).

La definición de residuo cada vez es más precisa en su contenido y ámbito de aplicación. La larga experiencia derivada de la aplicación de la terminología contenida en la política y la normativa de la UE en materia de residuos, unida a la promulgación de la Ley 10/1998, aconseja la utilización de la definición de residuos establecida en el apartado "a" del artículo 3 de dicha Ley para identificar ese tipo de materiales. Dicha definición es: "Cualquier sustancia y objeto del cual su poseedor se desprenda o del que tenga la obligación de desprenderse, en virtud de las disposiciones legales vigentes".

Se debe tener en cuenta que los residuos orgánicos plantean también una serie de inconvenientes y restricciones cuando se aplican al suelo. Como residuos, debido a su origen y composición, pueden ser causa de problemas muy diversos tales como la acumulación de metales pesados, la presencia de contaminantes orgánicos o aumentos en la salinidad del suelo (García et al., 1994a; Antolín et al, 2005); pero además, como compuestos orgánicos, también deben ser tenidos en cuenta otros factores muy importantes como la estabilidad o tasa de descomposición de la materia orgánica y la madurez o grado de descomposición de las sustancias orgánicas fitotóxicas (Wu et al., 2000; Wang et al., 2004).

### **Los residuos orgánicos urbanos como fuente de materia orgánica**

Los residuos orgánicos urbanos (lodos de depuradora y los residuos orgánicos de origen doméstico) presentan un elevado contenido de materia orgánica, lo que posibilita su empleo como fuente de materia orgánica para el suelo, ya que son baratos y frecuentes en el suministro. Esto plantea una solución sinérgica de dos problemas, que pasa a través del uso de los residuos orgánicos urbanos como una estrategia para la recuperación de la calidad del suelo (Lalande et al, 2000; Masciandaro et al, 2000).

El uso de residuos orgánicos urbanos se ha demostrado que es muy adecuado como una estrategia para la mejora de las propiedades químicas, bioquímicas y microbiológicas del suelo en el corto y medio plazo (Ros et al, 2003; Randhawa et al, 2005; Tejada et al., 2009). Los compost de estos residuos orgánicos constituyen una importante enmienda orgánica del suelo contribuyendo a la formación de humus estable (Tidsell y Breslin, 1995) y a la mejora de la fertilidad del suelo (Anikwe & Nwobodoko, 2002; Pigozzo et al, 2006; Pérez et al, 2007).

El objetivo sería mejorar la fertilidad del suelo al tiempo que se eliminan residuos, de otro modo no deseados, de una manera racional y respetuosa con el medio ambiente. Esto, al mismo tiempo, favorecería el secuestro de carbono mediante el aumento de la reserva de carbono estable en el suelo, ayudando a mitigar los efectos negativos derivados de las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera (Swift, 2001). El aumento de la capacidad de un suelo para la fijación de carbono es un medio eficaz, a medio plazo de luchar contra la emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, contribuyendo de esta manera a aliviar el impacto ambiental del calentamiento global (Swift, 2001).

Por esto, podemos afirmar que mediante el reciclaje de residuos a través del aprovechamiento de las sustancias contenidas en ellos, o bien de su transformación en otras, se puede contribuir a aliviar los

problemas planteados, disminuyendo las dificultades de su eliminación, y facilitando un mejor aprovechamiento de los recursos naturales.

De entre todos los tipos de residuos orgánicos que hoy en día se generan, los residuos de origen urbano presentan una de las incidencias más significativas. Se producen diariamente, y de forma puntual, lo cual es una particularidad que les hace merecedores de un tratamiento especial entre todo el conjunto de residuos existentes (García, 1990). Además, su vertido incontrolado da lugar a un tipo de contaminación que difiere de la generada por emisiones gaseosas o líquidas. Su principal característica es la agresión a la estética del entorno y la ocupación desordenada del terreno, inutilizándolo para otros usos. Además presentan una característica particular y es su facilidad para transferir al medio otras formas de contaminación. Aun cuando el residuo que más problemas parece plantear es el de origen doméstico, conviene indicar que, en volumen, su cantidad es similar al de los residuos industriales, pero con la salvedad de que para estos últimos es obligación de las empresas que los generan el retirarlos de forma adecuada, mientras que para los primeros esta obligación recae en los municipios.

Entre los diversos residuos orgánicos que se producen, son los residuos orgánicos urbanos los que nos interesan de manera particular para nuestros objetivos. Generalmente, se entiende por residuos urbanos los generados por cualquier actividad en los núcleos de población o en sus zonas de influencia. La naturaleza de dichos residuos es muy variada debido a la diversidad tecnológica e industrial que se centra en torno a las ciudades.

El análisis comparativo para el año 2009 dentro del marco europeo (UE-27), situó a España, con un valor de 547 kg/hab, en novena posición en generación de residuos orgánicos de origen doméstico por habitante, por delante de países como Bélgica (491 kg/hab), Portugal (488 kg/hab), Suecia (485 kg/hab), Finlandia (481 kg/hab) o Bulgaria (468kg/hab), entre otros.

Se pueden citar como residuos orgánicos urbanos los siguientes:

1) *Residuos orgánicos de origen doméstico*: principalmente de origen doméstico aunque también incluyen los procedentes de mataderos, mercado de alimentación, comercios, centros sanitarios, obras, etc. La fracción orgánica de estos residuos puede ser reciclada para su uso como enmienda orgánica de suelos, tanto frescos como compostados.

2) *Lodos de depuradora urbana*: subproductos generados en los tratamientos de depuración de aguas residuales urbanas.

Siendo estos materiales los que se van a emplear como enmienda orgánica en el trabajo de investigación de esta Tesis Doctoral, vamos a describir de una forma más detallada y extensa sus características, producción, gestión y las normativas legales vinculadas a cada tipo de residuo.

## **RESIDUOS ORGÁNICOS URBANOS DE ORIGEN DOMÉSTICO**

### **Origen y tratamiento de los residuos orgánicos de origen doméstico**

Los residuos orgánicos de origen doméstico son un problema en las grandes ciudades debido a su producción diaria y continuada. La génesis y composición de estos residuos depende de numerosos

factores entre los que están el clima, nivel de vida, tipo de sistema de recogida de la basura, y la estación del año. Además, la ley de Envases y Residuos de Envase y la recogida selectiva de basuras, permite obtener un residuo orgánico más fácil de reciclar, lo cual repercute de manera directa sobre el concepto de los sistemas de tratamiento de los mismos.

El conocimiento de la composición de estos residuos orgánicos tiene gran importancia para la toma de decisiones en la elección del destino que se le va a dar a los mismos. La fracción orgánica de estos residuos constituye la materia prima para la obtención de una enmienda orgánica que va a poder aplicarse a los suelos, y que es obtenida después de un proceso de estabilización a través del compostaje, previa separación de las impurezas contenidas en los mismos (vidrios, metales, plástico, etc.). El reciclado de dicha fracción en los agrosistemas proporciona una materia orgánica de la cual son deficitarios, además de incorporar nutrientes de importancia agronómica.

Como puede observarse en la Figura 1.5 los residuos orgánicos de origen doméstico engloban una serie de productos, de los cuales la materia orgánica, restos de comida, de jardinería y otros materiales fermentables constituyen el principal componente, el cual tiende a disminuir en las sociedades más desarrolladas. Vemos también como la fracción correspondiente a papel, cartón, periódicos, papel en general, cajas y envase representa un alto porcentaje por haber sufrido un incremento en los últimos años, reconociéndose la importancia de su reciclado posterior.



Figura 1.5: Proporción media de los componentes de los residuos orgánicos de origen doméstico.

### Destino de los residuos orgánicos de origen doméstico

Los residuos orgánicos de origen doméstico pueden seguir distintas vías de eliminación o aprovechamiento:

*Vertido controlado:* consiste en la deposición y compactación de los residuos orgánicos domésticos en un terreno adecuado e impermeabilizado al efecto. En la ubicación del terreno se tendrán en cuenta principalmente las características geológicas e hidrográficas del mismo para evitar, en la medida de lo posible, los riesgos de contaminación de acuíferos por los lixiviados que se produzcan.

*Incineración:* este método consiste en quemar las basuras domésticas de forma controlada de tal manera que los productos obtenidos queden esterilizados y los gases sean inocuos. Es un sistema caro y precisa

además de un vertedero anexo. Debe realizarse con recuperación de energía con el objeto de valorizar el residuo.

*Reciclaje:* es un proceso por el cual se recuperan de forma directa o indirecta determinados componentes de estos residuos. De forma directa obtenemos vidrio, papel, metales, etc. y de forma indirecta materia orgánica estabilizada (ej. compostaje), biogás si se produce digestión anaerobia, o energía eléctrica con la cogeneración. De este modo se consigue, por un lado, un ahorro de recursos naturales y por otro, una disminución del volumen total de los residuos a eliminar, con el consiguiente ahorro energético y beneficio medioambiental.

## **LODOS DE DEPURADORA**

### **Origen y tratamiento de los lodos de depuradora**

Una planta depuradora de aguas residuales consta fundamentalmente de dos grandes líneas de tratamiento: la correspondiente a la depuración de aguas y la del tratamiento de los lodos que se generan en las operaciones de decantación; esta última constituye una parte fundamental de las estaciones de depuración, donde se genera un subproducto que recibe la denominación de lodos de depuradora que se definen como “material sólido heterogéneo cuya composición no sólo depende del agua residual, sino también de la tecnología empleada y de la época del año” (Terry et al, 1979).

La composición de los lodos es variable dependiendo de la calidad de las aguas y los vertidos, además de los tratamientos que hayan recibido; normalmente, están integrados por el conjunto de elementos que componen las aguas brutas de entrada, junto con los aditivos químicos empleados en el tratamiento y la masa bacteriana que participa en el proceso de depuración. Además, contienen un porcentaje elevado en agua (50-80%), lo cual constituye una desventaja para su transporte, aunque en la actualidad se están implantando nuevas tecnologías de secado que disminuyen considerablemente estos contenidos.

La problemática de estos residuos reside en los elevados volúmenes de producción que se generan, sin olvidar las consecuencias medioambientales y sanitarias que conlleva su inadecuada gestión; además, una vez extraídos de la planta de depuración los lodos deben someterse a un tratamiento basado en la estabilización del material mediante la activación de la descomposición de la materia orgánica y distintas operaciones de espesamiento, acondicionamiento y deshidratación para facilitar su manejo, transporte y almacenamiento.

Por otra parte, por sus características son un recurso importante de materia orgánica y de elementos fertilizantes, lo que les hace ser una fuente potencial de nutrientes para su utilización agrícola. Aproximadamente, el 50% de su peso en seco corresponde a materia orgánica, aportando además cantidades variables de nitrógeno (1-7%), fósforo (1-5%), potasio (0,3-3%) y micronutrientes con distinto grado de disponibilidad para las plantas (Soler et al., 1997).

### **Destino de los lodos de depuradora**

Como destinos más utilizados para estos materiales hasta el momento se pueden citar los siguientes:

1) *Incineración*. Se trata de un tratamiento caro debido a su propia tecnología y a la necesidad de controlar perfectamente las emanaciones gaseosas y cenizas volátiles para cumplir los límites de emisión estipulados por la legislación vigente para las plantas de tratamiento (*Directiva 2000/76/CE, relativa a la incineración de residuos*). Vemos así que si los residuos a incinerar no son peligrosos, y pueden tener algún tipo de aprovechamiento, este sistema debe ser considerado como un desaprovechamiento de recursos.

2) *Depósito en vertederos controlados*. Este método de eliminación impide aprovechar los recursos contenidos en los lodos de depuradora además, la legislación europea establece restricciones al depósito de materia orgánica en vertederos (*Directiva 99/31/CE, relativa al vertido de residuos*)

3) Posibilidad de *reciclar* los lodos mediante su aplicación en los suelos como fuente de materia orgánica, de forma racional y coherente para no provocar riesgos innecesarios.

## **RECICLAJE EN EL SUELO DE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS URBANOS. IMPACTO AMBIENTAL**

La utilización de los residuos orgánicos urbanos (la fracción orgánica de los residuos de origen doméstico y los lodos de depuración de aguas residuales), tanto en agricultura como en programas de recuperación de suelos degradados, es de interés debido, por una parte, a que es un modo de aprovechar la elevada proporción de materia orgánica, rica en macro y micronutrientes que contienen, y por otra, supone una vía racional de eliminación de dichos residuos, con el consiguiente beneficio medioambiental, siempre que dicho uso se realice de forma eficaz y controlada. Como característica principal está la liberación de nutrientes de forma gradual en función de la progresiva mineralización de la materia orgánica presente en los residuos, manteniendo así la fertilidad del suelo (Ayuso et al., 1996).

Sin embargo, el reciclado de estos materiales en el suelo puede provocar un impacto ambiental negativo si no se emplean de manera adecuada, debido a la presencia en ellos de compuestos tóxicos. Principalmente cabe destacar el mal olor, el aporte de metales pesados, de microorganismos patógenos, exceso de nutrientes y deficiencia o demanda de los mismos, y la salinidad.

1) *Metales pesados*. Los metales pesados pueden formar parte de la composición de los residuos orgánicos urbanos, principalmente en los lodos, en función, sobre todo, de la procedencia y origen de los mismos. La importancia de éstos a la hora de evaluar las posibilidades de utilización de estos residuos viene dada por su posible acumulación en el suelo y su absorción y almacenamiento en los tejidos de las plantas, quedando así incluidos en la cadena alimentaria de los animales y del ser humano. El grado de peligrosidad de los metales pesados va ligado a dos propiedades principales como son su toxicidad y su persistencia en el suelo (Walter, 1992; Moreno, 1997), aunque cabe destacar también la movilidad que presentan en el mismo. El pH es uno de los factores primordiales en este sentido ya que la movilidad de los metales aumenta a medida que el pH disminuye.

La Ley 22/2011 de 28 de julio de Residuos y suelos contaminados se aprobó en el año 2011. Esta ley incorpora al ordenamiento jurídico español la Directiva comunitaria 2008/98/CE y actualiza la legislación española. Apuesta por la prevención, maximizando el aprovechamiento de los recursos contenidos en los residuos y la disminución de sus impactos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente. Es

importante señalar que esta Ley presenta algunas carencias en relación a fomentar y plantear sistemas alternativos a la gestión actual de residuos.

Por otra parte, la Directiva 86/278/CEE de 12 de Junio, relativa a la protección del medio ambiente y, en particular de los suelos, en la utilización de los lodos con fines agrícolas regula este tipo de eliminación. Esta directiva, que fue transpuesta al Ordenamiento Jurídico Español mediante el *Real Decreto 1310/1990*, de 29 de octubre (BOE 262, 1990), desarrollado por la *Orden Ministerial de 26 de octubre de 1993* (BOE 265, 1993), establece las condiciones en que podrán ser aplicados los lodos de depuradora a los suelos agrícolas, condiciones tendentes a la protección del posible efecto nocivo sobre las aguas, el suelo, la vegetación, los animales y el hombre. Si bien, todavía existe un vacío legal en la regulación de los contenidos máximos de compuestos orgánicos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, fenoles y otros químicos de naturaleza tóxica que están presentes en los lodos de depuradoras.

Para la incorporación de lodos de depuradora sin compostar al suelo existen unos límites de contenidos máximos más elevados que para compost (Tabla 1). Para éstos se han sugerido los mismos valores que para lodos, multiplicados por un factor (0,2-0,3), adaptando así los niveles de metales pesados en compost con los establecidos para los lodos por la UE.

**Tabla 1. Valores límite de concentración para metales pesados en suelos, lodos y compost. (Directiva 86/278/EEC)**

	Valores límites en el suelo (mg Kg <sup>-1</sup> )		valores límites en lodos (mg Kg <sup>-1</sup> )		valores límites en compost (mg Kg <sup>-1</sup> )
	pH<7	pH>7	pH<7	pH>7	
Cadmio (mg/Kg)	1	1.5	20	40	10
Cobre (mg/Kg)	50	100	1	1.75	450
Cromo (mg/Kg)	75	100	1	1.5	400
Mercurio (mg/Kg)	0.5	1	16	25	7
Níquel (mg/Kg)	30	70	300	400	120
Plomo (mg/Kg)	50	100	750	1.2	300
Zinc (mg/Kg)	150	200	2.5	4	1100

2) *Microorganismos patógenos*. La presencia de patógenos en ciertos residuos condiciona su aplicación. Por ello, es necesario realizar procesos de acondicionamiento que permitan controlar y eliminar este riesgo de contaminación. Existen diversas metodologías para sanear desde este punto de vista los residuos orgánicos: secado térmico, estabilización con cal, otros procesos de estabilización como el compostaje, etc.

3) *Sustancias tóxicas*. Consideramos sustancias tóxicas a aquellos compuestos orgánicos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH<sub>s</sub>), bifenilos policlorados (PCB<sub>s</sub>), plaguicidas fosforados, fenoles y otros compuestos orgánicos. La legislación Española no incluye limitaciones específicas con respecto a este tipo de sustancias presentes en los lodos, aunque si existe la legislación que regula el vertido al suelo de sustancias consideradas peligrosas (Ley 22/2011). Los materiales orgánicos de origen urbano cuentan también con sustancias tóxicas o fitotóxicas más lábiles que las aquí indicadas; este tipo de sustancias deben desaparecer del producto con los sistemas de estabilización que pueden ser aplicados.

4) *Demanda o exceso de nutrientes*. La aplicación de algunos residuos orgánicos al suelo puede producir una competencia por determinados nutrientes entre los microorganismos y las plantas, además de una posible lixiviación de los nitratos hacia los acuíferos.

5) *Salinidad*. Los residuos domésticos, especialmente si han sido compostados, pueden presentar un elevado contenido de sales, lo que puede influir negativamente sobre el sistema suelo-planta al ser utilizados como enmiendas del suelo. Entre los efectos negativos de la salinidad destacan: disminución de la capacidad de germinación de las semillas, inhibición del crecimiento de las plantas y empeoramiento de la estructura del suelo. Por ello, cuando estos productos se aplican al suelo, la problemática de la salinidad que introducen en el mismo debe ser considerada y tenida en cuenta para estimar la dosis de aplicación.

### **Saneamiento de residuos orgánicos mediante su estabilización (Compostaje)**

Como ya hemos comentado, los materiales orgánicos como los residuos domésticos, contienen sustancias fitotóxicas, y materia orgánica lábil, capaz de provocar en ocasiones en el suelo, competencia entre los microorganismos y la planta por algún nutriente como el nitrógeno. Tampoco hay que olvidar que los residuos orgánicos urbanos, en particular los lodos de depuración de aguas residuales, también incorporan microorganismos patógenos no deseables. Todos estos aspectos, derivados de ser materiales orgánicos no estabilizados, son subsanables si se realizan adecuados procesos de estabilización de los mismos. Los procesos de compostaje son, actualmente, los más empleados para conseguir la mencionada estabilización. El paso del material por distintas fases: fase de mineralización (fase mesófila y fase termófila) y la fase de maduración, conseguirá, sin duda, destruir las sustancias fitotóxicas y los microorganismos patógenos, garantizando su saneamiento, y originando, a su vez, una materia orgánica más estable y humificada y útil para ser empleada como fertilizante orgánico en los suelos (García et al., 1992). El saneamiento aludido debe de considerarse prioritario e imprescindible cuando el uso del enmendante orgánico sea en agricultura.

El compostaje se define como: un proceso biooxidativo controlado en el que intervienen numerosos y variados microorganismos, y que requiere una humedad adecuada y sustratos orgánicos heterogéneos en estado sólido. Implica el paso por una etapa termófila y una producción temporal de fitotoxinas, dando al final como productos de los procesos de degradación: agua, dióxido de carbono y una materia orgánica estabilizada, libre de sustancias fitotóxicas y patógenos, y dispuesta para ser usada.

En este proceso se distinguen dos etapas: la primera de mineralización de la fracción orgánica, en la que la actividad microbiana es máxima debido a la abundancia de compuestos fácilmente biodegradables y en la que se destruye gran parte de la materia orgánica lábil; en ella se distingue una fase inicial mesofílica seguida de una fase termofílica en la que las altas temperaturas alcanzadas contribuirán a la destrucción de patógenos. La segunda etapa es de maduración o estabilización del material, que se corresponde con la fase de enfriamiento, en la que la actividad de los microorganismos es menor, predominando la humificación, con reacciones de policondensación y polimerización y en la que se forma un producto similar al humus que se conoce con el nombre de compost (Figura 1.6).

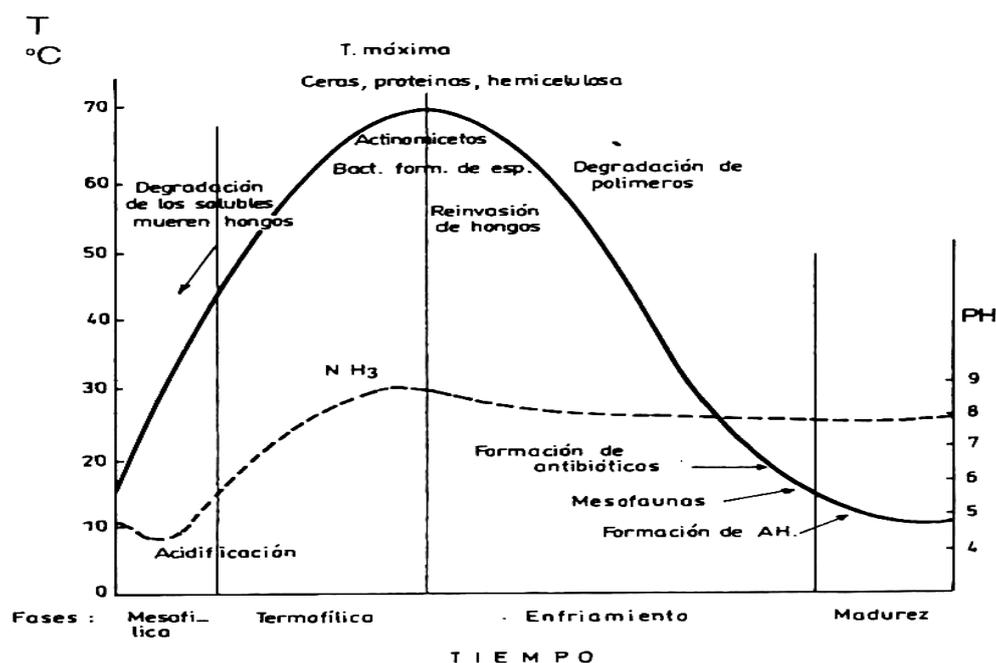


Figura 1.6. Evolución de la temperatura y pH durante las diferentes etapas del compostaje (Dalzell et al., 1981).

El compostaje precisa de un control para conseguir un producto final apto para uso como enmendante orgánico. Los parámetros que se deben controlar durante el proceso son:

- 1) *Humedad*: es uno de los principales factores a controlar ya que, si es excesiva, el agua desplazará al aire de los espacios intersticiales y se desencadenará una fermentación anaerobia. Si por el contrario la humedad es baja, cesa la actividad microbiana. Los niveles óptimos de humedad se sitúan entre el 40-60%.
- 2) *Temperatura*: su variación controla la sucesión de distintas poblaciones microbianas. La temperatura elevada permite la destrucción de los microorganismos patógenos y de las semillas de malas hierbas. Sin embargo, la temperatura máxima no debe sobrepasar los 70°C ya que por encima de esta temperatura no solo se destruyen los microorganismos patógenos sino también los microorganismos responsables del proceso de compostaje.
- 3) *Aireación*: su importancia es clara por tratarse de un proceso de fermentación aerobia y se consigue mediante el volteo periódico de las pilas o por el insuflado de aire forzado. En ausencia de aire se obtiene un material no aceptable y una liberación de malos olores.

## EFFECTOS DE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS SOBRES SUELOS Y PLANTAS

De forma general, la adición de enmiendas orgánicas puede influir positivamente en las propiedades físicas del suelo mejorando su estructura, incrementando la formación y estabilidad de agregados, y la capacidad

de retención hídrica del suelo (Stevenson, 1982; Roldán et al., 1996). Este hecho disminuye la escorrentía, evitando el lavado de nutrientes, y mejora el desarrollo vegetal (García-Orenes et al., 2005).

Las poblaciones microbianas se verán positivamente influenciadas por el mayor contenido de fuentes de energía y nutrientes en el suelo, aumentando su desarrollo y actividad, lo que tendrá efectos positivos sobre el crecimiento vegetal. De esta manera, se cierra un ciclo de fertilidad en el suelo.

La mejora en las propiedades físicas, incrementará el desarrollo vegetal (que a su vez aporta restos orgánicos), influyendo positivamente en la microbiología del suelo. A más largo plazo, el desarrollo vegetal afecta positivamente a la estructura del suelo: las hifas y mucílagos de hongos son en gran parte responsables de la formación de microagregados.

De manera más específica, se exponen a continuación algunas de las propiedades que pueden verse mejoradas con la aplicación de enmiendas orgánicas a los suelos:

### **Efecto sobre las propiedades físicas**

La materia orgánica de los residuos orgánicos reduce la densidad aparente de los suelos (Mbagw, 1992), hecho atribuible a la baja densidad de estos productos y a su tendencia a aumentar el espacio poroso. Influye positivamente sobre la formación y estabilidad de los agregados en el suelo (Lax et al., 1994; Caravaca et al., 2002a; García-Orenes et al., 2005; Lacherveque et al., 2006), aunque este efecto disminuye a medida que se mineraliza la materia orgánica incorporada (Pagliari et al., 1981).

La comunidad microbiana incorporada al suelo con la enmienda orgánica también juega un papel importante en la evolución de los agregados (Bronick y Lal, 2005), ya que controla la degradación de la materia orgánica, que provee al suelo con compuestos orgánicos que intervienen en la formación de agregados (Abiven et al., 2009). Dentro de la comunidad microbiana del suelo, se ha observado que los microorganismos fúngicos son los responsables de la formación de macroagregados por medio de sus hifas (Jiang et al., 2011) y de proteínas tales como glomalina (Rillig et al., 2002). En contraste, el papel de las bacterias se ha considerado más importante en la estabilización de los microagregados. Las bacterias encuentran protección en los poros de los microagregados y contribuyen a su estabilización con polisacáridos tales como mucílagos que impiden la dispersión de la arcilla en los microagregados (Oades, 1984).

El tipo de enmienda orgánica incorporada al suelo también influye en la agregación del suelo. Los residuos frescos suministran diferentes tipos de compuestos orgánicos, tales como polisacáridos, promoviendo así la formación inicial de los agregados (Roldán et al., 1996). Por el contrario, los residuos compostados ejercen influencia a más largo plazo debido al aporte de sustancias húmicas (Cuevas et al., 2006; Abiven et al., 2009).

La riqueza en materia orgánica de los residuos orgánicos y su carácter coloidal mejora el balance hídrico del suelo, al aumentar la capacidad de retención hídrica, lo que permite al suelo resistir mejor los períodos de sequía (Mabuhay et al., 2006).

### **Efecto sobre las propiedades físico-químicas**

Los residuos orgánicos al ser incorporados al suelo ejercen un efecto tampón debido a la presencia de iones  $\text{Ca}^{+2}$  y de sales básicas (Hernando, 1988). La capacidad de cambio catiónica aumenta en suelos tratados con materiales orgánicos (Weber et al., 2007). La capacidad de intercambio catiónico es una propiedad del suelo de gran importancia debido a que:

- Controla la disponibilidad de nutrientes para las plantas.
- Interviene en procesos de floculación-dispersión de las arcillas, por tanto, en el desarrollo de la estructura y estabilidad de agregados.
- Determina el papel del suelo como depurador natural, permitiendo la retención de elementos contaminantes incorporados al suelo.

Cualquier enmienda que potencie la formación de humus, producirá un aumento significativo de la capacidad de cambio catiónico del suelo ya que el humus posee una capacidad de cambio catiónica que es de 3 a 6 veces superior a la de las arcillas del suelo (Harada & Inoko, 1975). Algunos autores han observado que la capacidad del suelo para retener cationes aumentaba sensiblemente con la dosis de material orgánico adicionada (Díaz, 1992; López-Pineiro et al., 2007).

### **Efecto sobre las propiedades químicas**

El efecto más significativo que se produce sobre un suelo cuando se le adicionan residuos orgánicos es el aumento de su contenido en materia orgánica. Mediante la incorporación de la materia orgánica al suelo se introducen también los nutrientes que ésta contiene, liberándose de forma gradual durante el proceso de descomposición de la misma.

Tanto los compost como los lodos contienen compuestos orgánicos con un grado elevado de policondensación estructural, similar al encontrado en las sustancias húmicas, por lo que su aplicación a los suelos va a afectar al contenido, composición y propiedades de su materia orgánica, y particularmente a las fracciones húmicas (Senesi et al., 1996). Adani et al. (2006) observaron que el contenido de ácidos húmicos, fúlvicos y huminas de un compost vegetal influía en la composición de la materia orgánica de un suelo enmendado con dicho material. Asimismo, Brunetti et al. (2005) observaron un aumento en el contenido de ácidos húmicos tras la incorporación al suelo de residuos orgánicos procedentes de restos de oliva. Tanto los ácidos húmicos como los fúlvicos tienen la capacidad de formar complejos con cationes metálicos presentes en la matriz del suelo, siendo estos últimos los que por sus características moleculares tienen mayor movilidad y capacidad para transportar metales, formando complejos de gran estabilidad (Pérez, 1998), por lo que ambas fracciones constituyen ligandos de gran reactividad química que contribuyen a regular la concentración de elementos traza en la solución del suelo (Stevenson & Fitch, 1986), desempeñando un papel importante dentro de los equilibrios funcionales del ecosistema.

Los residuos orgánicos urbanos aumentan los contenidos en macro y micronutrientes del suelo, debido a que éstos se presentan en cantidades importantes en los citados residuos (Ayuso et al., 1996; Tejada et al., 2006; O'Dell et al., 2007). La mineralización del nitrógeno orgánico contenido en estas enmiendas está

determinada tanto por factores físico-químicos como biológicos, por lo que la estimación de la carga de nitrógeno que se debe aplicar al suelo para una correcta fertilización del cultivo, debe considerar los procesos a los que está sometido este elemento en el suelo, siendo difícil modelizar su dinámica durante el ciclo vegetativo del mismo. Aproximadamente entre un 90-95% del nitrógeno en estas enmiendas se encuentra en forma orgánica, requiriendo la participación activa de los microorganismos del sistema para su mineralización (García, 1990).

La disponibilidad para la planta del fósforo es buena, tanto para los compost de residuos orgánicos de origen doméstico como para los lodos de depuradora, siendo mayor para estos últimos, en los que su eficiencia se puede equiparar a la ofrecida por los fertilizantes minerales fosforados (Ayuso et al., 1992). Los lodos presentan valores insuficientes en potasio, aunque su disponibilidad para los cultivos es inmediata, mientras que los niveles de calcio y magnesio son muy variables (Soler, 1998). En cambio, los compost de residuos orgánicos de origen doméstico presentan una capacidad fertilizante elevada en potasio asimilable (Nogales et al., 1995), equiparando su eficiencia con los fertilizantes potásicos inorgánicos (He et al., 1992; Molina et al., 1996).

### **Efectos sobre las propiedades microbiológicas y bioquímicas**

Las poblaciones microbianas del suelo están constituidas por un gran número de animales (microfauna) y de vegetales microscópicos (microflora). Al conjunto de unos y otros se le denomina microorganismos.

La incorporación de estos residuos orgánicos a los suelos va a producir una reactivación de sus propiedades microbiológicas y bioquímicas, estimulando la proliferación microbiana y su actividad metabólica, como consecuencia de los aportes de nuevas fuentes lábiles de carbono que van a servir como sustrato a la biota del suelo (Ros et al., 2003; Tejada et al., 2006). Este aumento se traduce a su vez en un incremento de las enzimas y metabolitos en el suelo, que van a actuar sobre sustratos específicos (Nannipieri et al., 1990). Las enzimas son responsables de la mayor parte de las reacciones que intervienen en los procesos de mineralización e inmovilización de los nutrientes en el suelo y por tanto están en relación con la disponibilidad de los mismos para la planta (Perucci, 1990).

Algunos de los metabolitos liberados por los microorganismos (tipo vitaminas y/o aminoácidos, etc.) o moléculas de bajo peso molecular procedentes de la mineralización de la materia orgánica (Albuzio et al., 1989) pueden influir de forma positiva y directa sobre el crecimiento vegetal. También es importante indicar que parte de estas enzimas quedarán protegidas de la degradación e inactivación, al quedar inmovilizadas por la fracción húmica de la materia orgánica incorporada, mediante formación de complejos tipo enzima-humus (Nannipieri et al., 1990; Ceccanti & García, 1994; Benítez et al., 2005; Moreno et al., 2007).

### **Efectos de los residuos orgánicos sobre las plantas**

Existe gran cantidad de trabajos de investigación, cuyos resultados demuestran que la aplicación de residuos orgánicos urbanos produce una mejora en el rendimiento agrícola. Así, se ha constatado que los suelos enmendados con lodos residuales mejoran el crecimiento y producción de los cultivos vegetales (Golabi et al., 2007; López-Pineiro et al., 2007). Sin embargo, tampoco faltan las excepciones en este

mismo sentido. De hecho, aplicaciones continuadas de lodos sobre las suelos de cultivo pueden producir una acumulación de metales pesados a niveles tóxicos para las plantas (Sánchez-Martín et al., 2007; Singh & Agrawal, 2008). La acumulación de metales pesados en los cultivos puede suponer un riesgo para la salud humana, lo que ha llevado a imponer límites, como ya se ha indicado, sobre la cantidad y frecuencia de la aplicación de los lodos sobre las los suelos de cultivo. No obstante, algunos estudios han demostrado una reducción del contenido en metales pesados biodisponibles en el suelo mediante la aplicación de enmiendas orgánicas (O'Dell et al., 2007).

*Todo lo expuesto lleva a pensar que, en primer lugar, hay que ser conscientes de que las enmiendas orgánicas deben ir encaminadas a mejorar la calidad del suelo donde se adicionan, y nunca a ser un método encubierto de eliminación irracional de residuos. Es necesario partir de materiales iniciales de calidad, exentos de compuestos no deseables como los metales pesados. Interesa señalar también la necesidad de ejercer un adecuado control sobre la adición de enmendantes orgánicos al suelo, con el fin de evitar riesgos de todo tipo. Cuando el uso de estos productos es para agricultura, los controles deben de ser sumamente exhaustivos, pues de esta manera podremos estar protegidos frente a acciones no deseadas que pueden repercutir incluso en la salud humana y en la contaminación ambiental. Si el empleo de las enmiendas orgánicas es en programas de rehabilitación de suelos degradados o reforestación, como es el caso de esta Tesis Doctoral, el nivel de permisividad puede ser algo mayor que en el caso del empleo en agricultura, pero siempre tomando las precauciones medioambientales oportunas. Podemos concluir, que el reciclado en el suelo de materiales orgánicos es una biotecnología capaz de aportar beneficios a dicho suelo, siempre que la adición de esos materiales orgánicos se realice de forma racional y con control. Si es así, la aplicación de enmiendas orgánicas puede servir como estrategia para combatir fenómenos de degradación y desertificación de suelos, en particular en zonas semiáridas con escaso contenido en materia orgánica.*

---

# OBJETIVOS

---



## OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La creciente generación de residuos, y muy en particular los residuos orgánicos de origen urbano, plantea una problemática que es evidente que nuestra sociedad debe atender de forma inmediata, ofreciendo a los mismos una salida adecuada, y valorizándolos en su justa medida. Junto a esta problemática nos encontramos con la derivada del elevado nivel de degradación que presentan los suelos de amplias zonas de España y sur de Europa, debido, fundamentalmente, a acciones antrópicas agresivas que se han producido durante años, y a la adversa climatología existente en estas zonas (clima semiárido), siendo un factor clave en esta degradación el escaso nivel de materia orgánica (MO) de estos suelos. Puesto que en amplias zonas de España (y de muchos de los países europeos, en particular en los del sur de Europa) escasean las fuentes de MO tradicional (turberas y estiércoles), interesa plantearse la posibilidad de aunar las dos problemáticas mencionadas (Residuos Orgánicos y Suelos), con la finalidad de intentar resolver ambas. La solución pasaría por emplear como fuente de MO para los suelos aquella contenida en los residuos orgánicos, en particular los de origen urbano dado que son económicos y se producen de forma puntual, consiguiendo de este modo, por una parte, mejorar la fertilidad de estos suelos, y por otra, eliminar racionalmente los residuos mediante su reciclado en los mismos. Este tipo de actuación, al favorecer el secuestro de carbono y la creación de un "pool" de carbono estable en el suelo, puede contribuir, asimismo, a mitigar los efectos negativos derivados de las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. La recuperación de suelos y ecosistemas degradados tiene, por tanto, un alto potencial para el secuestro de carbono en el suelo.

Los estudios realizados hasta el momento apoyan que la adición de residuos urbanos puede ser una buena estrategia para la recuperación de suelos degradados, sin embargo, poco se sabe sobre la incidencia de la dosis y del grado de estabilización de la MO de estos residuos en el nivel de recuperación de estos suelos, y en la dinámica y nivel de fijación en el suelo de esta materia orgánica exógena.

Por tanto, las **premisas** de partida de este trabajo de Tesis Doctoral han sido las siguientes:

1. La eliminación de la creciente producción de residuos urbanos supone un reto ambiental y logístico de gran alcance que demanda soluciones innovadoras y respetuosas con el medio ambiente que sean al mismo tiempo económicamente viables.
2. Existe un grave problema de degradación y desertificación a nivel mundial, particularmente en los suelos de zonas áridas y semiáridas, siendo un factor común en estos suelos degradados la escasez de materia orgánica, la cual, produce una estructura desfavorable del suelo favoreciendo la erosión y dificultando el crecimiento de una vegetación ya de por sí escasa.
3. La complementariedad entre la elevada producción de residuos urbanos ricos en materia orgánica, por una parte, y la escasez de materia orgánica de los suelos degradados, por otra, propicia el planteamiento de una solución sinérgica de los dos problemas planteados, que pasa por el empleo de los residuos orgánicos urbanos como estrategia para la recuperación de la calidad de estos suelos.
4. Esta materia orgánica exógena puede contribuir a la fijación de carbono, tanto por el incremento del "pool" de carbono estable del suelo, como por la fijación de C en la vegetación que podrá desarrollarse en los suelos recuperados.

5. Con vista a fijar en el suelo la mayor cantidad posible de carbono mediante la adición de enmiendas orgánicas, interesaría que el empleo de éstas en la recuperación de suelos degradados se pudiese realizar a dosis lo más elevadas posible. Sin embargo, hay que tener muy en cuenta que si bien los efectos beneficiosos de la adición de compuestos orgánicos sobre las propiedades del suelo han sido suficiente establecidos, no hay que olvidar los efectos negativos que pueden derivarse de la adición de estos residuos al suelo, particularmente a dosis elevadas. Se hace pues, necesario el establecimiento de la cantidad máxima de residuo que permita la recuperación de los suelos degradados sin ejercer efectos negativos sobre la vida microbiana del suelo y el medio ambiente.

Por todo ello, el **OBJETIVO GENERAL** de esta Tesis es establecer si es posible el empleo DE DOSIS ELEVADAS de residuos orgánicos urbanos para la fijación de carbono y la recuperación de suelos de zonas degradadas en ambientes semiáridos, sin perjuicio para la salud del ecosistema, así como profundizar en el conocimiento de la dinámica en el suelo de esta materia orgánica exógena y en la incidencia del nivel de estabilidad y dosis de la enmienda en estos procesos de fijación de carbono y recuperación de la calidad del suelo.

Como **OBJETIVOS CONCRETOS** se pretende:

- I. Evaluar los posibles riesgos asociados a la aplicación de dosis elevadas de residuos orgánicos urbanos a un suelo degradado;
- II. Evaluación al nivel de campo de la eficacia de la enmienda en incrementar la capacidad del suelo para mantener una cubierta vegetal estable, estableciendo la densidad de cobertura vegetal y la diversidad de las especies vegetales desarrolladas;
- III. Evaluar como se ve afectada la actividad enzimática general del suelo y la asociada al coloide orgánico e inorgánico del suelo por el grado de estabilidad de la enmienda y la dosis de aplicación,
- IV. Determinar cómo influye el modo de aplicación de la enmienda (aplicación en superficie (mulching) o mediante incorporación en la capa arable del suelo) en la dinámica de la materia orgánica añadida y la calidad microbiológica del suelo;
- V. Determinar en qué medida el grado de estabilidad de la enmienda y la dosis de aplicación afecta al contenido de humus de estos suelos y a sus características, así como el efecto que en las enzimas ligadas a este humus (enzimas inmovilizadas) producen estas adiciones;
- VI. Determinar la incidencia del grado de estabilidad de la enmienda y la dosis de aplicación en la diversidad funcional y estructural de las poblaciones microbianas del suelo;
- VII. Establecer la incidencia a corto-plazo de la dosis y el nivel de estabilización de la materia orgánica incorporada con la enmienda en la mineralización de la MO añadida y su asociación con las diferentes fracciones de tamaño de partícula del suelo;

Para la consecución de estos objetivos se llevaron a cabo los siguientes ensayos experimentales (Figura 2.1):

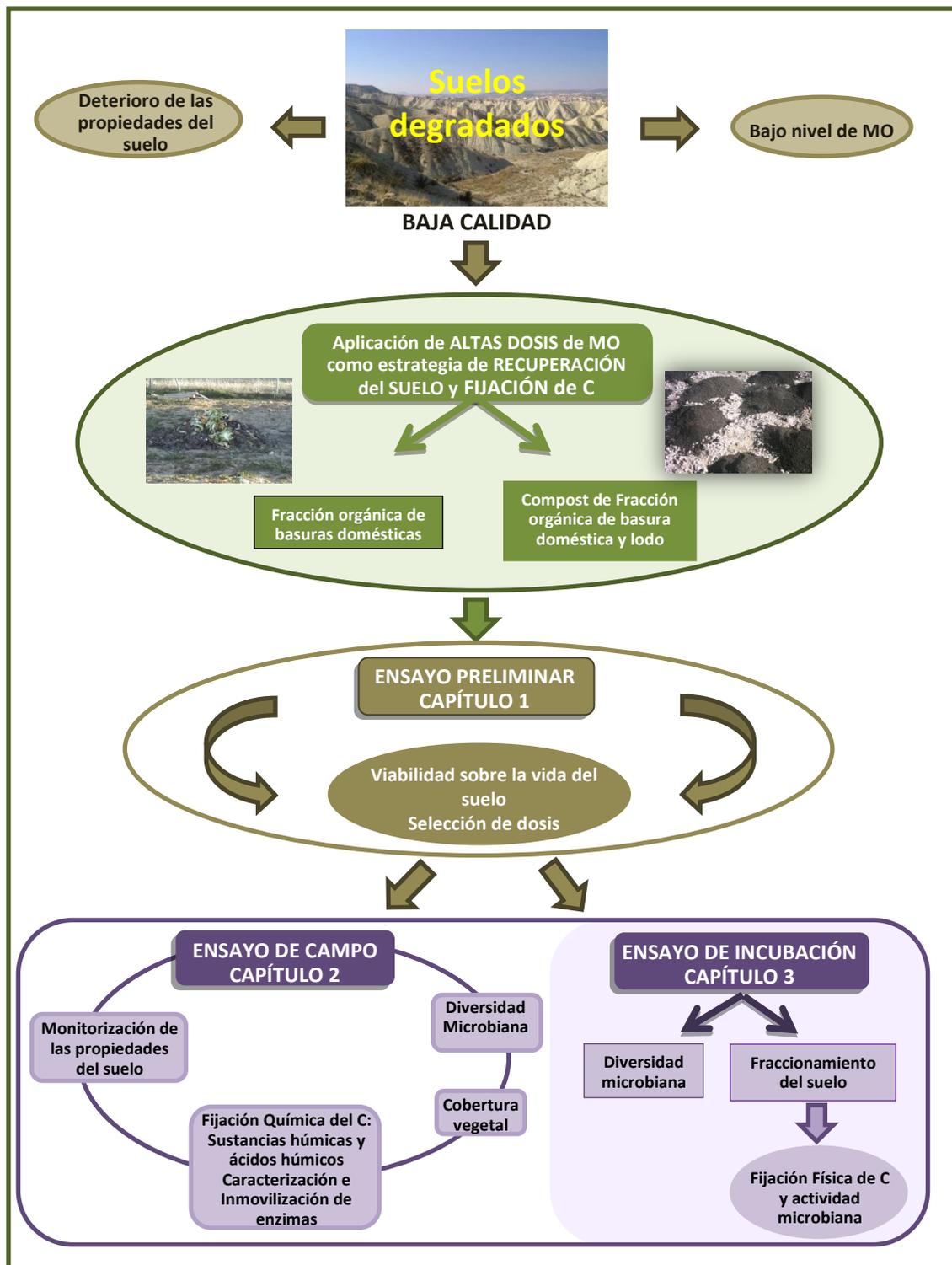


Figura 2.1. Esquema del Plan de Trabajo

1. Como ensayo previo (Capítulo 4.1) se realizó un estudio de viabilidad con el fin de establecer a nivel de microcosmos si era factible la adición de dosis muy elevadas de residuo orgánico a un suelo degradado sin causar un impacto negativo sobre el crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas del mismo. Para ello, un suelo degradado fue enmendado con 8 dosis crecientes (de 0% a 20%) de dos materiales orgánicos de origen urbano (fracción orgánica de la basura doméstica (RF) y compost de RF y lodo de depuración de aguas residuales (CL), sometiéndolo a un periodo de incubación de dos meses en una cámara de incubación en condiciones controladas de humedad y temperatura. A lo largo de este periodo de incubación (0, 30 y 60 días) se monitorizaron diversos parámetros físico-químicos, químicos y microbiológicos con el fin de evaluar la respuesta del suelo a las diferentes dosis de enmienda aplicadas.
  
2. Un vez comprobada la viabilidad del estudio propuesto en condiciones de laboratorio, se procedió a confirmar estos resultados en condiciones reales de campo (Capítulo 4.2). Para ello, tras seleccionar en base al estudio anterior las dosis de enmienda orgánica que se estimaron más apropiadas (una dosis alta, pero que puede considerarse normal en recuperación de suelos, y otra dosis tres veces superior) se establecieron diferentes parcelas en una zona degradada de ambiente semiárido que fueron tratadas por triplicado con dos residuos orgánicos urbanos (fracción orgánica de basuras domésticas y compost de lodo de depuradora) a las dosis seleccionadas (adición de 1% y 3% de C orgánico, en peso húmedo). En estas parcelas se monitorizaron a lo largo de 5 años diferentes parámetros físicos, físico-químicos, químicos microbiológicos y bioquímicos, con el fin de profundizar en la incidencia de la dosis, grado de madurez y modo de aplicación de la enmienda (en mulching o mediante incorporación en la capa arable) en la recuperación de la calidad del suelo. Dado el importante papel que juegan las sustancias húmicas en la fertilidad del suelo, se profundizó en el estudio de la incidencia de las variables antes indicadas (dosis, nivel de madurez y modo de aplicación de la enmienda) en la formación y características de las sustancias húmicas del suelo, así como en la capacidad de estas sustancias húmicas para formar complejos enzima-humus.  
Asimismo, se evaluaron los cambios producidos por estas enmiendas en la diversidad funcional y estructural de las poblaciones microbianas del suelo, y en el desarrollo y diversidad de una cubierta vegetal que servirá de protección al suelo frente a los fenómenos de erosión y escorrentía.
  
3. Por último, se llevó a cabo un ensayo de incubación (Capítulo 4.3) con el fin de evaluar en condiciones controladas y en ausencia de vegetación la incidencia de la dosis y grado de madurez de la enmienda en la compartimentación del C y de la actividad microbiana en diferentes fracciones de tamaño de partícula del suelo, así como en la biodiversidad del suelo. En este ensayo el suelo enmendado a las dosis en estudio con los dos residuos orgánicos utilizados en el ensayo de campo, fue sometido a un periodo de incubación de 9 meses, fraccionando el suelo por tamaño de partícula al inicio y fin de la incubación. Tanto en el suelo completo como en sus diferentes fracciones se determinó el contenido de carbono orgánico y diversas actividades enzimáticas. La biodiversidad funcional y estructural fue también evaluada en estas condiciones de ausencia de vegetación.

---

# METODOLOGÍA

---



## **TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Tanto en el ensayo de viabilidad como en el ensayo de incubación para el estudio sobre la fijación de carbono en las fracciones de diferente tamaño de partícula del suelo, la toma de suelo fue destructiva, tomándose para análisis en cada tiempo de muestreo tres contenedores por tratamiento.

En el ensayo de campo el muestreo de suelo se realizó en cada tiempo de muestreo tomando varias submuestras (8-10) de los 10-15 cm superficiales del suelo mediante recorrido de la parcela en zig-zag; estas submuestras eran a continuación mezcladas y homogeneizadas, constituyendo así la muestra a analizar.

En todos los casos, las muestras se tamizaron a través de un tamiz de 2 mm para todos los parámetros, excepto para la estabilidad de agregados. A continuación, las muestras fueron conservadas a 4 °C y -20 °C dependiendo del estudio de parámetros que se iba a llevar a cabo posteriormente.

## **DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS**

### **Análisis granulométrico y textural**

#### Principio

Se determina la cantidad de sólidos en suspensión midiendo su densidad con un hidrómetro (Bouyoucos, 1962).

#### Reactivos

Peróxido de hidrógeno

Éter etílico

Disolución dispersante: hexametáfosfato sódico (37 g), carbonato sódico (8 g) y agua (hasta un litro).

#### Procedimiento

Se toma una muestra de 40 g de suelo a la que se añaden 10 ml de peróxido de hidrógeno para destruir los coloides orgánicos, añadiendo agua cuando es necesario para romper espumas y se calienta en baño de agua hasta destrucción de la materia orgánica, y eliminación del exceso de reactivo. En los suelos con conductividad eléctrica en extracto acuoso 1:5 mayor de 1 dS m<sup>-1</sup> será necesario efectuar lavados sucesivos hasta eliminar las sales, para evitar la floculación de los coloides. Este lavado se realiza sobre un Buchner con papel de filtro de poro fino ayudado de vacío. Una vez eliminadas la materia orgánica y las sales, el suelo se pasa a una botella de litro y medio, se enrasa a 300 cm<sup>3</sup> y se añaden 50 cm<sup>3</sup> de disolución dispersante, agitando toda la noche a 120 rpm en agitador rotatorio.

La suspensión del suelo se pasa a una probeta de un litro y se agita con una varilla durante un minuto para que la mezcla sea lo más homogénea posible. Inmediatamente después de terminar la agitación se introduce el hidrómetro, realizando la medida a los 40 segundos (valor que expresa la cantidad de

limo+arcilla que contiene la muestra). Esta misma operación se repite exactamente a las dos horas y la medida que se obtiene proporciona el porcentaje de arcilla. Por diferencia entre ambas medidas se obtiene el porcentaje de limo, y por diferencia con la primera medida a 100, el de arena.

### **Textura**

A partir de los porcentajes obtenidos en el apartado anterior para arena, limo y arcillas, y mediante el diagrama de texturas propuesto por el U.S.D.A. (1951), se clasifica el suelo en el tipo textural correspondiente.

### **Estabilidad de agregados**

#### Principio

Determinación de los agregados del suelo estables al impacto de una lluvia artificial de energía conocida (Lax et al., 1994).

#### Procedimiento

Se pesan 4 g de suelo tamizado a 4 mm, se extienden sobre un tamiz de 0,25 mm (7,5 cm de diámetro) y se humedecen mediante pulverización. Después de 10 minutos se someten los agregados a una lluvia de 150 ml de agua desionizada proveniente de una vasija cilíndrica de 6,6 cm de diámetro interior, provista en su fondo con 11 orificios distribuidos regularmente, y elevada 1 m sobre el tamiz. La fracción del suelo que pasa el tamiz se desprecia. El suelo que queda en el tamiz, se pasa mediante chorro de agua desionizada a una cápsula previamente tarada (T), la cual se seca a 150 °C, se deja enfriar y se pesa (P1).

A continuación, el contenido de la cápsula se humedece y se deja 2 horas. Los agregados de la cápsula se vuelven a pasar por el tamiz de 0,25 mm, ayudándose con una varilla y un chorro de agua. Las partículas orgánicas y de arena que quedan sobre el tamiz, se colocan de nuevo en una cápsula, se secan y se pesan (P2).

#### Cálculo

El porcentaje de agregados estables a la lluvia (AE) respecto a los agregados totales del suelo se calcula mediante la fórmula siguiente (Ecuación A.1):

$$\% \text{ AE} = (P1 - P2) \times 100 / (4 - P2 + T) \quad \text{Ecuación A.1}$$

### **Capacidad de retención hídrica**

#### Principio

Determinación de la cantidad de agua que retiene el suelo saturado sin que se pierda por drenaje, medida de la retención hídrica a 1/3 de atmósfera.

### Procedimiento

Anillos cilíndricos de ½ cm de altura llenos de pasta saturada de agua del suelo en estudio se colocan sobre una membrana en una cámara cerrada. La pasta saturada se somete a una presión de 1/3 atmósferas y cuando el suelo no pierde más agua, se saca la muestra del anillo y se introduce en un pesa-sustancias tarado para seguidamente pesarlo (A). A continuación los mencionados pesa-sustancias se llevan a estufa a 105 °C durante un día, y una vez secos, se vuelven a pesar (B).

### Cálculo

El resultado de la capacidad de retención hídrica (CRH) se expresa en % de agua sobre suelo seco y se obtiene a partir de la siguiente expresión (Ecuación A.2):

$$\% \text{ CRH} = (A - B) \times 100 / (B - Z) \quad \text{Ecuación A.2}$$

donde:

A = peso de la muestra húmeda (g).

B = peso de la muestra seca (g).

Z = peso del pesa-sustancias (g).

## **Densidad real**

### Principio

Determinación según la metodología establecida por el grupo español de Estandarización de Métodos Analíticos (1978).

### Reactivos

Gasoil

### Procedimiento

Se introducen 10 g de muestra en un matraz aforado de 25 ml. A continuación se añaden 10 ml de gasoil, se tapa y se agita el matraz durante unos minutos, comprobándose que las burbujas de aire se desprenden del suelo y se desplazan al cuello matraz. Después de dos horas se añaden de nuevo al matraz otros 10 ml gasoil y se vuelve a agitar, dejándolo en reposo durante cuatro horas hasta que se aprecie que no se desprenden más burbujas de aire. Por medio de una microbureta se completa el matraz con gasoil hasta el enrase de 25 ml.

### Cálculo

La densidad real se expresa en g cm<sup>-3</sup> y se calcula mediante la siguiente expresión:

$$D_r = 10 / (5 - x) \quad \text{Ecuación A.3}$$

donde:

x es el volumen de gasoil necesario para llevar el volumen a 25 ml.

## Densidad aparente

### Principio

Utilización del método de Barahona & Santos (1981).

### Procedimiento

Se ponen en vasos, previamente tarados, alrededor de 90 g de muestra. Se riega durante un mes y se deja secar de manera que la superficie adquiera las irregularidades y grietas normales. Finalmente se llevan a estufa a 70 °C durante dos días y se pesan (P1). Después se cubren con arena hasta enrasar el vaso y se vuelven a pesar (P2).

Para determinar la densidad de la arena se utiliza un vaso igual que los anteriores, que se llena de arena y se pesa (P3); después se llena de agua y se vuelve a pesar (P4).

### Cálculo

La densidad aparente se expresa en g cm<sup>-3</sup> y se calcula mediante la siguiente expresión:

$$D_a = (P_1 - T) D / (P_4 - T) D - P_2 + P_1 \quad \text{Ecuación A.4}$$

donde

T= tara de los vasos

P<sub>1</sub>= masa del vaso con suelo (secado a 70 °C)

P<sub>2</sub>= masa del vaso con suelo y arena

P<sub>3</sub>= masa del vaso con arena

P<sub>4</sub>= masa del vaso con agua

D= densidad de la arena= (P<sub>3</sub> - T)/(P<sub>4</sub> - T)

## Porosidad

La porosidad de los suelos se expresa en % y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$P = (D_r - D_a) / D_r * 100 \quad \text{Ecuación A.5}$$

donde

$D_r$  = densidad real

$D_a$  = densidad aparente

## **DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS**

### **Medida del pH**

La medida del pH se realizó en un pHmetro Crison micro pH 2002 sobre un extracto acuoso obtenido por agitación mecánica durante 2 horas de una mezcla de suelo y agua destilada en la relación sólido líquido 1:5.

### **Conductividad eléctrica**

El extracto obtenido para la medida del pH se centrifugó y, sobre él, se midió directamente la conductividad eléctrica con un conductímetro Crison CM 2200.

## **DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS**

### **Nitrógeno total (Kjeldahl)**

#### Principio

Método Kjeldahl modificado por Bremner & Mulvaney (1982)

#### Reactivos

Ácido sulfúrico concentrado

Mezcla catalizadora: Selenio metálico (polvo) 10 %, Sulfato de cobre 25 %, Sulfato potásico 65 %

Hidróxido sódico 10 M

#### Procedimiento

Pesar 1 g de muestra de suelo seco en tubos Kjeldahl, añadir 0,8 g de mezcla catalizadora y 3 ml de ácido sulfúrico concentrado calentando a 360 °C en bloque digestor durante dos horas. A continuación se filtra el contenido del tubo de digestión a un matraz aforado de 100 ml, se lava cuidadosamente con agua destilada para recoger todo el contenido, y se enrasa. Se agita, se toman 0,5 ml, se añaden 9,5 ml de agua destilada y se mide con electrodo selectivo de amonio, para lo cual se añade en el momento de la medida 0,1 ml de hidróxido sódico 10 M.

### **Potasio, calcio y magnesio asimilable**

#### Principio

Desplazamiento mediante amonio de los cationes de cambio.

Reactivos

Acetato amónico 1 N a pH 7.

Procedimiento

Se colocan 5 g de muestra y 100 ml de acetato amónico a pH 7 en frascos de agitación. A continuación se agitan mecánicamente durante dos horas y se centrifuga a 3000 rpm durante 12 minutos. En el extracto se mide el K por espectrofotometría de emisión atómica, y el Ca y Mg en absorción atómica, en las condiciones de medida adecuadas para cada uno de estos elementos.

**Tabla A.1 Condiciones para la determinación del K, Ca y Mg**

Elemento	Técnica	Longitud de onda	Intensidad (mA)	Llama	Rendija (nm)
K	emisión	766,5	--	aire/acetileno	0,5
Ca	absorción	422,7	6	nitroso/acetileno	0,5
Mg	absorción	285,2	4	nitroso/acetileno	0,5

Los resultados se obtienen a partir de una recta de calibrado preparada para cada elemento, procedente de patrones que se encuentran en condiciones similares a las de las muestras problema.

**Carbonatos totales**Principio

Los carbonatos del suelo se establecieron por la reacción de éstos con ácido clorhídrico en un dispositivo cerrado, y posterior medida del volumen de CO<sub>2</sub> desprendido, mediante un calcímetro tipo Bernard. En condiciones de presión y temperatura constantes, el volumen de gas producido es proporcional al contenido calizo del suelo.

Procedimiento

Se pesan 0,2 g de suelo (P) en erlenmeyers apropiados para el calcímetro, que disponen de un tubo central en el que se coloca un volumen de HCl (1:1). Se coloca el erlenmeyer en el calcímetro, ajustando el cero de la columna de medida del mismo. Agitando suavemente se pone en contacto el ácido con el suelo y se va descendiendo la rama móvil del calcímetro para mantener el nivel de líquido igual en las dos ramas. En estado estacionario anotamos la medida (L). El mismo proceso se realiza para el blanco, es decir 0,1 g de CaCO<sub>3</sub> (P') y se anota la nueva medida (L').

Cálculo

El porcentaje de carbonatos totales del suelo (carbonato cálcico equivalente) vendrá dado por la ecuación A.6:

$$\% \text{ CaCO}_3 \text{ equivalente} = (100 \times L \times P') / (L' \times P) \quad \text{Ecuación A.6}$$

## Sulfatos

### Principio

Extracción acuosa y medida de los aniones por HPLC. La cromatografía de intercambio iónico se basa en el equilibrio de intercambio entre una fase sólida que contiene grupos sulfónicos o carboxílicos (para la separación de cationes) o grupos amino cuaternarios o primarios (para la separación de aniones).

### Reactivos

Eluyente: biftalato de potasio 6 mM (pH 4,2).

### Procedimiento

Extracción durante 4 horas de los aniones solubles presentes en la muestra mediante agua destilada en la relación 1/20 (sólido/líquido), centrifugando y filtrando el extracto a continuación. En este extracto, o en una dilución adecuada del mismo, se miden los aniones por HPLC en columna de aniones. Se ha utilizado una bomba para HPLC Alltech Modelo 426 acoplada a un detector de conductividad Alltech 550. La columna es una columna aniónica Allsep. Como eluyente se emplea un ácido débil (biftalato de potasio 6 mM, pH 4,5). El eluyente debe ser previamente desaireado y se pasa por la columna a una velocidad de 1 ml min<sup>-1</sup> hasta obtener una línea de base estable. Se inyectan muestras de 40 mg kg<sup>-1</sup> de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y se registra el tiempo de salida del pico. Se realiza una curva de calibración con muestras conteniendo 10, 20, 40, 60, y 80 mg kg<sup>-1</sup> de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Para cada concentración se calcula el área bajo el pico.

## Fósforo total y metales pesados

### Preparación de las muestras para la determinación de fósforo total y metales pesados

Para la determinación, tanto del fósforo total como de los metales pesados totales, las muestras de suelo deben ser digeridas previamente.

### Principio

Mineralización de la muestra por vía húmeda con HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y con utilización de radiación electrotermal (microondas).

### Reactivos

HNO<sub>3</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### Procedimiento

La muestra se debe mineralizar por vía húmeda en microondas, para ello, se sitúa en el interior de un vaso de teflón de alta presión debidamente seco. El peso que se toma de muestra es de 0,4-0,5 ± 0,0005 g. Una vez añadidos los reactivos de digestión (1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 4 ml HNO<sub>3</sub>), se introduce en el microondas permaneciendo durante un determinado período de tiempo. Este mineralizado, una vez frío, se introduce en un matraz aforado de 25 ml donde se enrasa a dicho volumen, y se guarda en botella de poliestireno para su almacenamiento en nevera y posterior análisis. A partir del extracto obtenido se determinó el fósforo

mediante método colorimétrico y los metales pesados por espectrometría de absorción atómica, tal y como se describe a continuación.

## **Fósforo total**

### Principio

Medida espectrofotométrica de la intensidad del color azul del extracto (Murphy & Riley, 1962).

### Reactivos

Acido sulfúrico (14,8 ml en 1 litro)

Acido sulfúrico 5 N

Molibdato amónico

Tartrato de antimonio III

Preparación de reactivos:

Reactivo A: 12 g de molibdato amónico en 250 ml de agua destilada se añaden a 0,2908 g de tartrato de antimonio III disueltos en 100 ml de H<sub>2</sub>O; ambos se agregan a 1 litro de ácido sulfúrico 5 N, y se enrasa todo a 2 litros.

Reactivo B: 1,056 g de ácido ascórbico se disuelven en 200 ml del reactivo A. Este reactivo hay que prepararlo al día (sólo se mantiene 24 horas).

### Procedimiento

A 2 ml del extracto, o de su dilución pertinente, obtenido a partir de la digestión por vía húmeda, se le añaden 4 ml de agua destilada, 2 ml de ácido sulfúrico, preparado como se indica en los reactivos, y 2 ml del reactivo B, se mezcla bien y se deja en reposo durante 30 minutos; el líquido tomará una coloración azul; a continuación se mide en espectrofotómetro a 696 nm. Paralelamente se realiza una curva patrón con ácido fosfórico, representándose en ordenadas la absorbancia y en abscisas las concentraciones de fósforo (mg kg<sup>-1</sup>). La absorbancia obtenida para las muestras se lleva a esta recta y se calcula la concentración de fósforo (mg kg<sup>-1</sup>) en el líquido, teniendo en cuenta multiplicar por la dilución realizada.

## **Metales pesados**

### Principio

Determinación directa por espectrometría de absorción atómica sobre una dilución adecuada del extracto obtenido a partir de la mineralización por vía húmeda.

### Procedimiento

Para la determinación de metales pesados se partió de diluciones adecuadas del extracto de digestión húmeda, realizando las medidas en un absorciómetro Pelkin-Elmer 5500, en las condiciones de trabajo expresadas en el manual de uso.

El cálculo de las concentraciones en metales pesados de las muestras se hace mediante la utilización de patrones de concentración conocida, elaborados con una fuerza iónica y acidez similar a las muestras en cada caso, utilizando HNO<sub>3</sub> diluido.

### **Carbono orgánico total**

#### Principio

Oxidación del carbono orgánico con dicromato potásico en medio ácido, y posterior valoración con sal de Mohr del exceso de dicromato, según el método de Yeomans & Bremner (1989).

#### Reactivos

Dicromato potásico 1 N.

Acido sulfúrico concentrado.

Sulfato de hierro (II) y amonio 6-hidrato (sal de Mohr) 0,5 N.

Acido fosfórico concentrado.

Indicador: difenilamina al 0,5 % en ácido sulfúrico.

#### Procedimiento

Se pesan entre 0,1 y 0,5 g de muestra, y se añaden 5 ml de dicromato potásico 1N y 7,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se colocan en la estufa a 170 °C durante media hora y una vez frío, se añaden 5 ml de ácido fosfórico concentrado y agua destilada hasta un volumen de 50 ml aproximadamente. A continuación se valora el exceso de dicromato con sal de Mohr 0,5 N en presencia del indicador. El punto final es el cambio de color de azul a verde. Paralelamente se preparan blancos en frío y en caliente (media hora en estufa a 170 °C).

#### Cálculo

El porcentaje de carbono orgánico total oxidable (C<sub>org</sub>) se obtiene según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ COT} = (A) \times (N \text{ sal de Mohr}) \times (0.003) \times 100 / (\text{g de muestra}) \quad \text{Ecuación A.7}$$

siendo:

$$A = [(BC - S) \times (BF - BC) / BF] + (BC - S)$$

BC = ml de sal de Mohr gastados por el blanco caliente

BF = ml de sal de Mohr gastados por el blanco frío

S = ml de sal de Mohr gastados por la muestra

N = Normalidad de sal de Mohr.

## **Materia orgánica**

Para suelos, el contenido de materia orgánica se calcula multiplicando el contenido de carbono orgánico total del suelo por el factor 1,728.

### **Fracciones de materia orgánica lábil (sustancias no húmicas)**

#### *Preparación del extracto acuoso*

##### Principio

Obtención del extracto acuoso en la relación sólido líquido (relación 1:5) y determinación sobre él del carbono soluble en agua y carbohidratos, utilizando los métodos correspondientes que se describen a continuación.

##### Reactivos

Agua destilada

##### Procedimiento

El extracto se obtiene mediante agitación mecánica durante dos horas de 10 g de muestra y 50 ml de agua destilada. A continuación se centrifuga a 3400 rpm por espacio de 15 minutos y posteriormente se filtra.

### **Carbono hidrosoluble**

##### Principio

Determinación del carbono orgánico contenido en el extracto acuoso, mediante analizador de C en muestras líquidas Shimadzu TOC-5050A.

### **Carbohidratos hidrosolubles**

##### Principio

Utilización del reactivo antrona para determinación de carbohidratos según el método de Brink et al. (1960).

##### Reactivos

Reactivo antrona (0,2 % en ácido sulfúrico concentrado). Se prepara en el momento en el que se va a utilizar.

##### Procedimiento

A 1 ml del extracto acuoso de suelo se le añaden 4 ml del reactivo de antrona, se agita y se calienta en baño a 80 °C durante 10 minutos. Después se enfría en hielo y se lee en espectrofotómetro a 630 nm. Se realiza una recta de calibrado utilizando distintas concentraciones de tartrato de glucosa. Los datos se expresan en mg de de C de glucosa g<sup>-1</sup> de suelo.

### **Extracción de las fracciones estables de la materia orgánica (sustancias húmicas)**

#### Principio

Extracción de las sustancias húmicas del suelo mediante un extractante alcalino (pirofosfato sódico a pH 9)

#### Reactivos

Pirofosfato de sodio alcalino (pH 9,8) 0,1 M

#### Procedimiento

En un tubo de centrifuga de plástico se colocan 2 g de suelo y 40 ml de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,1 M, a pH 9,8 (proporción 1:20 peso/volumen) y se pone a agitar en atmósfera de nitrógeno durante 4 horas. A continuación se centrifuga durante 15 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante se filtra a través de un papel lavado a los ácidos. A partir de este extracto se determina el carbono extraíble total (carbono de sustancias húmicas).

### **Carbono de sustancias húmicas (Carbono extraíble total en el extracto de pirofosfato sódico alcalino)**

#### Principio

El carbono extraíble total se determinó sobre el extracto en pirofosfato sódico alcalino mediante oxidación con dicromato potásico en medio ácido.

#### Reactivos

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

$\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado

#### Procedimiento

En un tubo de digestión se colocan 2 ml de extracto, 1 ml de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  2 N, y 2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Se coloca 15 minutos en bloque digestor a 150 °C, dejándolo a continuación reposar durante una noche. Posteriormente se lleva el volumen total a 10 ml con agua destilada y se lee en espectrofotómetro a 590 nm. En caso de muestras con bajo contenido de carbono se parte de 4 ml del extracto a los que se le añaden 98 mg de *dicromato* potásico y 4 ml de ácido sulfúrico concentrado; procediéndose a continuación tal como se ha indicado anteriormente. La curva patrón se realiza con glucosa en concentraciones de 0, 50, 100, 200, y 500 mg  $\text{kg}^{-1}$  de glucosa (Sims & Haby, 1971).

### **Fraccionamiento de las sustancias húmicas. Fraccionamiento de ácidos húmicos (AH) y fracción fúlvica (FF).**

#### Principio

El fraccionamiento de las sustancias húmicas se lleva a cabo en base a la diferente solubilidad de sus fracciones en función del pH, ya si bien ambas fracciones (ácidos húmicos y ácidos fúlvicos) son extraíbles en medio alcalino los AH precipitan al acidificar el extracto, mientras que las fracciones fúlvica (FF)

permanecen en disolución después de acidificar el extracto. El fraccionamiento de las sustancias húmicas se lleva a cabo mediante precipitación de los ácidos húmicos por acidificación a pH 2 del extracto de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ .

Reactivos:

$\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

Procedimiento:

Una vez obtenido el extracto de sustancias húmicas con  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,1 M, a pH 9,8, se adiciona ácido sulfúrico concentrado hasta alcanzar un  $\text{pH} < 2$ . Se deja en reposo a 4 °C durante 24 horas, para conseguir una completa precipitación de los ácidos húmicos. Estos se separan del sobrenadante (fracción fúlvica) por decantación y posterior centrifugación a 15.000g durante 20 minutos. En la fracción fúlvica, se determina el carbono (CFF) tal como se ha descrito para la determinación del carbono extraíble mientras que el carbono de los ácidos húmicos (CAH) se calcula por diferencia entre el carbono extraíble (CEX) y el carbono de la fracción fúlvica, expresando el resultado en porcentaje:

$$\text{CAH (\%)} = \text{CEX (\%)} - \text{CFF (\%)}$$

Ecuación A.8

**Extracción y purificación de los ácidos húmicos para el estudio de sus características estructurales.**

Principio:

La extracción y purificación de los ácidos húmicos se realiza mediante extracción con pirofosfato de sodio y posterior diálisis y liofilización del extracto obtenido de acuerdo con los métodos usados por Nannipieri et al., (1980)

Reactivos:

Pirofosfato de Sodio 0,1M, pH 7,1.

$\text{H}_2\text{SO}_4$

HCl

HF

NaOH

Procedimiento:

La extracción y purificación de los ácidos húmicos se realiza mediante la extracción con una solución 0,1M de pirofosfato de sodio a pH 7,1, relación suelo:liquido de 1:10 en un tubo de centrifuga de 50 ml. La suspensión se sonifica en un baño de hielo cinco veces a intervalos de dos minutos a 70W. Luego es extraída por agitación mecánica en un baño con hielo o en una cámara termostatzada a 5 °C por 5 horas (para evitar desnaturalización de las proteínas).

Una vez obtenido el extracto de materia orgánica con  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,1 M, a pH 7.1, se adiciona ácido sulfúrico concentrado hasta alcanzar un  $\text{pH} < 2$ . Se deja en reposo a 4 °C durante 24 horas, para conseguir una completa precipitación de los ácidos húmicos. Posteriormente se separan, previamente por decantación y posteriormente mediante centrifugación a 18000 g durante 25 min, la parte sólida (ácidos húmicos) del extractante (fracción fúlvica). Tras lo cual, se procede a la purificación de los AH obtenidos mediante tratamiento con una mezcla HCl/HF (en 100 ml añadir 5 ml de HCl+ 5 ml de HF) para eliminar posibles restos de sílice (cenizas). Posteriormente la muestra es centrifugada a 18000 g durante 10 min y decantada. una continuación se redisuelve el precipitado de AH con NaOH 0,01M dializando la suspensión obtenida a través de una membrana Visking de peso molecular de corte 14.000.

La verificación del proceso de diálisis se llevó a cabo mediante medida de conductividad eléctrica de las aguas de diálisis en conductímetro. El agua de diálisis se cambia varias veces durante el día. Esta agua podría pasarse a través de una columna empacada con Policlilar (PVP) para concentrar y retener cualquier compuesto orgánico y serán reeluidos con 0,5M NaOH.

Posteriormente las muestras dializadas son congeladas a -60°C para posteriormente ser liofilizadas y estar preparadas para posteriores análisis (Análisis elemental, IR, RMN).

### **Análisis elemental de los ácidos húmicos**

#### Principio:

El análisis elemental proporciona información precisa sobre la distribución porcentual de los principales elementos constituyentes de los ácidos húmicos.

#### Procedimiento:

La composición elemental de los AH extraídos fue determinada usando un CHN autoanalizador Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Foster City, CA). El contenido de oxígeno (O) fue calculado mediante la diferencia a 100 de la suma de los valores de CNH:

$$\text{O}\% = 100 - \text{C}\% - \text{H}\% - \text{N}\% \quad \text{Ecuación A.9}$$

### **Espectroscopía infrarroja de ácidos húmicos**

#### Principio:

Cada molécula posee una vibración característica y una interacción con la energía electromagnética para absorber e irradiar en la región del espectro infrarrojo, con obtención de bandas que se asocian a grupos funcionales específicos.

#### Procedimiento:

Se mezcla 400 mg de bromuro potásico previamente secado en estufa a 105 °C con 1 mg de ácido húmico, mezclándose en un mortero de ágata hasta conseguir la máxima homogeneización. La pastilla se prepara sometiendo la mezcla a vacío durante 5 minutos y otros 5 minutos a una presión de 10 T  $\text{cm}^{-1}$ .

Posteriormente se obtuvieron los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (IR-TF) con un equipo Bruker EQUINOX 25. Se registraron los espectros entre 4000 y 200  $\text{cm}^{-1}$  con resolución de 1  $\text{cm}^{-1}$ .

### **Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ en estado sólido de los ácidos húmicos**

#### Principio:

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear proporciona información sobre la estructura y la proporción relativa de las diferentes unidades estructurales de los ácidos húmicos.

Los espectros pueden dividirse en regiones correspondientes a distintos tipos de carbonos (fundamentalmente alquílicos, O-alquílicos, aromáticos o insaturados y carbonilos), cuyas áreas informan sobre la proporción de estas unidades estructurales en la MO. Si bien suelen integrarse intervalos relativamente anchos en el caso de las sustancias macromoleculares, también pueden integrarse las áreas de picos característicos de algunos tipos de C (Knicker et al., 2003c, 2006a).

#### Procedimiento:

Los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los ácidos húmicos se obtuvieron a un campo magnético de 2,3 Tesla con un espectrómetro Bruker DMX 300 operando a una frecuencia de resonancia de 75.48 MHz en  $^{13}\text{C}$ , bajo condiciones de polarización cruzada (CP) y rotación en el ángulo mágico (MAS). El intervalo entre pulsos es de 3 s, y el tiempo de contacto de 1 a 1,5 ms. Para cada espectro se acumulan entre  $10^4$  y  $10^5$  FIDs (*free induction decays*). La anchura de barrido es de 125 kHz y la de filtro de 25 kHz. El tiempo de adquisición es de 12,3 ms. La frecuencia de rotación en el ángulo mágico es de 4,3 kHz, empleando un rotor estándar de doble cavidad donde se colocan 300 mg de muestra. Las escalas de desplazamiento químico se calibran (0 ppm) con tetrametilsilano (TMS).

En todos los espectros se integran las 4 regiones principales correspondientes a los diferentes carbonos: alquílico (0–46 ppm), O-alquílico (46–110 ppm), aromático (110–160 ppm) y carbonílico (160–220 ppm).

## **DETERMINACIÓN DE PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS**

### **Ensayo de respiración (medida del desprendimiento de $\text{CO}_2$ ).**

#### Principio

Determinación del desprendimiento de C- $\text{CO}_2$  por los microorganismos, durante la incubación del suelo en un sistema cerrado. El  $\text{CO}_2$  desprendido es medido en un analizador de gases IR (Hernández & García 2003).

#### Procedimiento

En frascos con cierre hermético, de 125  $\text{cm}^3$  provistos de tapón con septum, que permita pinchar para extraer gas, se introducen 30 g de suelo humedecido con agua destilada al 60 % de su capacidad de retención hídrica. Se cierra herméticamente el frasco y se coloca en incubación a 28 °C. Periódicamente (diariamente al inicio) se extrae una alícuota de gas del interior del frasco cerrado mediante una jeringuilla con aguja, y se inyecta en el analizador IR para medir el  $\text{CO}_2$  contenido en el mismo. A continuación, se

destapan los frascos media hora para renovar la atmósfera de aire contenida en el mismo y evitar problemas de anaerobiosis. Después de este tiempo, se cierran de nuevo y se vuelven a incubar hasta la medida siguiente. La calibración del aparato se realiza con CO<sub>2</sub> gas al 10% de concentración o con aire exento de CO<sub>2</sub>.

### Cálculo

Las unidades del analizador de gas vienen expresadas como % CO<sub>2</sub>, pero la lectura obtenida hay que referirla al volumen del frasco empleado en la incubación de la muestra. Si A es la lectura de CO<sub>2</sub> obtenida en el analizador, entonces

$$\text{Volumen de CO}_2 \text{ presente en el frasco (litros)} = (125 - V \text{ muestra de suelo}) \times 10^{-3} \times A / 100 = (125 - V \text{ muestra de suelo}) \times A \times 10^{-5} \quad \text{Ecuación A.10}$$

Para calcular los mg de C-CO<sub>2</sub> en ese volumen de gas, se utilizará la ecuación general de los gases.

$$P \times V = n \times R \times T \quad \text{Ecuación A.11}$$

Por lo que los moles de CO<sub>2</sub> presentes serán:

$$N = PV / RT = P (125 - V \text{ muestra de suelo}) \times A \times 10^{-5} / R T \quad \text{Ecuación A.12}$$

Donde:

P = Es la presión, que en este caso consideramos igual a 1 atmósfera.

V = Es el volumen que ocupa el gas en el interior del frasco calculado como se indicó antes.

R = 0,082.

T = Temperatura en grados Kelvin (273 + 28°C en este caso).

Teniendo en cuenta que se han utilizado 30 g de suelo, los moles de CO<sub>2</sub> desprendidos por kilo serían

$$\text{Moles de CO}_2 \text{ Kg}^{-1} \text{ de suelo} = (125 - V \text{ muestra de suelo}) \times A \times 10^{-2} / 30 R T \quad \text{Ecuación A.13}$$

Y dado que un mol de CO<sub>2</sub> equivale a 12g de C-CO<sub>2</sub>, y considerando la duración del ensayo

$$\text{C-CO}_2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1} = (125 - V \text{ muestra de suelo}) \times A \times 4 / R T \times t \quad \text{Ecuación A.14}$$

Siendo t el tiempo, en días, durante el que se ha producido el desprendimiento de CO<sub>2</sub> medido.

## **Carbono de biomasa microbiana**

### Principio

La fumigación con cloroformo provoca la muerte de las células microbianas del suelo por la rotura de las membranas celulares, con lo que el contenido citoplasmático de dichas células microbianas es vertido al suelo, de donde puede ser extraído con K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M, pudiendo ser cuantificados los distintos componentes

del mismo (C, N, P). Por ello, este método consta de tres fases: fumigación con cloroformo libre de etanol (Jenkinson & Powlson, 1976), extracción del C con  $K_2SO_4$  0,5M (Vance et al., 1987) y determinación analítica del C de la biomasa microbiana.

#### Reactivos

Cloroformo lavado

Sulfato Potásico 0,5 M

#### Procedimiento

3 g de suelo tamizado y humedecido al 60 % de su capacidad de retención hídrica, se incuban en frascos abiertos de 150 cm<sup>3</sup> en la oscuridad durante 24 horas, al cabo de las cuales, se añaden 0,17 ml de cloroformo lavado y se mantienen cerrados durante 30 minutos; seguidamente se añaden 12 ml de sulfato potásico 0,5 M y se agita mecánicamente durante 1 hora. A continuación, se centrifuga a 3400 rpm durante 8 min y se filtra. Paralelamente se preparan también controles sin cloroformo. Al extracto obtenido, se le pasa aire durante 2 minutos para eliminar el cloroformo y sobre dicho extracto se mide el carbono. El carbono se midió en un analizador de C para muestras líquidas Shimadzu TOC-5050.

#### Cálculo

El contenido del carbono del extracto es transformado en carbono de la biomasa microbiana mediante la fórmula (Ecuación A.15):

$$\text{C de biomasa microbiana} = \text{C del extracto} \times 2.66 \quad \text{Ecuación A.15}$$

El carbono de biomasa microbiana de la muestra vendrá dado por la diferencia entre el carbono de la muestra fumigada con cloroformo y el de la muestra no fumigada.

### **Contenido de adenosín 5' trifosfato (ATP)**

#### Principio

Extracción del ATP contenido en el suelo con un extractante adecuado. Una vez extraído el ATP del suelo se procede a su cuantificación mediante un test de bioluminiscencia en el cual se produce una reacción de catálisis enzimática en la que interviene el ATP, y cuyo resultado es la emisión de luz, siendo esta proporcional a la concentración de ATP en el suelo (método de extracción y determinación de Webster et al., 1984, modificado por Ciardi & Nannipieri, 1990).

#### Reactivos

Solución extractante A (500 ml): 3,724 g EDTA, 60,6 g urea, 100 ml DMSO (dimetil-sulfóxido), 100 g adenosina y 22,625 ml  $H_3PO_4$ . Disolver cada uno de los reactivos en este orden y no añadir el siguiente hasta que se haya disuelto el precedente. Preparar la solución extractante inmediatamente antes de su uso ya que después de 15 minutos precipita.

Solución Tampón (1000 ml): 24,23 g Tris (hidroximetil)-aminometano, 1,49 g EDTA, 3,22 g de acetato de magnesio tetrahidrato, ajustando el pH a 10,3 con NaOH 1M.

Sistema Luciferina-Luciferasa liofilizada (Monitoring Reagent) diluida en 0,1 M Tris-Acetato, 2 ml EDTA, pH 7,75

Estándar de ATP. Se hace una dilución 0,98 mg de ATP en 200 ml.

### Procedimiento

Pesar 1 g de suelo seco en tubos de 30 ml y añadir 20 ml de la solución extractante A. La suspensión se agita en baño a 4 °C durante 30 minutos. La mezcla se filtra con papel de filtro lavado al ácido. Si no se puede medir inmediatamente el ATP, se puede congelar la mezcla a -15 °C hasta su medición. Para medir en el luminómetro necesitamos obtener un volumen de 0,8 ml entre el extracto y el tampón para obtener un pH de mezcla comprendido entre 7,45 y 7,75. De esta mezcla se toma una cantidad conocida (generalmente 50 µl), se introduce en la cubeta del luminómetro y se leen las unidades de luz relativas. A continuación, se adiciona a dicha cubeta un volumen igual (50 µl) de la mezcla luciferina-luciferasa, se agita suavemente y se vuelven a medir las unidades de luz. La luz se mide en el luminómetro usando un modo de integración de períodos de 10 segundos.

Después de cada determinación se añade estándar interno de ATP (por ejemplo 10 µl, que según la dilución corresponde a una adición de 50,7 ng) y se mide de nuevo en luminómetro la emisión de luz.

### Cálculo

El contenido ATP se obtiene mediante la siguiente relación (Ecuación A.16):

$$\text{ATP} = (\text{B} - \text{A}) \times \text{D} \times \text{D}' / (\text{C} \times \text{G}) \quad \text{Ecuación A.16}$$

donde:

A= valor del extracto tamponado.

B= valor después de añadir la luciferina-luciferasa.

C= valor después de añadir el estándar interno.

D= cantidad de ATP estándar interno añadido (50,7 ng).

D'= diluciones que se realizan para medir.

G = factor referente al peso del suelo.

El ATP se expresa en ng ATP g<sup>-1</sup> suelo seco.

## **Determinación de la diversidad microbiana funcional. BIOLOG**

### Principio:

La diversidad funcional microbiana se estableció mediante el estudio de los patrones de utilización por los microorganismos de diferentes sustratos carbonados, siguiendo la técnica de BIOLOG.

Las Eco Placas utilizadas presentan 31 pocillos en triplicado con distintos sustratos de carbono, más un pocillo como blanco para cada réplica. El tetrazolio presente en las placas es reducido con NADH producto de la actividad microbiana dando lugar a una coloración morada. La tasa y la extensión de formación de color morado en cada pocillo indican la tasa y la extensión a la que ocurre la respiración microbiana utilizando el sustrato presente en el citado pocillo.

#### Reactivos:

Incubador refrigerado

Balanza analítica

Agita tubos

Pipetas de volumen variable

Lector de microplacas

Agitador de vaivém

Autoclave

Tubos falcón esterilizados

Placas petri de vidrio

Agua miliQ

#### Procedimiento:

Inicialmente se procede a auto-clavar el material durante 20 minutos a 120 °C (agua miliQ, puntas de pipetas y placas petri). Seguidamente se pesa el equivalente en fresco de 1 g de muestra de suelo y se le añaden 10 ml de agua calidad MilliQ en los tubos falcón esterilizados. Se agita 1 hora en agitador de vaivém a 150 rpm durante 15 min a 4 °C. Tras lo cual se centrifuga el extracto a 15000 g durante 10 min. Posteriormente y mediante la determinación de la densidad óptica de cada muestra mediante la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm, se realizan las diluciones necesarias de cada muestras hasta obtener lecturas similares de densidades ópticas de los extractos con el fin de obtener extractos con un contenido similar de biomasa microbiana. Una vez determinada la dilución de la muestra se procede a realizar la siembra de cada una de ellas en las placas que contienen las diferentes fuentes de carbono. Para ello, ayudándonos de una pipeta multicanal se siembra 100 µl de inóculo de muestras en cada uno de los pocillos. A continuación, se realiza la primera lectura de las densidades ópticas a  $\lambda=595$  nm en lector placas Multiskan Ascen; esta lectura se considera como tiempo 0. Después, se incuban a 28 °C en oscuridad y se leen periódicamente, cada 12 horas (el periodo de lectura puede variar en función del tipo de muestra). La lectura óptica se realizará hasta que al menos 10 celdas tengan una absorbancia  $> 2,0$  a  $\lambda=595$  nm.

A partir de las densidades ópticas obtenidas por el lector de placas se realizan los siguientes cálculos:

$$\text{Datos transformados (DT)} = DO_{T_x} - DO_{T_0}$$

Ecuación A.17

Siendo:

T<sub>0</sub>= lecturas iniciales, substraídas para eliminar el background generado por el color de los sustratos y suspensión bacteriana.

T<sub>x</sub>= lecturas de las densidades para cada uno de los tiempos.

De esta forma se transforman los datos con el fin de evitar resultados negativos.

$$\text{Datos Normalizados (DN)} = DT / AWCD \quad \text{Ecuación A.18}$$

Siendo:

DT= Dato transformado (según 6.2.)

AWCD (Average Well Colour Development)=  $\Sigma$  densidad óptica de los datos transformados para cada una de las réplicas por tiempo/ 31 (nº sustratos diferentes de carbono).

Con ello se consigue minimizar el efecto de la posible heterogeneidad en el contenido de biomasa microbiana en el inóculo inicial, ya que los parámetros cinéticos no son independientes de la densidad del inóculo (biomasa microbiana) y por ello necesitan ser normalizados antes de realizar el análisis estadístico.

### Curva de Crecimiento Sigmoidal

Con los Datos Normalizados (DN) se realiza una curva de crecimiento sigmoidal AWCD (para  $\lambda=595$  nm) vs Tiempo (hrs). Con las diferentes muestras sometidas a estudio enfrentadas en dicha curva, se pretende encontrar un punto de crecimiento comparable entre ellas. Para ello se escogen valores de AWCD que pueden oscilar entre 0,2-0,6.

Con los datos correspondientes al punto seleccionado (datos normalizados) se realizará a continuación el correspondiente Análisis de Componentes Principales (PCA) para determinar si existen diferencias significativas en los patrones de comportamiento de las muestras.

### Índice de Diversidad de Shannon (H)

Evalúa la diversidad funcional de la comunidad microbiana. Este índice abarca tanto riqueza de sustratos como uniformidad

$$H = -\sum p_i (\ln p_i) \quad \text{Ecuación A.19}$$

Donde  $p_i$  = ratio valor absorbancia corregida de cada una de las celdas vs suma de la absorbancia de todas las celdas (este cálculo se realiza con los datos transformados, no con los normalizados).

### Perfil de ácidos grasos de fosfolípidos de membrana (PLFAs)

#### Principio

Extracción de los ácidos grasos de las membranas de los microorganismos del suelo mediante cloroformo-metanol y posterior fraccionamiento y cuantificación (Frostegard et al., 1999b; Bardgett & McAlister, 1999).

Reactivos

Todos los reactivos empleados (cloroformo, metanol, isooctano y hexano) deben ser válidos para cromatografía de gases (CG). Los patrones empleados son los siguientes:

FAME Bacteriano (ácidos grasos metil-éster). Se emplea una solución 0,4 mg ml<sup>-1</sup> de BacMix para PLFA preparada en isooctano.

FAME Eucariotas. Se emplea una solución de 0,2 mg ml<sup>-1</sup> de FameMix para PLFA preparada en isooctano.

Patrón interno. Se emplea una solución de 230,8 µg ml<sup>-1</sup> de ácido metilnonadecanoico (19:0) preparada en isooctano.

Procedimiento

Pesar 4 g de suelo en tubos de centrifuga y añadir 18,4 ml de reactivo Bligh y Dyer), compuesto de tampón citrato (0,15 M/pH 4)/metanol/cloroformo (1/2/0,8 v/v/v). Estos botes se tapan con tapones de silicona y se agitan durante 2 horas. Posteriormente, se centrifugan a 2500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se decanta en un tubo de centrifuga de 50 ml previamente lavado con cloroformo dos veces y se repite el proceso anterior añadiendo 2,5 ml de reactivo Bligh y Dyer, obteniéndose el sobrenadante.

A dicho sobrenadante, se le añaden 6,2 ml de cloroformo y 6,2 ml de tampón citrato. Se agita en vórtex durante 1 minuto y se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos. A continuación, se toman 3 ml de la fase orgánica (en el fondo del tubo) y se transfieren a un tubo de vidrio de 10 ml previamente lavado con cloroformo. Esta fase orgánica se concentra hasta sequedad a 40 °C bajo corriente de N<sub>2</sub> en un concentrador de muestras (Techne Dry Block DB 3D) y se tapan con tapón de silicona en atmósfera de N<sub>2</sub>. Conservar a -20 °C.

Determinación cromatográfica de los PLFA's

Redissolver el concentrado anterior en 100 µl de n-octano. Agitar dos veces con vórtex. Transferir a viales cromatográficos mediante pipeta Pasteur. Disolver también los patrones cromatográficos en isooctano. Introducir los viales en el cromatógrafo. El cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL utiliza una columna de diámetro interno de 0,2 mm. El gas portador es He a una presión de 250 kPa. La secuencia de temperaturas es la siguiente: 70 °C 2 minutos, incrementar a 160 °C manteniendo una velocidad de 30 °C min<sup>-1</sup>, incrementar a 280 °C con velocidad de 3 °C min<sup>-1</sup>, mantener el flujo durante 15 minutos.

El cálculo para la concentración de cada ácido graso es como sigue (Ecuaciones A.20 y A.21):

Fórmula para el blanco:

$$C \text{ (nmol g}^{-1}\text{)} = (F_{FM} \times C_{IS} \times 2 \times 1000) / (P \times F_{IS} \times MG_{FM}) \quad \text{Ecuación A.20}$$

Fórmula para las muestras:

$$C \text{ (nmol g}^{-1}\text{)} = [(F_{FM} \times C_{IS} \times 2 \times 1000) / (F_{IS} \times MG_{FM}) - C_{BW}] \times 100 / (P) \quad \text{Ecuación A.21}$$

donde:

C: concentración.

F<sub>FM</sub>: área del pico en la muestra.

MG<sub>FM</sub>: peso molecular del ácido graso que corresponde con el pico en la muestra.

C<sub>IS</sub>: concentración del estándar interno expresada en µg.

F<sub>IS</sub>: área del pico correspondiente al patrón estándar interno.

P = peso del suelo

2: factor de dilución al tomar sólo 3 ml de la fase orgánica sobre los 6 ml totales.

1000: factor de conversión de a nmol.

C<sub>BW</sub>: concentración de ese ácido graso en el blanco calculado por la primera fórmula.

La diversidad de PLFAs mediante el índice de Shannon-index H (H<sub>PLFA</sub>) se calcula del siguiente modo (Ecuación A.19):

$$H_{PLFA} = -\sum_{i=1}^n p_i \ln p_i \quad \text{Ecuación A.19}$$

donde:

$p_i$ : es la abundancia relativa de cada ácido graso con respecto a la suma total.

$n$ : es el número total de ácidos grasos detectados.

#### Nomenclatura, clasificación de PLFAs y diversidad

La nomenclatura de los PLFA se designa atendiendo al esquema X:Y\_Z, donde X se refiere al número de átomos de carbono, Y al número de dobles enlaces, y Z indica la posición del primer doble enlace desde el extremo alifático de la molécula. El símbolo  $\omega$  expresa la posición del primer doble enlace desde el extremo metilo de la molécula. Los prefijos iso (*i*) y anteiso (*a*) indican ramificación en los átomos de C número 2 y 3, respectivamente. El prefijo cy indica presencia de un grupo ciclopropilo. La configuración cis o trans se expresa mediante los prefijos *c* o *t* respectivamente.

Los ácidos grasos i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 $\omega$ 7c, 17:0, i17:0, cy17:0, 18:1 $\omega$ 9c, y cy19:0 representan biomasa bacteriana (Frostegard et al., 1993b; Bardgett et al., 1996); mientras que el ácido graso 18:2 $\omega$ 6 es exclusivo de hongos (Federle, 1986) (Tabla A.2). Los ácidos grasos específicos de bacterias gram positivas son los siguientes: i15:0, a15:0, i16:0, y i17:0; y los correspondientes a gram negativas son cy17:0, 18:1 $\omega$ 9c, y cy19:0 (Tabla A.2).

En cuanto al grado de insaturación (presencia de dobles enlaces), los ácidos grasos 15:1, 16:1 $\omega$ 7, 15:1 $\omega$ 6, 16:1 $\omega$ 5, 17:1, 18:1 $\omega$ 9c, 18:1 $\omega$ 7 y 18:1 $\omega$ 9t son monoinsaturados; mientras que 14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:0, i17:0, cy17:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0 y 24:0 son saturados (no dobles enlaces) (Tabla A.2). Aunque no de forma exclusiva, el ácido graso 16:1 $\omega$ 5 es indicativo de hongos micorrícicos arbusculares (Olsson et al., 1999; Gormsen et al., 2004).

**Tabla A.2 Asignación de ácidos grasos a distintos grupos**

	Bacterias	Hongos	Gram+	Gram-	Algas	Monoinsaturados	Saturados
14:0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	✓
i15:0	✓	.....	✓	.....	.....	.....	✓
a15:0	✓	.....	✓	.....	.....	.....	✓
15:1	.....	.....	.....	.....	.....	✓	.....
15:0	✓	.....	.....	.....	.....	.....	✓
i16:0	✓	.....	.....	.....	.....	.....	✓
16:1 $\omega$ 7	✓	.....	.....	.....	.....	✓	.....
16:1 $\omega$ 5	.....	.....	.....	.....	.....	✓	.....
16:0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	✓
i17:0	✓	.....	✓	.....	.....	.....	✓
17:1	.....	.....	.....	.....	.....	✓	.....
cy17:0	✓	.....	.....	✓	.....	.....	✓
17:0	✓	.....	.....	.....	.....	.....	✓
18:2 $\omega$ 6	.....	✓	.....	.....	.....	.....	.....
18:1 $\omega$ 9c	✓	.....	.....	✓	.....	✓	.....
18:1 $\omega$ 7	.....	.....	.....	.....	.....	✓	.....
18:0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	✓
cy19:0	✓	.....	.....	✓	.....	.....	✓
20:5 $\omega$ 3	.....	.....	.....	.....	✓	.....	.....
20:2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
20:0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	✓
22:0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	✓
24:0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	✓

### Actividad bacteriana mediante incorporación de $^3\text{H}$ -leucina:

#### Principio:

La actividad bacteriana fue estimada utilizando la técnica de incorporación de leucina (Leu), que proporciona una estimación relativa del crecimiento bacteriano (Bääth, 1994a; Bääth et al., 2001). Dicha técnica se fundamenta en la medida de la leucina radiactiva que se incorpora dentro de las proteínas bacterianas tras la incubación de una suspensión bacteriana obtenida del suelo mediante centrifugación que se pone en contacto con la leucina marcada.

#### Procedimiento:

Se pesan 1-2 g de suelo en función al suelo que estemos utilizando y se añaden 20 ml de agua MilliQ. Se agita durante 3 minutos y se centrifuga (10 minutos a 3000 rpm) para conseguir una suspensión de

bacterias a gran concentración. Se toman 1,5 ml de sobrenadante y se introduce en microtubos Eppendorf de 2ml. A continuación se procede a añadir L-(4,5-<sup>3</sup>H)-Leucina (5,7 TBq mmol<sup>-1</sup>, Amersham, UK) y leucina no marcada obteniendo 275nM Leu en la suspensión bacteriana. Tras 2h de incubación se añaden 75µl de ácido tricloroacético al 100% para matar las bacterias y poder detectar así la incorporación de leucina. Seguidamente se procede a una sucesión de centrifugaciones y lavados según lo descrito por Bääth et al. (2001). Finalmente se añade el cóctel de Scintilación (Ultima Gold, PerkinElmer) y se mide la radiactividad utilizando un contador de centelleo (scintillator). La cantidad de leucina incorporada dentro del extracto bacteriano (pmol de leucina incorporada h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de suelo seco) se utiliza como medida de crecimiento bacteriano.

### **Biomasa fúngica estimada a partir de ergosterol:**

El ergosterol es un esteroide que forma parte de la membrana fúngica y es considerado marcador específico de hongos. Partiendo de esta premisa, la extracción y cuantificación del ergosterol del suelo se utiliza para estimar la biomasa fúngica. En nuestro caso, la extracción y cuantificación de dicho marcador se realizó como parte de la determinación de actividad fúngica a través de la incorporación de <sup>14</sup>C-acetato dentro del ergosterol, tal y como se describe a continuación.

### **Actividad fúngica a través de incorporación de <sup>14</sup>C-acetato dentro de ergosterol**

#### Principio

La actividad fúngica fue medida mediante el método de incorporación de acetato dentro de ergosterol (Newell & Fallon, 1991), que proporciona una estimación relativa del crecimiento fúngico, adaptado para el suelo (Bääth, 2001). El procedimiento es similar al utilizado para la estimación de crecimiento bacteriano, con la diferencia de que para aislar la incorporación del sustrato radiactivo en los hongos, se midió la incorporación de dicho sustrato dentro de una molécula exclusiva de hongos, el ergosterol.

Para ello, se desarrollaron dos procedimientos paralelos, por un lado la incubación con <sup>14</sup>C-acetato para que fuese incorporado por los hongos y por otro, la extracción y recuperación del ergosterol, para poder determinar el acetato radiactivo incorporado en dicha molécula.

#### Procedimiento:

Se pesan 1,5 g de suelo fresco en tubos de ensayo y se añaden 20 µl de solución de <sup>14</sup>C-acetato ((1,2-<sup>14</sup>C), ácido acético, sal sódica, 2,07 GBq/mmol, Amersham, UK), 0,480 ml de acetato no marcado 1 mM y 1,5 ml de agua MilliQ, para obtener una concentración final de acetato de 220 µM. Los tubos son incubados a temperatura ambiente (22 °C) y en oscuridad durante 6-8 h. Tras la incubación se para el crecimiento fúngico añadiendo 1 ml de una solución de formalina al 5 %. La extracción de ergosterol se realiza de acuerdo al método descrito por Rousk y Bääth (2007a). Se realiza una centrifugación para concentrar los hongos (5min a 3000 rpm). Seguidamente se separan los lípidos del resto de moléculas, a través de la saponificación extrayendo con 5ml de KOH al 10 % en metanol y con sonificación durante 15 min para liberar las hifas fúngicas de los agregados. Posteriormente se introducen en un baño a 70 °C durante 90 min para favorecer la reacción y extracción de los lípidos. Para el aislamiento de la fase lipídica se procede a lavados con ciclohexanol y centrifugaciones (5 min a 3000 rpm), para finalmente evaporar el ciclohexano

con un flujo de N<sub>2</sub> y redissolver la fracción lipídica en 0,25 ml de metanol (baño a 40 °C durante 15 min). Antes de someter la muestra a una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se procede a filtrar las muestras (0,5 µm de poro) y se coloca en los viales para HPLC. El pico de ergosterol se detecta mediante HPLC y luz UV (282 nm). La fracción del eluyente correspondiente al pico de ergosterol se recoge en viales para el contador de destellos. Posteriormente se añaden 3ml de coctel de Scintilación y se mide la radiactividad en un contador de centelleo. La cantidad de acetato incorporado dentro del ergosterol (pmol de acetato incorporado h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de suelo seco) se utilizó como medida de crecimiento fúngico.

## DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

### Extracción de enzimas inmovilizadas

#### Principio:

Extracción de las sustancias húmicas de los suelos en condiciones neutras (pirofosfato sódico a pH 7,1) para posterior determinación de actividades enzimáticas asociadas a las sustancias húmicas.

#### Reactivos:

Pirofosfato de Sodio 0,1 M, pH 7,1.

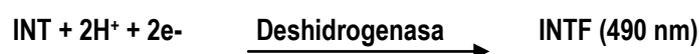
#### Procedimiento:

Se pesan 5 gramos de suelo a los que se añaden 25 ml de pirofosfato sódico 0,1 M pH 7,1 (relación sólido/líquido de 1/5) para posteriormente hacer pasar por la disolución una corriente de N<sub>2</sub> durante 2 minutos. Luego se realiza agitación mecánica en una cámara termostatazada a 5 °C por 20 horas (para evitar desnaturalización de las proteínas). La suspensión se centrifuga a 18.000 g y se filtra a través de una membrana Millipore 0,22 µm (eliminación de bacterias y partículas) para obtener un extracto crudo el cual se concentrará mediante el empleo de tubos Centricon Plus-70 (Centrifugal Filter Devices) (para concentrar y purificar muestras biológicas). Finalmente se anota el volumen recogido y se realizan los análisis para determinar C y actividades enzimáticas.

### Actividad deshidrogenasa

#### Principio

Método de Trevors et al. (1982) modificado por García et al., (1993), cuyo principio se basa en la estimación del idonitrotetrazolio formazán (INTF) formado por reducción cuando el suelo es incubado con 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) como aceptor de electrones, en ausencia de tampón.



#### Reactivos

Aceptor de electrones: cloruro de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil 5-feniltetrazolio (INT) 0,4%.

Metanol

Iodonitrofenil formazano (INTF) 60 µg ml<sup>-1</sup>

#### Procedimiento

A un gramo de muestra tamizada a 2 mm se le añaden 0,4 ml de agua destilada y 0,2 ml de INT (al 0,4 % peso-volumen). A continuación se deja incubar a 20 °C en completa oscuridad durante 20 horas. Posteriormente, se adicionan 10 ml de metanol y se agita vigorosamente durante 2 minutos, filtrando a continuación. Se preparan paralelamente controles sin INT, en los que a 1 g de suelo se le añade 0,6 ml de agua. El extracto se lee en espectrofotómetro a 490 nm.

#### Cálculo

La densidad óptica relativa del instrumento es transformada en concentración mediante una recta patrón obtenida con INTF (iodonitrofenil formazano) en distintas concentraciones. La actividad de la muestra se calcula mediante la ecuación A.22:

$$DH = (C \times V) / (Pm \times G \times T) \quad \text{Ecuación A.22}$$

donde:

DH = actividad deshidrogenasa (µmoles INTF formado g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>).

C = cantidad de INTF de la muestra, en µg ml<sup>-1</sup>.

Pm= peso molecular del INTF (471,3 g mol<sup>-1</sup>).

V = factor de dilución.

G = factor referente al peso del suelo seco.

T = factor de tiempo de incubación; en este caso 20 horas.

Las unidades propuestas para esta actividad enzimática son µmoles INTF g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

### **Actividad ureasa**

#### Principio

Método de Kandeler & Gerber (1988) basado en la determinación del amonio liberado en la incubación de una solución de suelo a 37 °C durante 2 h. La determinación del amonio se realiza a través de la reacción de Berthelot. En este método, el amonio producido por la actividad ureasa reacciona con salicilato y dicloroisocianuro, generando un color verde azulado. La absorbancia a 690 nm es directamente proporcional a la concentración de nitrógeno amoniacal.

#### Reactivos

Urea 0,48 %

KCl 1 M acidulado

### NaOH 0,3 M

Disolución de Salicilato sódico: se disuelven 17 g de salicilato-Na y 120 mg de nitroprusiato sódico en agua destilada y se lleva a un volumen de 100 ml.

Disolución de salicilato-Na/NaOH: mezclar volúmenes iguales de NaOH 0,3 M, salicilato-Na y agua destilada. Preparar diariamente.

Disolución de dicloro-isocianuro de sodio 0,1 % en agua destilada. Preparar diariamente.

Tampón Borato pH 10: 30 g de tetraborato disódico anhidro en 1500 ml de agua destilada templada. Enfriar y ajustar a pH 10 con NaOH (20 %) y llevar a 2000 ml en matraz.

### Procedimiento

Los ensayos se realizan en tubos de 10 ml de volumen, procediéndose del siguiente modo:

*Para suelos:* A 1 g de muestra de suelo se añaden 0,5 ml de urea 0,48 % y 4 ml de tampón borato pH 10. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 1 g de suelo y 4 ml de tampón borato pH 10. Además, se prepara un blanco conteniendo 0,5 ml urea 0,48 % y 4 ml de tampón borato pH 10. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 2 horas. Terminado este período se añaden 0,5 ml de urea 0,48 % al control.

*Para extracto en pirofosfato neutro (complejo humus-enzimas):* A 1 ml de extracto concentrado se añaden 0,5 ml de urea 0,48 % y 4 ml de tampón borato pH 10. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 1 ml de extracto concentrado y 4 ml de tampón borato pH 10. Además, se prepara un blanco conteniendo 0,75 ml urea 0,48 % y 4 ml de tampón borato pH 10. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 2 horas. Terminado este período se añaden 0,75 ml de urea 0,48 % a los controles.

A continuación, en ambos casos, se extrae el amonio liberado utilizando 6 ml KCl 7,4 %, agitando durante 30 minutos. Seguidamente, se centrifuga y filtra la suspensión de suelo, resultando un filtrado de extracto claro en el que se determina amonio por colorimetría como a continuación se detalla.

### **Determinación de amonio**

A 0,5 ml de extracto se adicionan en el siguiente orden: 4,5 ml de agua destilada, 2,5 de salicilato de Na/NaOH y 1 ml de dicloroisocianuro de sodio, y la mezcla se deja reposar 30 min en oscuridad. La absorbancia se mide en espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 690 nm.

### Cálculo

La densidad óptica relativa medida se transforma en concentración mediante una recta patrón obtenida con concentraciones conocidas de amonio. Las unidades propuestas para esta actividad enzimática son  $\mu\text{moles de N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1}$ . La actividad ureasa se calcula usando la siguiente expresión (Ecuación A.23):

$$AU = [(S - B) \times V] / (Pm \times G \times T)$$

*Ecuación A.23*

donde:

AU = actividad ureasa ( $\mu\text{moles de N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1}$ ).

S = cantidad de  $\text{N-NH}_4^+$  en las muestras ( $\mu\text{g de N-NH}_4$ ) obtenida de la curva patrón.

B = cantidad de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\mu\text{g de N-NH}_4^+$ ) para los blancos.

Pm= peso atómico del nitrógeno ( $14 \text{ g mol}^{-1}$ ).

V = volumen total del extracto de incubación.

G = factor relativo a la cantidad suelo seco usado.

T = factor de tiempo de incubación (horas).

### **Actividad fosfatasa alcalina**

#### Principio

Utilización del método descrito por Tabatabai & Bremer (1969), basado en la determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado cuando se incuba el suelo a 37 °C con una disolución tamponada (pH 11,5 para la alcalina) del sustrato artificial p-nitrofenil-fosfato (PNF). El método colorimétrico para medir el p-nitrofenol liberado se basa en el hecho de que las disoluciones alcalinas de este compuesto tienen color amarillo (Trasar-Cepeda et al., 2003).

#### Reactivos

Disolución stock de MUB: Disolver 12,2 g de Tris-hidroximetil-aminometano (THAM), 11,6 de ácido maleico, 14 g de ácido cítrico, y 6,28 de ácido bórico en agua destilada. Añadir 488 ml de NaOH 1 M y enrasar a 1000 ml con agua destilada. Almacenar a 4 °C.

Tampón Universal Modificado (MUB) pH 11,5: tomar 200 ml de la disolución stock y llevar hasta pH 11,5 con NaOH.

Paranitrofenil fosfato (PNF) 0,025 M.

Paranitrofenol: solución madre  $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ , a partir de la cual se preparan otras diluciones para la recta patrón hasta  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

$\text{CaCl}_2$  0,5 M.

NaOH 0,5 M.

#### Procedimiento

*Para suelos:* A 0,5 g de muestra de suelo se le añaden 0,5 ml de p-nitrofenil fosfato 0,025 M y 2 ml de tampón MUB pH 11,5. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 0,5 g de suelo y 2 ml de tampón MUB pH 11,5. Además, se prepara un blanco con 0,5 ml de sustrato y 2 ml de tampón MUB pH 11,5. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 1 hora. Terminado este período se añaden 0,5 ml de sustrato a los controles.

*Para extracto en pirofosfato neutro (complejo humus-enzimas):* A 1 ml de extracto se añaden 0,5 ml de sustrato 0,025 M y 2 ml de tampón MUB pH 11,5. Paralelamente se prepara para cada muestra un control

con 1 ml de extracto concentrado y 2 ml de tampón MUB pH 11,5. Además, se prepara un blanco conteniendo 0,5 ml de sustrato y 2 ml de tampón MUB pH 11,5. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 2 horas. Terminado este periodo se añaden 0,5 ml de sustrato a los controles.

A continuación en ambos casos, todos los tubos se enfrían a 4 °C durante 15 minutos, para frenar la reacción enzimática. Pasado este tiempo, se adicionan a todos los tubos, muestra, control y blanco, 0,5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,5 M y 2 ml de NaOH 0,5 M. Se agita bien para que la suspensión se mezcle completamente. Seguidamente se centrifugan los tubos a 3400 rpm durante 10 min. Se diluye convenientemente el sobrenadante y se mide su absorbancia, en el espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 400 nm.

### Cálculo

La densidad óptica medida se transforma en concentración mediante una recta patrón obtenida con concentraciones conocidas de p-nitrofenol-fosfato. Las unidades propuestas para expresar esta actividad enzimática son  $\mu\text{moles p-nitrofenol liberado g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La actividad fosfatasa se calcula usando la siguiente expresión (Ecuación A.24).

$$AP = (C \times V) / (Pm \times G \times T) \quad \text{Ecuación A.24}$$

donde:

AP = actividad fosfatasa ( $\mu\text{moles p-nitrofenol liberado g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

C = cantidad p-nitrofenol de la muestra en  $\mu\text{g}$ .

V = factor de dilución.

Pm= peso molecular del p-nitrofenol ( $139 \text{ g mol}^{-1}$ ).

G = factor relativo al peso del suelo seco utilizado.

T = factor relativo al tiempo de incubación en horas.

## **Actividad $\beta$ -glucosidasa**

### Principio

El método utilizado toma como referencia el descrito por Tabatabai (1982) y Eivazi & Tabatabai (1988), basado en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol obtenido por la acción de la  $\beta$ -glucosidasa después de incubar el suelo con el sustrato artificial p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (PNG) en medio tamponado a pH 6 y a temperatura de 37 °C, y extracción del p-nitrofenol liberado por filtración después de la adición de CaCl<sub>2</sub> y tampón THAM pH 12, que en medio básico desarrolla un color amarillo.

### Reactivos

Paranitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (PNG) 0,025 M.

Paranitrofenol: solución madre 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , a partir de la cual se preparan otras diluciones para la recta patrón hasta 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

$\text{CaCl}_2$  0,5 M.

NaOH 0,5 M.

Disolución Stock: igual que para la determinación de la actividad fosfatasa

Disolución Tampón MUB-HCl pH 6: mezclar 200 ml de disolución stock con 500 ml de HCl 0,1 M y enrasar a 1 litro con agua destilada

Disolución Tampón THAM-NaOH pH 12 (disolución extractante): pesar 12,2 g de Tris-hidroximetilaminometano, disolver en aproximadamente 800 ml de agua y ajustar con NaOH 0,5 M hasta pH 12 y enrasar a 1 litro con agua destilada.

### Procedimiento

*Para suelos:* A 0,5 g de muestra de suelo se le añaden 0,5 ml de sustrato PNG (p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido) 0,025 M y 2 ml de tampón MUB-HCl de pH 6. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 0,5 g de suelo y 2 ml de tampón. Se prepara un blanco conteniendo 0,5 ml de sustrato y 2 ml de tampón. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 1 hora. Terminado este período se añaden 0,5 ml de sustrato a los controles.

*Para extracto en pirofosfato neutro (complejo humus-enzimas):* A 1 ml de extracto se añaden 0,5 ml de sustrato PNG (p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido) 0,025 M y 2 ml de tampón MUB-HCl pH 6. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 1 ml de extracto concentrado y 2 ml de tampón. Además, se prepara un blanco conteniendo 0,5 ml de sustrato y 2 ml de tampón. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 2 horas. Terminado este período se añaden 0,5 de sustrato a los controles.

A continuación, en ambos casos, todos los tubos se enfrían a 4 °C en baño con hielo durante 15 minutos, para frenar la reacción enzimática. Pasado este tiempo, se adicionan a todos los tubos, muestra, control y blanco, 0,5 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M y 2 ml de disolución THAM-NaOH 0,1 M, pH 12. Se agita bien para que la suspensión se mezcle completamente. Seguidamente se centrifugan los tubos a 3000 rpm durante 10 min. Se diluye convenientemente el sobrenadante y se mide su absorbancia en el espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 400 nm. El  $\text{CaCl}_2$  se añade para bloquear la reacción y para provocar la dispersión de coloides que podrían interferir en la lectura espectrofotométrica, y la disolución THAM-NaOH sirve para salificar el producto de reacción obtenido dándole color amarillo.

### Cálculo

La densidad óptica relativa medida se transforma en concentración mediante una recta patrón obtenida con concentraciones conocidas de PNF. Las unidades propuestas para expresar esta actividad enzimática son  $\mu\text{moles PNF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La actividad  $\beta$ -glucosidasa se calcula usando la siguiente expresión (Ecuación A.25):

$$AG = (C \times V) / (Pm \times G \times T) \quad \text{Ecuación A.25}$$

donde:

AG = actividad  $\beta$ -glucosidasa  $\mu\text{mol PNF g}^{-1}\text{suelo seco h}^{-1}$

C = concentración de PNF ( $\mu\text{g}$ ) en el extracto, según la recta de calibración obtenida.

V = factor de dilución.

Pm= peso molecular del p-nitrofenol ( $139 \text{ g mol}^{-1}$ ).

G = factor referente al peso del suelo seco.

T = factor relativo al tiempo de incubación, en horas.

## **Actividad polifenol oxidasa**

### Principio

Utilización del método descrito por Allison, (2006), basado en la determinación colorimétrica de la tirosina obtenida por la acción de la polifenol oxidasa después de incubar el suelo en el sustrato artificial pirogalol en un medio tamponado Tris-HCl 50 mM ajustado a pH 7 y a temperatura de 30°C durante 1 hora.

### Reactivos

Tris(hidroxi) aminometano- HCl (50mM) a pH 7

Pirogalol 50mM

EDTA

Ácido ascórbico (4,2mM)

### Procedimiento

*Para suelos:* A 1 g de muestra de suelo se le añaden 30 ml de tampón Tris-HCl 50 mM ajustado a pH 7. Esta suspensión se mantiene en agitación durante 30 minutos, tras los cuales se procede a retirar 1 ml para cada muestra y un 1 ml para cada control de cada muestra. A las muestras se les adiciona 1 ml sustrato pirogalol 50 mM. Además, se prepara un blanco con 1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH7 y 1 ml de sustrato pirogalol 50 mM. Muestra, control y blanco se incuban en baño termostático con agitación suave a 30 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se añade 1 ml de sustrato pirogalol 50 mM a las muestras control.

Para extracto en pirofosfato neutro (complejo humus-enzimas): a 1ml de muestra se le añaden 30 ml de tampón Tris-HCl 50 mM ajustado a pH 7. Esta suspensión se mantiene en agitación durante 30 minutos, tras los cuales se procede a retirar 1 ml para cada muestra y un 1 ml para cada control de cada muestra. A las muestras se les adiciona 1 ml sustrato pirogalol 50 mM. Además, se prepara un blanco con 1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7 y 1 ml de sustrato pirogalol 50 mM. Muestra, control y blanco se incuban en baño termostático con agitación suave a 30 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se añade 1 ml de sustrato pirogalol 50 mM a las muestras control.

A continuación en ambos casos, todos los tubos se enfrían a 4 °C durante 15 minutos, para frenar la reacción enzimática. Pasado este tiempo, se adicionan a todos los tubos, muestra, control y blanco 3 ml de ácido ascórbico 4,2 mM y para los suelos control se les adiciona 1 ml de sustrato pirogalol 50 mM Se agita

bien para que la suspensión se mezcle completamente. Seguidamente se centrifugan los tubos a 3400 rpm durante 10 min. Se diluye convenientemente el sobrenadante y se mide su absorbancia, en el espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 460 nm.

#### Cálculos:

La densidad óptica relativa medida se transforma en concentración mediante una recta patrón obtenida con concentraciones conocidas de pirogallol. Las unidades propuestas para expresar esta actividad enzimática son  $\mu\text{moles pirogallol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ . La actividad polifenol oxidasa se calcula usando la siguiente expresión:

$$\text{AE polifenol oxidasa} = \frac{[\text{pte} \cdot \text{Abs-ordenada}] \cdot 150 \cdot V}{(\text{Peso suelo seco} \cdot \text{horas})} \quad \text{Ecuación A.26}$$

Donde:

AE polifenol oxidasa = actividad polifenol oxidasa ( $\text{mmol de pirogallol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

V= factor de dilución

### **Actividad glicina aminopeptidasa**

#### Principio

Utilización del método descrito por Sinsabaugh, (1993), basado en la determinación colorimétrica de la p-nitroanilina obtenida por la acción de la glicina aminopeptidasa después de incubar el suelo en el sustrato artificial glicina p-nitroanilida en un medio tamponado Tris-HCl 50 mM ajustado a pH 7 y a temperatura de 40 °C durante 2 hora.

#### Reactivos

Ácido tris(hidroxi)aminometano- HCl (50mM) a pH 7

Glicina p-nitroanilida 50mM

Ácido acético (0,75 % v/v)

#### Procedimiento

*Para suelos:* A 0,5 g de muestra de suelo se le añaden 2 ml de tampón tris-HCl 50mN a pH 7 y 2 ml de sustrato glicina p-nitroanilida 50 mM. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 0,5 g de muestra y 2 ml de tampón tris-HCl 50 mN a pH 7. Además se prepara un blanco con 2 ml de tampón tris-HCl 50 mN a pH 7. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 40 °C durante 2 hora. Terminado este período se añaden 0,5 ml de sustrato a los controles.

*Para extracto en pirofosfato neutro (extracto enzima-humus):* A 0,5 ml de extracto concentrado se le añaden 2 ml de tampón tris-HCl 50 mN a pH 7. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 0,5 ml de extracto concentrado y 2 ml de tampón tris-HCl 50 mM a pH 7. Además, se prepara un blanco conteniendo 0,5 ml de agua destilada y 2 ml de tampón tris-HCl 50 mN a pH 7. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a 37 °C durante 2 horas. Terminado este período se añaden 2 ml de sustrato a los controles.

A continuación en ambos casos, todos los tubos se enfrían a 4 °C durante 15 minutos, para frenar la reacción enzimática. Pasado este tiempo, se adicionan a todos los tubos, muestra, control y blanco, se añade 1ml de ácido acético (0,75 % v/v). Se agita bien para que la suspensión se mezcle completamente. Seguidamente se centrifugan los tubos a 3400 rpm durante 10 min. Se diluye convenientemente el sobrenadante y se mide su absorbancia, en el espectrofotómetro, después de haber ajustado el equipo a cero con el blanco, a una longitud de onda de 410 nm.

#### Cálculos:

La densidad óptica relativa medida se transforma en concentración mediante una recta patrón obtenida con concentraciones conocidas de p-nitroanilina. Las unidades propuestas para expresar esta actividad enzimática son  $\mu\text{moles PNA g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La glicina aminopeptidasa se calcula usando la siguiente expresión.

$$\text{AE glicina aminopeptidasa} = \frac{[(\text{pte} \cdot \text{Abs-ordenada}) \cdot 10 \cdot \text{V}]}{(\text{Peso suelo seco} \cdot \text{h})} \quad \text{Ecuación A.27}$$

donde:

AE glicina aminopeptidasa: actividad enzimática glicina aminopeptidasa ( $\mu\text{moles p-nitroanilina g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

V: factor de dilución

### **Ecotoxicidad**

#### Principio

Mediante un test de bioluminiscencia (Multitox) se determinó la ecotoxicidad de las enmiendas utilizadas. Dicho método utiliza como especie testigo la bacteria *Photobacterium phosphoreum* que tiene la particularidad de emitir luz en un medio salino, disminuyendo esta luminiscencia en presencia de sustancias tóxicas. Tras una incubación de un extracto acuoso de la muestra con la bacteria se determina la cantidad de luz emitida y se determina el porcentaje de inhibición de la emisión de luminiscencia en cada muestra.

#### Reactivos

Cloruro sódico

Fotobacteria (*Photobacterium phosphoreum*)

#### Procedimiento

Las bacterias son resuspendidas con una solución al 2 % de cloruro sódico, enfriada 15 minutos a 15 °C en un incubador Peltier/Multitox (500  $\mu\text{l}$  de ClNa 2 % a una pesada de 2 mg de fotobacteria, *Photobacterium phosphoreum*), seguidamente dicha suspensión se diluye adicionando NaCl al 3 % hasta alcanzar una emisión de luz de 2000 RLU por alícuota de 100  $\mu\text{l}$ . Cada muestra, en nuestro caso los extractos de las muestras obtenidas mediante el método EP (Extraction Procedure), son saladas previamente añadiendo cloruro sódico hasta una concentración de un 3 % para evitar efectos osmóticos, se incuban a 15 °C 15 min. Para iniciar el ensayo se pipetea 100  $\mu\text{l}$  de suspensión de fotobacterias a tubos de incubación y se comprueba que todas las alícuotas muestran la misma emisión de luz  $\pm 10\%$ . A continuación se pipetea a cada tubo con las fotobacterias, 100  $\mu\text{m}$  de muestra. Tras una incubación de 15 minutos a 15 °C se

determino el valor de emisión de luz y porcentaje de inhibición en cada muestra, utilizando el programa "Screening toxicidad" del Luminometro Multitox de Gomensoro/Biotech.

El valor de este ensayo se expresa con el parámetro  $EC_{50}$  o concentración efectiva que corresponde a la concentración de sustancias tóxicas que provoca la desaparición del 50 % de las bacterias. El programa "Ecotoxicidad" del Luminometro Multitox de Gomensoro/Biotech permite calcular el valor de  $EC_{50}$  de la muestra. Para ello se realiza una serie de diluciones de la muestra y a partir de su efecto sobre la luminiscencia de *Photobacterium phosphoreum* es posible calcular el valor de  $EC_{50}$  dilución de la muestra a la cual se produce una caída del 50 % de la luminiscencia de la fotobacteria, tras su incubación a 15 °C durante 15 minutos.

### Cobertura y diversidad vegetal

El porcentaje de cubierta vegetal se determinó mediante la utilización de transectos. El porcentaje de cobertura vegetal se obtuvo teniendo en cuenta el número de especies en intersección con el transecto en función con el número total de puntos posibles. Para el establecimiento de la diversidad vegetal se aplicó el índice de Shannon ( $H_{veg}$ ) (Ecuación A.28).

$$H_{PLFA} = -\sum_{i=1}^n p_i \ln p_i \quad \text{Ecuación A.28}$$

donde:

$p_i$ : es la abundancia relativa de cada especie vegetal con respecto a la suma total.

$n$ : es el número total de especies vegetales detectadas.

### Análisis estadístico

Todos los datos se sometieron a análisis estadístico de la varianza (ANOVA) de una vía, mediante el programa Statgraphics Plus 2.1, utilizando el test MDS (Mínima Diferencia Significativa) con un nivel de confianza del 95% para la diferencia entre las medias, según el test de rango múltiple Fisher. Además se realizaron análisis multivariantes para el estudio de coeficientes de correlación, y análisis factoriales para el establecimiento de grupos muestrales.



# **CAPÍTULO 4**

---

## **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

---



## **CAPÍTULO 4.1**

---

**ESTUDIO A NIVEL DE MICROCOSMO DEL EFECTO DE  
LA APLICACIÓN DE ALTAS DOSIS DE ENMIENDAS**

---



## 4.1 ENSAYO PRELIMINAR: EFECTO DE LA ADICIÓN DE DOSIS ELEVADAS DE ENMIENDA ORGÁNICA A UN SUELO DEGRADADO (LABORATORIO)

### INTRODUCCIÓN

La evolución de la sociedad ha llegado, en el momento actual, a un modelo de vida basado en un constante incremento del consumo. La consecuencia inmediata es hacer frente a una serie de subproductos derivados de su propio comportamiento, que ponen en entredicho la continuidad de dicho modelo.

Este problema tiene una gran influencia sobre el medio ambiente. Evitar esta incidencia es realmente difícil, ya que esto equivaldría a renunciar a toda actividad, tanto humana como industrial. Por tanto, es necesario tomar conciencia de esta situación y actuar en consecuencia, tratando de poner en práctica las medidas necesarias para evitar su empeoramiento. Por ello, dar una salida correcta a los residuos orgánicos en general, en particular a los de origen urbano, es una problemática en constante aumento, haciéndose pues imprescindible el acometer una gestión correcta de los mismos.

Por otra parte, un suelo con bajo contenido en materia orgánica y por ende con escasa actividad microbiana presentará una baja fertilidad edáfica, lo que finalmente dificultará la instauración de una cubierta vegetal capaz de mantener niveles adecuados de materia orgánica en el suelo y de proteger al mismo frente a los fenómenos erosivos que conducen a su degradación. En estos suelos degradados, el modo más eficaz de emprender su recuperación es la mejora de su calidad mediante la incorporación de una enmienda orgánica.

La introducción de un enmendante orgánico en el suelo promueve el desarrollo de reacciones químicas, físico-químicas y procesos microbiológicos que conducen a modificaciones en las características físicas del suelo, lo que se manifiesta en un aumento de la capacidad de retención de agua, la capacidad de infiltración, la porosidad y la estabilidad estructural (Roldán et al., 1996). A nivel químico, la materia orgánica amortigua cambios de pH, aumenta la capacidad de intercambio catiónico del suelo, produce una lenta liberación de nutrientes tales como nitrógeno, fósforo y azufre, y reduce la biodisponibilidad de compuestos tóxicos al combinarse con moléculas orgánicas (Moreno, 1997). A nivel microbiológico, la materia orgánica actúa como fuente de energía y nutrientes para los microorganismos del suelo (García et al., 1992).

Esta fuente de energía y nutrientes favorece el desarrollo de las poblaciones microbianas autóctonas del suelo (Ros et al., 2003; Tejada et al., 2007a; Tejada et al., 2007b; Bastida et al., 2007), lo cual, se traduce a su vez en un incremento de las enzimas y metabolitos. Las enzimas son las responsables de la mayor parte de las reacciones que intervienen en los procesos de mineralización e inmovilización de los nutrientes en el suelo y por tanto están en relación con la disponibilidad de los mismos para la planta.

Es importante destacar la relevancia de los microorganismos y de su actividad en la calidad de un suelo, y por tanto, en su conservación y mantenimiento, así como en su recuperación cuando se encuentra

sometido a procesos degradativos (Powlson et al., 1987; Ros et al., 2000). Para estudiar el estado y cambios que experimenta la calidad de un suelo tras la incorporación de enmiendas orgánicas, pese a que todos los parámetros pueden contribuir a aportar información valiosa sobre los diferentes aspectos de dicha calidad, aquellos relativos a su actividad microbiana, como ya se ha indicado, son los que tienen una mayor sensibilidad frente a cualquier alteración que pueda sufrir el ecosistema tales como contaminación, degradación diversa, e incluso desertificación (Dick & Tabatabai, 1993; Trasar-Cepeda et al., 1998; García et al., 2000).

Ya que la adición de enmiendas orgánicas a suelos degradados ha demostrado ser una buena estrategia para su recuperación, desde el punto de vista de fijar la mayor cantidad posible de C en estos suelos tan deprovistos de materia orgánica, sería interesante adicionar dichas enmiendas orgánicas a una dosis lo más elevada posible en la recuperación de estos suelos, siempre que esta adición no entrañe algún tipo de efecto negativo sobre la calidad del suelo y el medio ambiente. Es bien sabido que la adición de residuos orgánicos urbanos al suelo no está exenta de riesgos, en particular cuando se emplean a dosis elevadas como es el caso del estudio que nos ocupa, derivados fundamentalmente de su contenido en metales pesados, posible elevada salinidad y contenido en sustancias fitotóxicas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el estudio propuesto es una estrategia ambiental y no agrícola, por lo que la enmienda no se adiciona al suelo de modo reiterado sino que se trata de una adición única, no obstante, ha de llevarse a cabo con precaución, verificando su efecto sobre la "vida" del suelo. El objetivo sería mejorar la fertilidad del suelo degradado al tiempo que se consigue fijar la mayor cantidad posible de C, eliminando estos residuos de un modo racional y sin perjuicio para el medio ambiente.

## **OBJETIVO**

El objetivo de este experimento ha sido evaluar la viabilidad de aportar grandes cantidades de C a un suelo degradado, mediante el empleo de dosis elevadas de enmiendas orgánicas para su recuperación, sin que de ello se deriven efectos negativos para el medio ambiente y el ecosistema, y en particular, para el desarrollo y actividad de los microorganismos del suelo. Para ello, un suelo degradado típico de ambientes semiáridos fue enmendado con dosis crecientes de dos materiales orgánicos de origen urbano (fracción orgánica de la basura doméstica, RF, y compost de lodo de EDAR y RF) y sometido a un periodo de incubación de dos meses durante el que se monitorizaron periódicamente, diversos parámetros físico-químicos, químicos y microbiológicos. A partir de este experimento se establecieron las dosis de enmienda orgánica más apropiadas a utilizar en los ensayos posteriores a realizar en este trabajo de Tesis doctoral.

## **DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES UTILIZADOS**

### **Suelo**

Para este ensayo se eligió un suelo típico de zonas semiáridas (Xerosol cálcico). Dicho suelo presenta un cierto estado de degradación derivado posiblemente de su utilización agrícola de forma inadecuada y su posterior abandono debido a su baja rentabilidad. Este suelo procede de una zona localizada en el paraje de Cañada Hermosa, en el término municipal de Alcantarilla, en la Región de Murcia. En la actualidad la

zona seleccionada para el muestreo presenta una baja cobertura vegetal, lo cual unido a las características edafoclimáticas y de relieve de la zona determina que el suelo seleccionado sea propenso a una erosión de tipo hídrico. Las principales características de este suelo se muestran en la Tabla 4.1.1.

Como se observa en la Tabla 4.1.1 el suelo presenta un contenido en carbono orgánico total ( $C_{org}$ ) bajo (0.73%) siendo el contenido medio de  $C_{org}$  de suelos naturales de la zona no sometidos a procesos de degradación de un 2% (García, 2000). El contenido de N total es de 0.1% con lo cual la relación C/N es de 7.3 que se puede considerar baja. No presenta riesgos de salinización ya que su conductividad eléctrica ( $1,7 \text{ dS m}^{-1}$ ) es más baja que el umbral establecido para suelos con riesgo de salinización ( $>2 \text{ dS m}^{-1}$ ). Asimismo hay que destacar su alto contenido en carbonatos (58 %).

**Tabla 4.1.1. Características del suelo (suelo semiárido, Murcia, España)**

pH ( $\text{H}_2\text{O}$ , 1:5)	7,55 (0,21)
Conductividad eléctrica (1:5) ( $\text{dS m}^{-1}$ )	0,34 (0,01)
C orgánico total, $\text{g kg}^{-1}$	7,34 (2,10)
Nitrógeno total, $\text{g kg}^{-1}$	1,28(0,10)
Fosforo total, $\text{mg kg}^{-1}$	535 (92)
Potasio total, $\text{mg kg}^{-1}$	5,68 (0,85)
Carbonatos, $\text{g } 100\text{g}^{-1}$	58,53 (11,14)
Sulfatos, $\text{meq } 100\text{g}^{-1}$	0,14 (0,02)
Cloruros, $\text{meq } 100\text{g}^{-1}$	0,02 (0,01)
Textura	franco-arenosa
Arena fina (0.25-0.05 mm) ( $\text{g}/100\text{g}$ )	63,8
Arena gruesa (2-0.25 mm) ( $\text{g}/100\text{g}$ )	13,2
Limo (0.05-0.002 mm) ( $\text{g}/100\text{g}$ )	7,2
Arcilla (<0.002 mm) ( $\text{g}/100\text{g}$ )	15,8

### Enmendantes orgánicos

Los dos materiales utilizados como enmiendas orgánicas en este experimento fueron la fracción orgánica de las basuras domésticas obtenida en la planta de tratamiento de residuos de CESPFA-Ferrovial, situada en la carretera de Mula (Murcia) y un compost producido en dicha planta a partir de una mezcla de lodo de depuradora de aguas residuales y la fracción orgánica de las basuras domésticas en una proporción 1:2 (lodo: RF). El proceso de compostaje de la mezcla Lodo:RF se realizó en reactores horizontales a escala industrial en una nave cerrada. El proceso está totalmente automatizado, controlándose los parámetros fundamentales del proceso como son la temperatura, la humedad y la oxigenación de la mezcla. En este proceso se alcanzó la temperatura óptima para la desinfección del material ( $60\text{-}65^\circ \text{C}$  durante 48 horas) con el fin de conseguir que la mezcla se compostara de modo homogéneo y que la oxigenación de la masa fuese adecuada, el material era volteado en el reactor mediante unos tornillos mecánicos y se insuflaba aire a la mezcla. De este modo se obtuvo un compost cuyo compostaje se había realizado de forma acelerada en túneles de aireación diaria. Tras la finalización del proceso de compostaje se realizó un proceso de afino del compost mediante la retirada de los materiales inertes remanentes y su tamización.

Las características principales de estos dos materiales se reflejan en la Tabla 4.1.2

**Tabla 4.1.2. Características de los enmendantes orgánicos usados en el suelo (materia seca)**

	Residuo fresco	Compost
pH (H <sub>2</sub> O, 1:5)	7,51 (0,21)	7,06 (0,26)
Conductividad eléctrica (1:5) (dS m <sup>-1</sup> )	2,96 (0,08)	4,17 (0,12)
Carbono orgánico total (g kg <sup>-1</sup> )	30,45 (0,87)	28,05 (0,80)
Nitrogeno total Kjeldahl (g/100g)	1,19 (0,02)	2,00 (0,06)
Fosforo total (g/100g)	0,20 (0,01)	1,08 (0,06)
Potasio total (g/100g)	0,79 (0,02)	0,81 (0,03)
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	208,82 (6,03)	294,58 (8,50)
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	574,40 (16,58)	621,05 (17,92)
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	10419,37 (300,79)	18420,42 (531,76)
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	113,69 (3,28)	182,09 (5,26)
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	83,12 (2,40)	98,97 (2,86)
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	47,08 (1,35)	49,86 (1,44)
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	1,79 (0,05)	2,13 (0,06)
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	136,99 (3,95)	139,36 (4,02)

## DISEÑO EXPERIMENTAL

En contenedores de plástico de 500cc, se colocaron 200g de suelo a los que se añadieron diferentes dosis de cada una de las enmiendas orgánicas, secas al aire y molidas, mezclando concienzudamente el suelo con la enmienda. Las enmiendas se aplicaron a dosis, en peso fresco de 1, 2, 3, 5, 8, 15 y 20 %, que equivalen aproximadamente a 30, 60, 90, 150, 240, 450 y 600 t ha<sup>-1</sup> de material orgánico húmedo. Paralelamente se prepararon controles de suelo sin ningún tipo de enmienda. Tanto los controles como los tratamientos se prepararon por triplicado. Después de humedecer los suelos al 60% de su capacidad de retención hídrica (CRH), los contenedores se mantuvieron durante dos meses en una cámara de incubación, en condiciones controladas de temperatura (24-28 °C) y humedad ambiente (60-80%). La humedad del suelo se controlaba por pesada, manteniéndola entre el 40 y el 60% de su CRH durante todo el periodo experimental mediante la adición de agua destilada cuando era necesario. La monitorización de los diferentes parámetros a analizar se realizó a las 2 horas de la enmienda (T0) y después de 1 mes (T1) y 2 meses (T2) de incubación. Con el fin de no disturbar las mezclas suelo-enmiendas con cada uno de los muestreos, se prepararon tantas series de tratamientos, con sus respectivos controles, como puntos de muestreo, realizando los muestreos de modo destructivo (se tomaba para análisis todo el suelo del contenedor). Los parámetros analizados en los suelos de cada uno de los puntos de muestreo fueron los siguientes:

- *pH y conductividad eléctrica.*
- *Carbono orgánico total (C<sub>org</sub>).*
- *Carbono orgánico hidrosoluble (C<sub>hidr</sub>).*

- Carbohidratos y polifenoles hidrosolubles.
- Respiración del suelo.
- ATP.
- Actividades enzimáticas: deshidrogenasa, ureasa, fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasa.
- Ecotoxicidad.

## RESULTADOS

### Parámetros químicos

#### pH y conductividad eléctrica.

El pH del suelo control que se encontraba cercano a 8, prácticamente no se vio modificado por la adición al mismo del residuo fresco o del compost, independientemente de la dosis aplicada (Figura 4.1.1; Anexo I; Tabla I.1). Dicho pH tampoco variaba con el tiempo de incubación, encontrándose en todos los casos en el rango de pH 7-8.

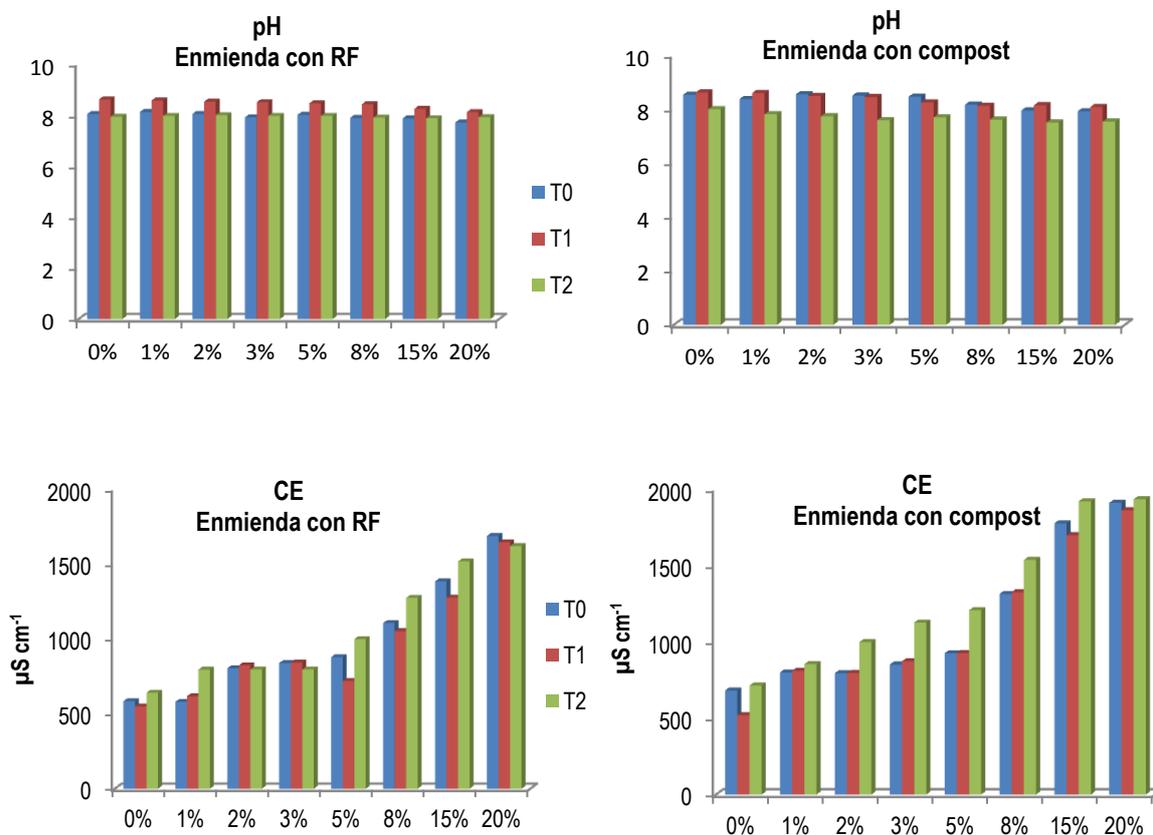


Figura 4.1.1. Evolución de los valores de pH y conductividad eléctrica (CE) en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente, después de la enmienda.

La conductividad eléctrica (CE) del suelo aumentaba gradualmente con el incremento de la dosis aplicada de ambas enmiendas orgánicas (Figura 4.1.1; Tabla I.1 del Anexo), observándose los mayores valores de CE en los suelos enmendados con las dosis más altas de compost (dosis 15 y 20%). Este aumento de la CE es lógico debido a las sales que contienen estos materiales orgánicos y que contribuyen a la CE del suelo donde se aplican. Dicho aspecto se considera uno de los factores limitantes a la hora de la utilización de estos enmendantes en agricultura por lo que la dosis más altas de los mismos pueden considerarse como más perjudiciales tanto para la planta como por la posible lixiviación de sales a los acuíferos. El hecho de que la CE sea algo más alta en los tratamientos con dosis del 15 y 20% de compost que en el caso del RF es atribuible a la mayor conductividad del compost (Tabla 4.1.2) y a que en materia seca el contenido de compost por peso de suelo era mayor que el de RF con lo cual la aportación de sales es algo mayor en el primero. No obstante, en ningún caso se sobrepasa el valor de 2 dS/m establecido como límite para riesgo de salinización del suelo.

### **Carbono y sus fracciones**

#### **Contenido en carbono orgánico total ( $C_{org}$ )**

El  $C_{org}$  aumentaba, como era de esperar, con el incremento de la dosis de enmienda orgánica adicionada independientemente de si la enmienda era un residuo fresco o un compost (Figura 4.1.2; Tabla I.2 del Anexo).

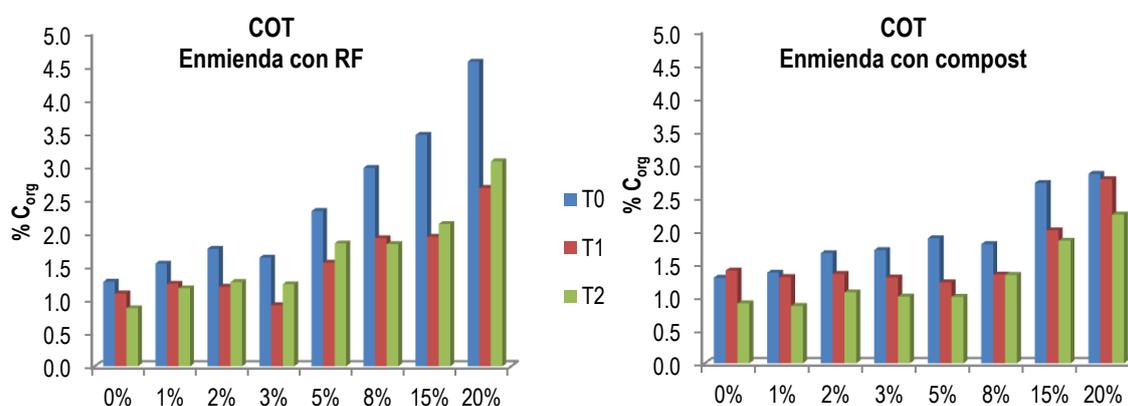


Figura 4.1.2. Evolución del contenido de carbono orgánico total en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente, después de la enmienda.

Inmediatamente después de la enmienda (T0) se observó un mayor incremento del contenido de  $C_{org}$  en los suelos enmendados con RF que en los enmendados con compost (Figura 4.1.2; Tabla I.2 del Anexo), lo cual es explicable por el mayor contenido de materia orgánica y carbono oxidable del RF en comparación con el compost. En todos los casos se observó una disminución de los contenidos de  $C_{org}$  conforme avanzaba el tiempo de incubación, lo cual es debido a la degradación por los microorganismos de los

componentes más lábiles de la materia orgánica añadida con las enmiendas. Esta degradación es mayor en los suelos enmendados con RF que en los enmendados con compost, como corresponde a la mayor estabilidad de la materia orgánica de esta enmienda, debido al proceso de estabilización sufrido durante el compostaje. Así, se observa que tras 60 días de incubación se mantiene un contenido mayor de  $C_{org}$  en el suelo enmendado con compost que en el enmendado con RF en la mayoría de las dosis ensayadas.

### Carbono orgánico hidrosoluble

Con las dos enmiendas orgánicas se producía un incremento lógico de la fracción hidrosoluble de C orgánico ( $C_{hidr}$ ) en el suelo, mayor cuanto mayor era la dosis aplicada. En el caso de los suelos enmendados con compost el incremento de dicha fracción al inicio de la incubación era notablemente mayor que el de los suelos enmendados con RF en todas las dosis aplicadas (Figura 4.1.3; Tabla I.3 del Anexo). El  $C_{hidr}$  representa la fracción de C más lábil y por tanto más fácilmente utilizable por los microorganismos del suelo para obtener energía. Hay que señalar que el contenido de  $C_{hidr}$  disminuía claramente con el tiempo de incubación debido, sin duda, a la utilización por parte de los microorganismos de esta fracción de C para obtener energía y para aumentar su biomasa. No obstante, hay que indicar que el  $C_{hidr}$  constituye una fracción muy dinámica estando sujeta a continuos procesos de síntesis y degradación.

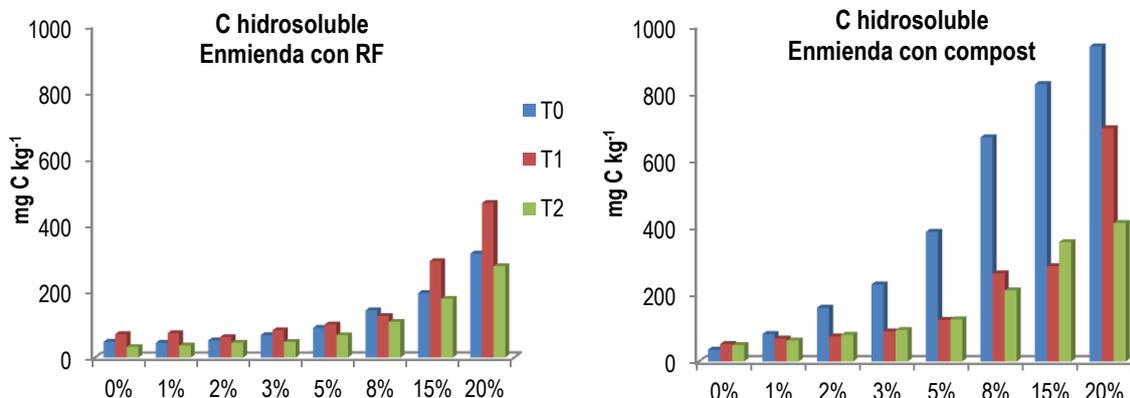


Figura 4.1.3. Evolución del contenido de carbono hidrosoluble en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente.

### Carbohidratos y polifenoles hidrosolubles

Los carbohidratos hidrosolubles (Figura 4.1.4; Tabla I.4 del Anexo) presentaron un comportamiento similar al del  $C_{hidr}$  lo cual es lógico ya que dichos compuestos están incluidos en la fracción de C orgánico representada por el  $C_{hidr}$ . Hay que destacar el fuerte incremento observado en el contenido de carbohidratos con el aumento de la dosis de compost aplicada, aunque dicho aumento disminuía con el transcurso de la incubación. Aun así, el contenido de carbohidratos dos meses después de la enmienda (T2) era más alto en el rango de dosis de compost de 8 a 15% que en las correspondientes del RF.

La tendencia de los polifenoles hidrosolubles (Figura 4.1.4; Tabla I.4 del Anexo) era también muy similar a la ya observada para el  $C_{\text{hidr}}$  y los carbohidratos es decir, se observaba un incremento con el aumento de la dosis aplicada de enmienda orgánica, que al inicio de la incubación era mayor en los suelos enmendados con compost que en los enmendados con RF, disminuyendo los contenidos de polifenoles con el tiempo de incubación. Los polifenoles son sustancias que a determinadas dosis se consideran fitotóxicas por lo que un alto contenido de éstos en el suelo sería perjudicial. No obstante, como ya se ha indicado, tanto en los suelos enmendados con RF como en los enmendados con composts el contenido de polifenoles se reducía considerablemente con el tiempo, debido a la biodegradación que sufren este tipo de compuestos.

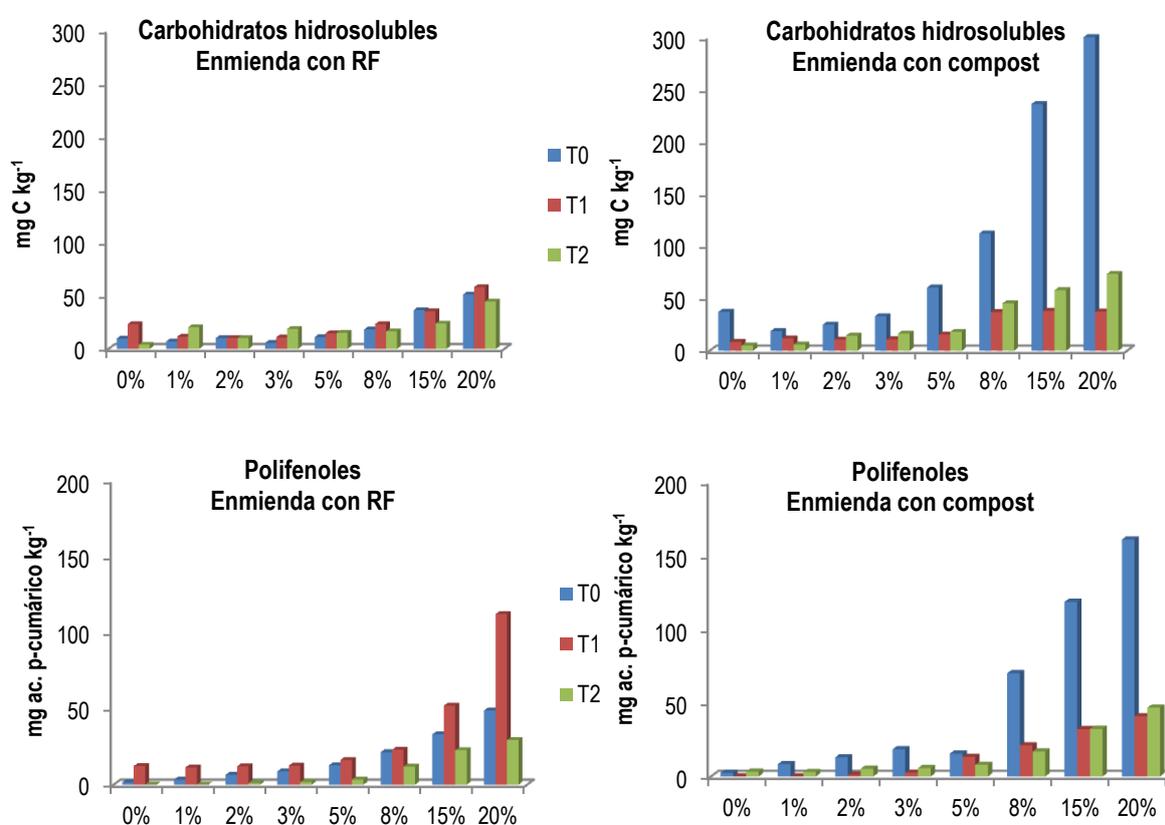


Figura 4.1.4 Evolución del contenido de carbohidratos y polifenoles hidrosolubles en los suelos enmendados y el control durante el período de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente, después de la enmienda.

### **Actividad general de las poblaciones microbianas**

#### **Respiración microbiana del suelo**

La respiración microbiana es un parámetro que refleja la dinámica de descomposición (mineralización) de la materia orgánica y la actividad de los microorganismos existentes en el medio; dado el importante papel que juegan los microorganismos en la construcción de la estructura del suelo y en su fertilidad, es de gran interés establecer como se ve afectado este parámetro por el empleo de grandes dosis de enmiendas orgánicas.

En la Figura 4.1.5 se muestran las gráficas típicas de respiración acumulativa tanto al inicio (T0) de la incubación como después de 30 y 60 días (T1 y T2, respectivamente). En el caso del tratamiento con RF al inicio de la incubación (T0), se observó un gran incremento de la respiración durante los primeros 9 días del experimento de respiración, sobre todo en los suelos enmendados con las dosis más altas, produciéndose a continuación una ralentización de la respiración de los 9 a los 21 días, debido a que van disminuyendo los substratos fácilmente mineralizables por los microorganismos. Dicha ralentización es menor lógicamente en las dosis más altas.

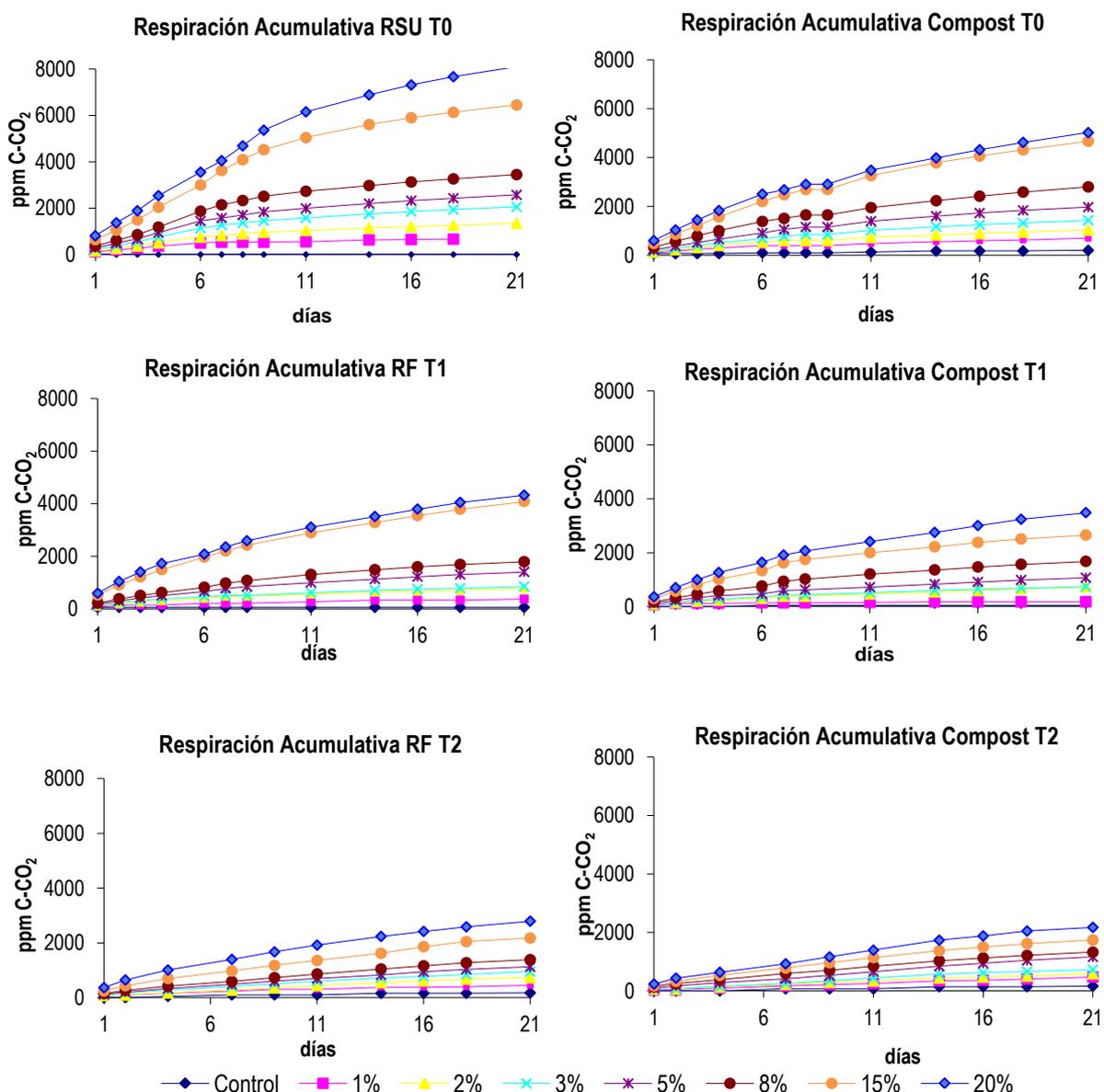


Figura 4.1.5. Curvas acumulativas de desprendimiento de C-CO<sub>2</sub> en los suelos control y enmendados durante el periodo de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente, después de la enmienda.

En el caso del suelo enmendado con el compost, en el inicio de la incubación (T0) no se observaba un incremento inicial de la tasa de desprendimiento de CO<sub>2</sub> tan alto como en el caso del suelo enmendado con RF, sino que dicho incremento de la respiración era más progresivo a lo largo de todo el experimento como corresponde a la naturaleza más estable y estructurada de su materia orgánica. Destaca, como en el caso anterior, que las dosis de 15 y 20% provocaban un incremento mayor de la respiración que el resto de dosis ensayadas, no observándose efecto inhibitorio alguno sobre la actividad microbiana del suelo como consecuencia del empleo de estas dosis elevadas de enmienda.

Cuando se analizan los valores de desprendimiento acumulativo de C-CO<sub>2</sub> de las muestras que han sufrido 30 días de incubación (T1) se observa que con ambas enmiendas el incremento de dicha respiración con respecto al suelo control es menor que la de las muestras al inicio de la incubación (T0) lo cual es debido a la degradación en este periodo de tiempo de los compuestos de carbono más fácilmente biodegradables (Figura 4.1.5). Al comparar el suelo enmendado con el RF con el enmendado con el compost se observa un comportamiento similar al de las muestras de T0, es decir, un mayor incremento de la respiración en el suelo enmendado con el RF que en el enmendado con composts, sobre todo en las dosis de 15 y 20%.

Las tasas de respiración del suelo con los diferentes tratamientos de compost o RF disminuían aún más tras 60 días de incubación como se observa en la Figura 4.1.5 debido sin duda al agotamiento de los substratos más disponibles para los microorganismos para obtener energía.

Respecto a la respiración basal es decir la cantidad de CO<sub>2</sub> desprendido por día (Figura 4.1.6; Tabla I.5 del Anexo) se observan unos resultados que resumen el comportamiento ya indicado para el desprendimiento acumulativo de CO<sub>2</sub>.

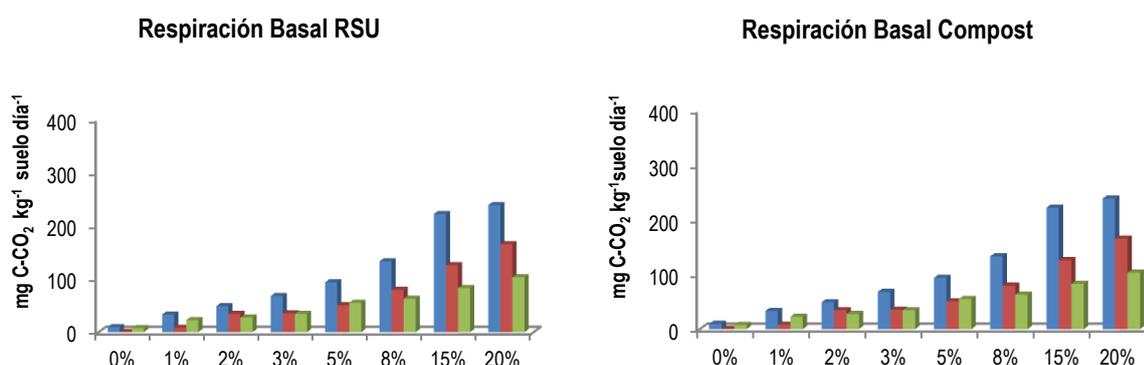


Figura 4.1.6. Evolución de la respiración basal de los suelos enmendados y control durante el periodo de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente, después de la enmienda.

Así, se producía un incremento gradual de la respiración conforme aumentaba la dosis aplicada tanto del RF como del compost, aunque este incremento con las dosis aplicadas era mayor en el caso del RF que en el del compost. Este hecho indica que debido a su menor nivel de estabilización, la materia orgánica del

RF posee una mayor fracción de compuestos biodegradables que el compost, el cual posee una materia orgánica más estabilizada o humificada y por tanto más resistente a la biodegradación. En este último caso la mineralización de la materia orgánica con el tiempo era más gradual que en el suelo enmendado con RF. Así podemos indicar que los efectos beneficiosos de las enmiendas orgánicas sobre el suelo degradado van a perdurar más en el caso del compost que en el del RF.

### Contenido de ATP

Al igual que la respiración, el contenido de ATP es un buen indicador de la biomasa microbiana activa del suelo. Por tanto, la evolución de este parámetro reflejará las variaciones de la actividad de dicha biomasa con el tiempo de incubación en cada uno de los tratamientos con enmienda aplicados.

Inmediatamente después de la enmienda se observaba un incremento del contenido de ATP en todos los suelos enmendados con respecto al suelo control (Figura 4.1.7; Tabla I.6 del anexo), que era mayor a medida que aumentaba la dosis de enmienda aplicada. Este incremento era mayor en los suelos enmendados con compost que en los enmendados con RF. Contrariamente a lo observado para T0, después de un periodo de incubación de 30 días (T1), los contenidos de ATP eran mayores en los suelos enmendados con RF que en los enmendados con compost, lo cual es atribuible a la mayor estimulación de la actividad microbiana producida por el RF debido al carácter más inestable de su materia orgánica.

Después de dos meses de incubación (T2) el contenido de ATP de los suelos disminuía tanto en los suelos enmendados con RF como en los enmendados con compost, reflejando, al igual que se observó en la respiración microbiana, una disminución de la actividad microbiana con el tiempo. No obstante, los valores de ATP se mantenían en todos los suelos enmendados superiores a los del suelo control. De nuevo se pone de manifiesto que la aplicación de estas dosis elevadas de enmienda no ejercía efecto negativo alguno sobre la actividad metabólica global de los microorganismos del suelo.

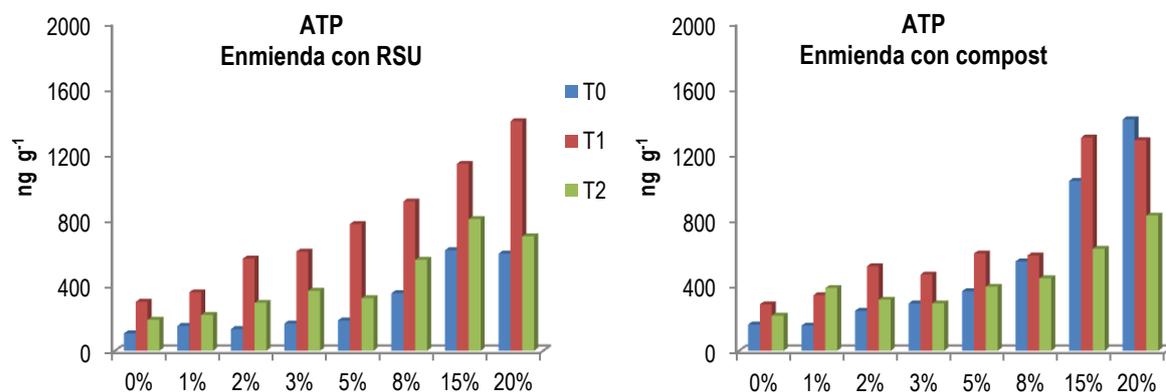


Figura 4.1.7. Evolución del contenido de ATP en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente, después de la enmienda.

### **Actividades enzimáticas en los suelos**

**Actividad deshidrogenasa.** La actividad deshidrogenasa del suelo se ha propuesto también como un índice de la actividad metabólica global de los microorganismos del suelo, reflejando la capacidad de dichos microorganismos para oxidar la materia orgánica. La actividad deshidrogenasa del suelo, al igual que el resto de parámetros microbiológicos estudiados (respiración y ATP), se ve afectada claramente por el tipo de enmienda y la dosis aplicada (Figura 4.1.8; Tabla I.7 del Anexo). Independientemente del tipo de enmienda aplicada al suelo dicha actividad metabólica disminuía con el transcurso de la incubación, debido sin duda a la disminución de sustratos lábiles cómo ya se ha comentado anteriormente.

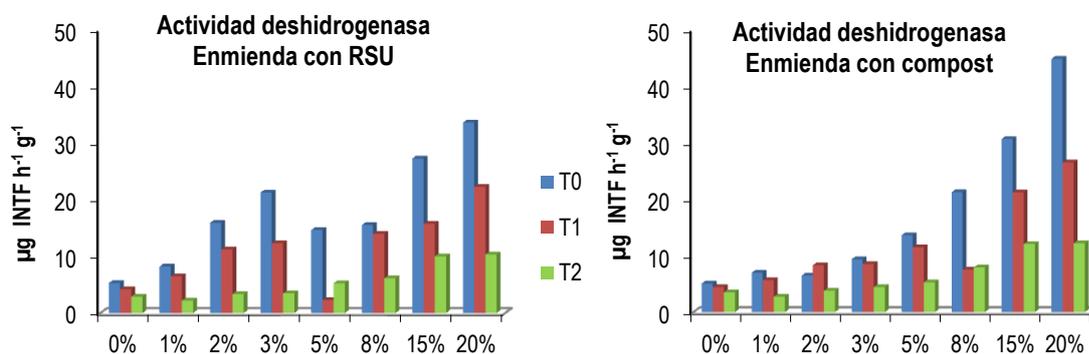


Figura 4.1.8. Evolución de la actividad deshidrogenasa en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente, después de la enmienda.

**Actividad ureasa.** La actividad ureasa del suelo se veía afectada de forma similar con las diferentes dosis de enmienda de RF o de compost sobre todo en las muestras incubadas durante 2 horas (T0) y durante 30 días (T1) (Figura 4.1.9; Tabla I.8 del Anexo). En estos dos casos no se observó un incremento directamente proporcional a la dosis aplicada de las enmiendas. La enzima ureasa es sintetizada por los microorganismos pero actúa de forma extracelular por lo que es independiente de la actividad metabólica celular. La mayor o menor presencia de sustratos tipo ureico o de inhibidores influye en las variaciones de la actividad ureasa medida.

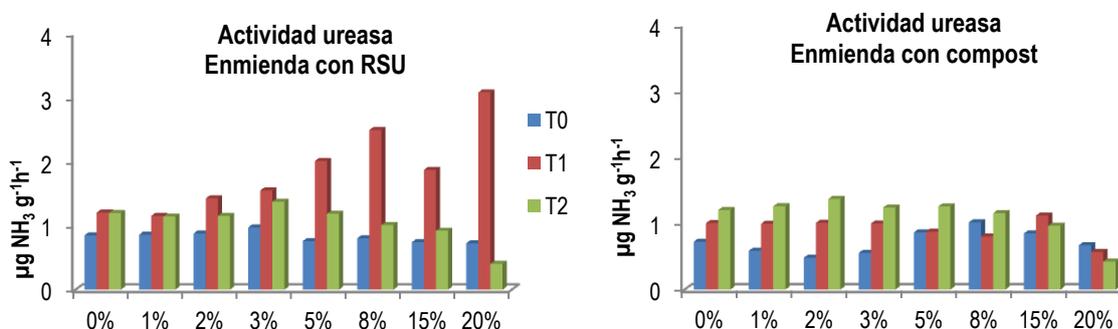


Figura 4.1.9. Actividad ureasa en el suelo control y en los suelos enmendados durante el periodo de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente, después de la enmienda.

**Actividad fosfatasa alcalina.** Para ambos tipos de enmienda (RF y compost) la actividad de esta enzima aumentaba de forma proporcional a la dosis aplicada en todos los tiempos de muestreo, observándose, en general, un incremento de la actividad de esta enzima de T0 a T1 y una posterior disminución de actividad en las muestras correspondientes a los dos meses de incubación (Figura 4.1.10; Tabla I.9 del Anexo), indicativo de una disminución del contenido de los sustratos específicos de esta enzima. En todos los casos, los suelos enmendados con RF presentaban mayores valores de actividad fosfatasa alcalina que los enmendados con igual dosis de compost.

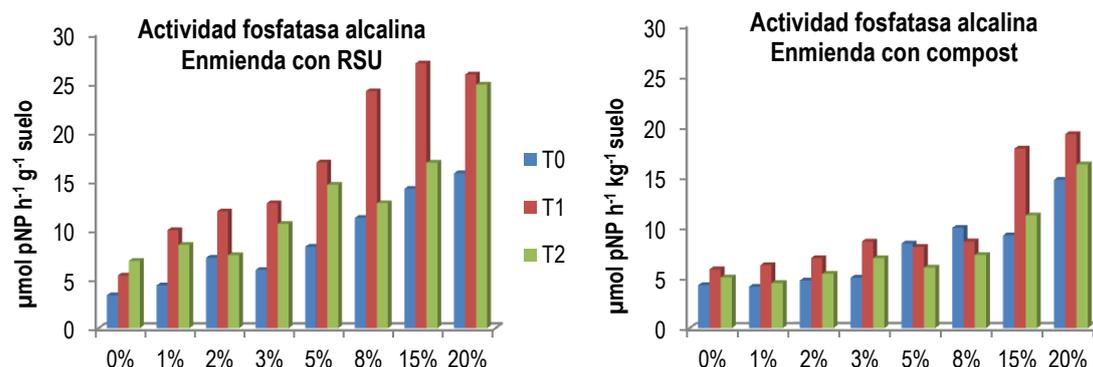


Figura 4.1.10. Evolución de la actividad fosfatasa alcalina en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente, después de la enmienda.

**Actividad β-glucosidasa.** Esta actividad aumentaba de forma clara con las dosis aplicadas de ambas enmiendas orgánicas, sobre todo durante el primer mes de incubación (T1) (Figura 4.1.11; Tabla I.10 del Anexo). Tras dos meses de incubación los valores de actividad β-glucosidasa disminuían siendo muy similares en todas las dosis aplicadas. Este hecho es indicativo del agotamiento de los sustratos específicos (celobiosa) de esta enzima.

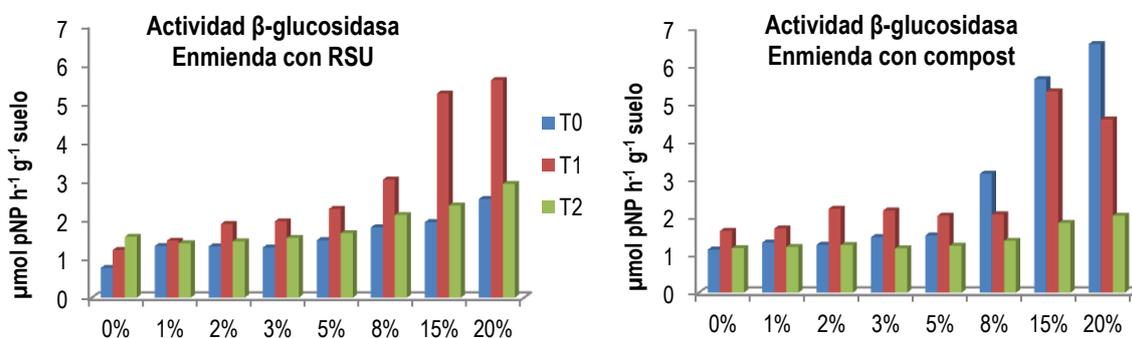


Figura 4.1.11. Actividad β-glucosidasa en el suelo control y en los suelos enmendados durante el periodo de incubación. T0: 2 horas después de la enmienda; T1 y T2: 1 y 2 meses, respectivamente, después de la enmienda.

### **Medida de la ecotoxicidad**

La ecotoxicidad existente en el suelo tras la adición de las diferentes dosis de RF y de compost fue evaluada mediante la medida de la inhibición de la emisión de luminiscencia de la bacteria *Photobacterium phosphoreum*. La emisión de luminiscencia fue medida en un luminómetro Peltier/Multitox y los valores se expresan como EC<sub>50</sub> o concentración efectiva, que corresponde a la concentración de sustancias tóxicas que producen un 50% de reducción de la emisión de luminiscencia de *Photobacterium phosphoreum*.

Como se observa en la Tabla 4.1.3 ninguno de los tratamientos con mayor inhibición de la luminiscencia de las bacterias testigo, que coincidían con las dosis más altas del compost y del RF, eran tóxicas. Según la legislación (BOE 10 Noviembre 1989 nº 270/1989) para considerar a un residuo como tóxico, en un ensayo de ecotoxicidad como éste, la concentración EC<sub>50</sub> (concentración de extracto de dicho residuo que produce un 50% de inhibición con respecto al control sin inhibición) debe ser inferior a 3000 mg/L. En todos nuestros casos la EC<sub>50</sub> era superior a este valor umbral.

**Tabla 4.1.3. Estudio de Toxicidad**

<b>Tratamiento</b>	<b>% INH</b>	<b>EC<sub>50</sub></b>
Suelos control	32,4	
Suelo con residuo fresco 8%	43,1	
Suelo con residuo fresco 8%	36,3	
Suelo con residuo fresco 15%	38,7	
Suelo con residuo fresco 15%	43,5	
Suelo con residuo fresco 20%	45,9	No tóxico
Suelo con compost 8%	44,8	
Suelo con compost 8%	45,9	
Suelo con compost 15%	52,3	No tóxico
Suelo con compost 15%	53,1	No tóxico
Suelo con compost 20%	55,0	No tóxico
Suelo con compost 20%	59,3	No tóxico

*Del presente estudio se puede concluir que:*

*La adición de dosis elevadas de la fracción orgánica de las basuras domésticas o del compost obtenido mezclando este residuo con lodo de EDAR ha supuesto una mejora de la calidad microbiológica del suelo, aumentando la cantidad y actividad, tanto global como específica, de las poblaciones microbianas del suelo sin que se observase efecto negativo sobre la "vida" microbiana del suelo por la adición de estas enmiendas a las dosis más elevadas (450 y 600 t/ha), no detectándose efectos ecotoxicos derivados de su incorporación al suelo. Asimismo, el contenido de carbono orgánico total y de las diferentes fracciones lábiles de carbono también incrementaba con la adición de las enmiendas, siendo este incremento creciente con el aumento de la dosis.*

*Aunque la adición de las enmiendas incrementó a todas las dosis ensayadas la conductividad eléctrica del suelo, sólo la CE de los suelos enmendados a la dosis más elevada (600 t/ha) estaba próxima al valor límite de 2 dS/m establecido para la consideración de suelo con riesgo de salinización.*

*No obstante, si bien la adición de dosis elevadas de la fracción orgánica de las basuras domésticas o del compost obtenido mezclando este residuo con lodo de EDAR ha demostrado ser una estrategia útil para la restauración de la calidad microbiológica del suelo a corto plazo, hemos de tener en cuenta que estas aplicaciones pueden tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales ya que por un lado, el alto contenido en nutrientes y materia orgánica que aportan estos materiales a unos suelos realmente pobres, promueve, no sólo el aumento del nivel de C orgánico en el suelo y el contenido en nutrientes, sino también, el desarrollo y actividad de la comunidad microbiana, lo que podría relacionarse con un mejor estatus de estos suelos, pero por otro lado, no podemos olvidar que este tipo de materiales pueden contener metales pesados, exceso de sales u otros compuestos tales como nitratos que pueden resultar nocivos para el ecosistema y/o el medio ambiente. Es por tanto una exigencia ineludible el realizar un análisis exhaustivo de los residuos orgánicos previo a su aplicación al suelo para asegurarnos, antes de adicionarlos al suelo, de que poseen una calidad aceptable y evaluar a nivel de campo si los efectos positivos de la aplicación de estas enmiendas superan a los negativos.*

*En base a los resultados obtenidos en este ensayo, se desechó la dosis de 600 t/ha por motivos prácticos de manejo y para evitar problemas de salinidad, seleccionándose la dosis de 450 t/ha (peso fresco) como dosis elevada de residuo (aporte de un 3% de C orgánico), y la de 150 t/ha (1% de C orgánico) como dosis más habitual utilizada en la recuperación de suelos degradados, para ser empleadas en el posterior estudio de campo, ya que a pesar de que los datos obtenidos han demostrado una mejora en la calidad de los suelos, no debemos olvidar que el que el suelo es un complejo ecosistema, altamente estructurado cuya dinámica obedece a muy diversos factores, por lo que la alteración de esta estructura en la comunidad microbiana o vegetal provoca un desequilibrio en los suelos que hace necesario un estudio en condiciones reales de campo y a largo plazo para poder evaluar los efectos reales causados por la aportación de estas dosis de enmiendas al suelo, y si los efectos positivos derivados de dicha aportación superan los posibles efectos negativos derivados de ella.*



## **CAPÍTULO 4.2**

---

**ENSAYO A NIVEL DE CAMPO: INCIDENCIA DE LA  
APLICACIÓN DE DOSIS ELEVADAS DE C (ENMIENDA  
ORGÁNICA) EN LA RECUPERACIÓN DE UN SUELO  
DEGRADADO**

---



## **4.2 ENSAYO A NIVEL DE CAMPO: INCIDENCIA DE LA APLICACIÓN DE DOSIS ELEVADAS DE C (ENMIENDA ORGÁNICA) EN LA RECUPERACIÓN DE UN SUELO DEGRADADO**

### **INTRODUCCIÓN**

En muchos países europeos, y muy en particular en las regiones semiáridas y áridas, las inadecuadas prácticas agrícolas junto con las condiciones ambientales desfavorables, propias de estos climas semiáridos, están ocasionando una pérdida de la fertilidad y productividad natural de los suelos. Este hecho está provocando un fenómeno adverso: el abandono para uso agrícola de dichos suelos, los cuales, desprovistos de vegetación quedan sometidos, entre otros, a procesos de erosión hídrica, lo que puede ocasionar una degradación y desertificación posterior. Por ello, es necesario implementar normas para un manejo sostenible del suelo que evite su degradación, así como establecer programas de recuperación de los suelos ya degradados para evitar la desertización de las zonas degradadas. A nivel global la lucha contra la degradación del suelo ayudará a mitigar el efecto invernadero, proveerá un mejor medio ambiente, garantizará más y mejores alimentos y contribuirá al progreso económico de futuras generaciones. Además, la protección del suelo es una cuestión que también responde a una ética medioambiental: el suelo es un recurso natural limitado y no renovable que debemos proteger. En este sentido, es responsabilidad de la sociedad actual “reparar” en lo posible los daños que determinadas acciones antropogénicas han causado en nuestros suelos. Al final, se trata de hacer de la explotación del suelo una actividad sostenible, consiguiendo que dicho suelo sea un soporte de vegetación estable y productivo, pero que no pierda su funcionalidad, y por tanto, que su calidad se conserve en el tiempo.

Los experimentos de campo tienen como finalidad el hacer un seguimiento de los efectos que van a tener los distintos tratamientos aplicados sobre un sistema natural, en condiciones ambientales sujetas a un rango amplio de variabilidad. A pesar de las dificultades que plantea a priori el estudio de todos los factores que van a estar interactuando en el ensayo, se hace necesario la realización del mismo para evaluar, en condiciones naturales, los beneficios y los problemas que pueden derivarse de la introducción en el suelo de dosis elevadas de C (enmienda orgánica)

### **OBJETIVOS**

Diversos estudios han establecido previamente la idoneidad del empleo de enmiendas orgánicas para la recuperación de suelos degradados (Pascual et al., 1999; Ros et al., 2003; Crecchio et al., 2004). Sin embargo, son menos los estudios en los que se han evaluado comparativamente el efecto de la adición de materia orgánica exógena y el tipo de manejo del suelo sobre el tamaño, actividad y estructura de la comunidad microbiana del suelo (Bohme et al., 2005). Además, hemos de señalar que aún son mucho más escasos los estudios que reflejan “a largo plazo” el grado de eficacia que una estrategia como la señalada

(adición de elevadas dosis de enmiendas orgánicas al suelo), puede tener para conseguir la recuperación del suelo, en particular en lo que respecta a su calidad microbiológica, directamente implicada en la funcionalidad del mismo, y en lo que respecta la formación y características de una fracción de la materia orgánica tan importante para la fertilidad del suelo como son las sustancias húmicas.

**Por ello, el OBJETIVO** del trabajo realizado en este Capítulo ha sido la *evaluación de la efectividad de la adición de grandes cantidades de C orgánico (una única adición de enmiendas orgánicas a dosis alta y muy alta) en la recuperación de la calidad de un suelo semiárido degradado, en particular, de la calidad microbiológica de dicho suelo, ya que es precisamente la parte microbiológica la que en mayor grado se verá negativamente afectada por la degradación que sufra ese recurso natural. El estudio se ha centrado fundamentalmente en la incidencia de la dosis y grado de estabilidad de la enmienda, así como el tipo de manejo del suelo (incorporación de la enmienda en los 15-20 cm superficiales del suelo o en superficie, mulching) en estos procesos de recuperación de la calidad del suelo. Asimismo, se ha evaluado la incidencia de estas enmiendas en la fijación química de carbono en el mismo, estableciendo los cambios producidos por la enmienda en la cantidad y características de los ácidos húmicos del suelo y en su capacidad para asociarse con determinadas enzimas extracelulares, protegiéndolas así frente a los procesos de desnaturalización.*

Para la consecución de los mencionados objetivos, en un área degradada bajo clima semiárido se establecieron diferentes parcelas experimentales en las que a un suelo degradado se añadieron dos clases diferentes de enmiendas orgánicas en dos diferentes dosis y siguiendo dos diferentes técnicas de aplicación. Diferentes parámetros físicos físico-químicos, microbiológicos, bioquímicos y moleculares, fueron monitorizados a lo largo de 5 años de experimentación con el fin de profundizar en el conocimiento de los efectos derivados a medio plazo, sobre un amplio espectro de propiedades del suelo, de la aplicación de enmiendas orgánicas en dosis elevadas, y la posibilidad de establecer esta estrategia como una verdadera biotecnología apta para la recuperación de suelos y la fijación de carbono en ellos.

Esta actividad nos permitió estudiar en condiciones reales de campo que tipo de enmienda resulta más eficaz para restaurar la calidad de los suelos degradados de zonas semiáridas, constituyendo al mismo tiempo, una mayor contribución al incremento del "pool" de C orgánico en dichos suelos y a la mitigación del efecto invernadero procedente de las emisiones de CO<sub>2</sub>. Asimismo, nos permitió estudiar la incidencia de las diferentes enmiendas en la creación de una cubierta vegetal estable en el suelo, en la diversidad vegetal y microbiana del suelo, en la fijación química de C estable en el suelo (ácidos húmicos) y en las características de dichos ácidos húmicos.

## **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **Área de estudio y materiales utilizados**

Diversos estudios llevados a cabo por García et al., (1996; 1997) pusieron de manifiesto la existencia en nuestra región de extensas zonas con suelos que fueron cultivados hace años, y que en la actualidad están

abandonados y sin cubierta vegetal, dentro de un clima semiárido. Todos ellos pueden ser considerados como “pobres” presentando como característica en común un escaso contenido de materia orgánica y nutrientes, y una calidad, en particular microbiológica y bioquímica, muy deficientes.

### **Suelo**

La zona elegida para la realización de este experimento al nivel de campo se encuentra enclavada en el paraje de Cañada Hermosa, en el término municipal de Alcantarilla, en la Región de Murcia. Se trata de una zona que en el pasado estuvo sometida a cultivo intensivo, pero que en la actualidad lleva más de 30 años abandonada. El abuso cometido en el uso del suelo de esta zona, así como el clima semiárido imperante en la misma (temperatura media de 20°C y pluviometría anual de 200 mm/año), hace que el suelo esté prácticamente desprovisto de cubierta vegetal. Todo ello hace al suelo muy propenso a los procesos de erosión hídrica siendo un área tendente a la desertificación. Del amplio conjunto de suelos estudiados por García et al., (1996; 1997), el elegido para este estudio es un Xerosol cálcico (FAO-UNESCO (1988)), típico de la Región de Murcia, que puede considerarse como representativo de aquellos con un índice de degradación elevado, en función tanto de los años de abandono como por lo precario de su cubierta vegetal. Este estudio nos servirá pues, para comprobar si los suelos que se encuentran en esta situación gozan aún de una disposición favorable para su recuperación, o por el contrario, se encuentran ya en una situación irrecuperable.

Las principales características de este suelo se mostraron en la Tabla 4.1.1 del Capítulo 4.1 de esta Memoria

Podemos indicar, como dato más significativo de este suelo su bajo contenido en materia orgánica, lo que confirma que una característica común de los suelos degradados de zonas semiáridas es el poseer contenidos poco aceptables de materia orgánica. Ello hace alentar la iniciativa de introducir enmiendas orgánicas en el suelo, si queremos recuperarlo e impedir que los procesos degradativos sigan actuando sobre el mismo hasta llegar a un límite en el que se considere irrecuperable. Al igual que sucede con la materia orgánica, los contenidos en macronutrientes también ponen de manifiesto la pobreza de dicho suelo.

### **Enmendantes orgánicos**

Como enmiendas orgánicas se utilizaron los mismos materiales empleados en el ensayo premilinar (capítulo 1): la fracción orgánica de las basuras domésticas procedentes de la planta de tratamiento de residuos de Ingeniería Urbana, situada en el paraje de Cañada Hermosa (Alcantarilla, Murcia), tanto directamente (residuo fresco, RF) como tras someterla a un proceso de compostaje mezclada con lodo de depuración de aguas residuales urbanas en proporción 1:2 (lodo:RF) (compost, RC). El proceso de compostaje, como ya se ha indicado, se llevó a cabo en reactores horizontales a escala industrial en una nave cerrada. Se trata de un proceso totalmente automatizado en el que se controlan los parámetros fundamentales del mismo tales como la temperatura, la humedad y la oxigenación de la mezcla. En este proceso se alcanzó la temperatura óptima para la desinfección del material (60-65° C durante 48 horas) con el fin de conseguir que la mezcla se compostara de modo homogéneo y que la oxigenación de la masa

fuese adecuada, el material era volteado en el reactor mediante unos tornillos mecánicos y se insuflaba aire a la mezcla. De este modo se obtuvo un compost cuyo compostaje se había realizado de forma acelerada en túneles de aireación diaria. Tras la finalización del proceso de compostaje se realizó un proceso de afino del compost mediante la retirada de los materiales inertes que aún quedaban y su tamización.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo es conocer hasta qué punto es importante el grado de estabilidad de la materia orgánica a adicionar cuando queremos recuperar suelos degradados y fijar en el suelo la mayor cantidad posible de C. Sabemos que cuando al suelo se le adiciona una materia orgánica no estabilizada, la mineralización de la misma en el suelo (máxime en las condiciones climáticas imperantes en nuestra zona) suele ser muy rápida, (Pascual et al., 1997). Por ello, en todos los ensayos realizados en este trabajo de Tesis Doctoral, se ha empleado la enmienda orgánica tanto fresca (materia orgánica menos estabilizada y por tanto más lábil) como compostada (materia orgánica más estabilizada).

Las características principales de estos dos materiales se indicaron en la Tabla 4.1.2 del Capítulo 4.1 de esta Memoria.

## DISEÑO DEL EXPERIMENTO

En la zona experimental seleccionada se establecieron parcelas de 30 m<sup>2</sup> a las que se adicionaron los materiales orgánicos indicados (RF y RC), en dos dosis diferentes para la aplicación de la enmienda, una dosis que, aunque alta, puede ser considerada como “normal-media” para recuperación de suelos (150 t/ha), equivalente a 1% de C<sub>org</sub>, y otra dosis “alta-muy alta” (450 t/ha), equivalente a 3% de C<sub>org</sub> (García et al. 1994; Ros, 2000) estableciéndose todos los tratamientos por triplicado. Tres parcelas sin adición de enmienda fueron utilizadas como control. Los materiales orgánicos, a la dosis estipulada, se extendieron homogéneamente sobre la superficie de la parcela incorporándolos a continuación a los 15-20 cm superficiales del suelo mediante un rotovator. Las parcelas control fueron tratadas de igual modo con rotovator, para que este manejo no supusiese una variable a considerar.

Durante 5 años se ha realizado un seguimiento de estas parcelas, tomando muestra de suelo para análisis a un tiempo inicial (7 días después de la adición de las enmiendas), tiempo al que denominamos (P0), y a los 6 (P6), 12 (P12), 18 (P18), 36 (P36) y 60 (P60) meses de incorporación de las enmiendas, con el fin de monitorizar la evolución de diversos parámetros de tipo físico, físico-químico, microbiológico y bioquímico indicadores de la calidad del suelo. Asimismo, se realizó un seguimiento de la evolución de la densidad y diversidad de la cubierta vegetal, que de acuerdo a nuestra experiencia previa, presuponíamos aparecería sobre el suelo, como posteriormente se confirmó.

Al mismo tiempo se establecieron otra serie de parcelas de igual tamaño y con los mismos tratamientos de enmienda pero con diferente manejo del suelo ya que en este caso las enmiendas no fueron incorporadas a la capa arable del suelo sino que se extendieron sobre la superficie del mismo (mulching). El objetivo era evaluar si este diferente tipo de manejo establecía efectos diferenciadores, a largo plazo (5 años), en los diferentes aspectos de recuperación del suelo bajo estudio. Dado que la incorporación al suelo de la materia orgánica añadida con este tipo de aplicación es más lenta, estas parcelas solo se muestrearon para análisis a los 5 años de la adición de la enmienda al suelo (P60), si bien, si se hizo un seguimiento anual de la cobertura y diversidad de la vegetación desarrollada en estas parcelas en los tres últimos años de

experimentación. El interés de este tipo de manejo (mulching) radica, por una parte, en la mayor facilidad de aplicación y los menores costos de mano de obra que supone en comparación con la incorporación de la enmienda en la capa arable, dignos de tener en cuenta cuando se trata de actuar sobre grandes extensiones de terreno, y por otra, en que el “mulching”, contribuirá en mayor medida que la “incorporación” a mantener la humedad del suelo, lo cual, en zonas semiáridas como la zona de estudio, tiene una particular relevancia.

En la Tabla 4.2.1 se muestran los diferentes tratamientos aplicados y la nomenclatura dada a las muestras.

***Tabla 4.2.1. Suelos enmendados con los diferentes enmendantes empleados y nomenclatura correspondiente***

Materiales	Nomenclatura
Suelo control degradado	Suelo control
Suelo con adición de 1% de C <sub>org</sub> de compost	S+RCd1
Suelo con adición de 3% de C <sub>org</sub> de compost	S+RCd2
Suelo con adición de 1% de C <sub>org</sub> de residuo orgánico fresco	S+RFd1
Suelo con adición de 3% de C <sub>org</sub> de residuo orgánico fresco	S+RFd2
Suelo con adición de 1% de C <sub>org</sub> de compost en mulching	S+RCd1M
Suelo con adición de 3% de C <sub>org</sub> de compost en mulching	S+RCd2M
Suelo con adición de 1% de C <sub>org</sub> de residuo orgánico fresco en mulching	S+RFd1M
Suelo con adición de 3% de C <sub>org</sub> de residuo orgánico fresco en mulching	S+RFd2M

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ***Efecto sobre la cobertura y diversidad vegetal***

Los suelos de la zona en estudio, tras una explotación agrícola intensiva, fueron abandonados sin ningún tratamiento posterior, lo cual los dejó expuestos a procesos de erosión debido a su baja capacidad para recuperar y restablecer una cubierta vegetal natural (García et al., 1996; Pascual et al., 2000). La presencia de una cobertura vegetal es un importante factor de calidad en los suelos (Brockway et al 1998), principalmente debido a su contribución al mantenimiento de una población biológica estable en los suelos a través del suministro a los mismos de carbono y fuentes de energía por medio de los exudados radiculares y los restos vegetales que se van incorporando al suelo (Pascual et al, 2000, Ros et al, 2003, Bastida et al, 2008).

El aporte de enmiendas orgánicas al suelo produce cambios en sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas, siendo algunos de estos cambios, como los relativos al desarrollo y evolución de la cubierta vegetal, muy lentos, por lo que son necesarios varios años para alcanzar un cierto equilibrio en los cambios producidos (Ros et al., 2003).

A los 3-4 meses de la adición de la enmienda se observó la aparición de una vegetación espontánea en las diferentes parcelas experimentales, procediéndose por tanto, a realizar un seguimiento de la densidad de la cobertura vegetal desarrollada, así como a la identificación de las especies vegetales establecidas en las mismas.

Durante todo el tiempo de experimentación se observó, de modo general, y en ambos tipos de manejo de la enmienda (incorporación o mulching), una densidad de cobertura vegetal en los suelos enmendados

significativamente superior a la del suelo control, siendo el tratamiento de RFd2 el que presentaba menores diferencias con el control, tanto cuando la enmienda fue añadida mediante incorporación en la capa arable del suelo como cuando fue añadida en mulching (Figura 4.2.1)

Como puede observarse en la Figura 4.2.1, cinco años después de la incorporación de las enmiendas al suelo el porcentaje de cobertura vegetal que presentaban las parcelas enmendadas era de 3,75 a 4,25 veces superior al de las parcelas control, con excepción de los tratamientos S+RFd2 y S+RFd2M en los que la cobertura era 2,5 y 1,5 veces superior, respectivamente, a la del suelo control, no llegando a ser, en este caso, las diferencias con el control estadísticamente significativas.

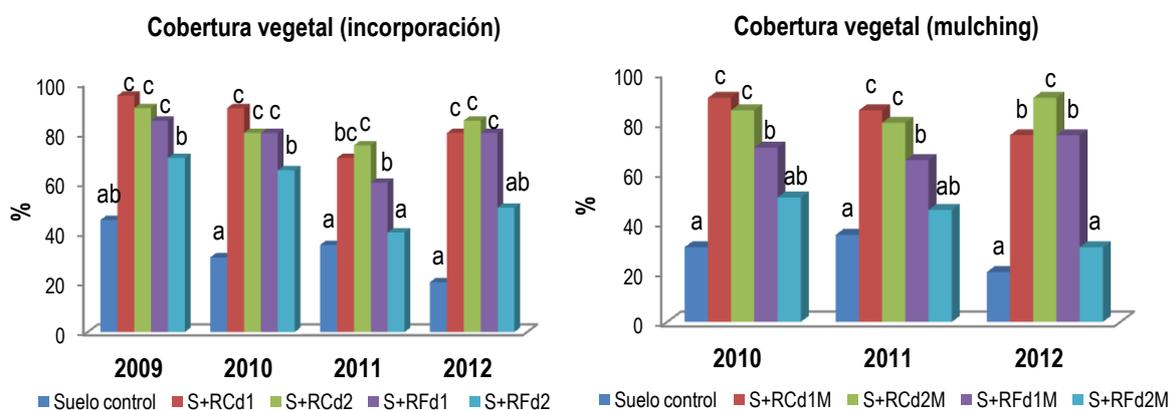


Figura 4.2.1. Cobertura vegetal en los suelos enmendados y el control. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . M (mulching). Para cada año y tipo de manejo, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

En ningún caso el incremento de la cobertura vegetal experimentado por estos suelos enmendados fue proporcional a la dosis. Similares resultados fueron obtenidos por Diaz et al. (1996) al adicionar también fracción orgánica de basuras domésticas a suelos degradados. Pichtel et al. (1994) también observaron esta falta de proporcionalidad entre la dosis empleada y la cobertura vegetal al estudiar el comportamiento de diferentes enmiendas orgánicas en un experimento de regeneración de áreas mineras.

Para el caso de las parcelas enmendadas con RF se observó una clara influencia negativa de la dosis sobre el desarrollo de la vegetación, presentando las parcelas enmendadas a la dosis más alta (S+RFd2 y S+RFd2M) menores valores de cobertura vegetal, que las parcelas tratadas con este mismo material a d1. Este peor comportamiento, en cuanto a desarrollo de cubierta vegetal, observado en las parcelas tratadas con RF a d2 se hizo particularmente patente en los dos últimos años de experimentación, presentando los suelos tratados valores de cobertura vegetal que no se diferenciaban estadísticamente de los de las parcelas control (Figura 4.2.1). Esto sugiere el establecimiento con el tiempo en estos suelos tratados con RF a d2 de algún tipo de factor o factores negativos (compuestos fitotóxicos, exceso de sales...) que contrarresta los efectos positivos derivados de la enmienda sobre el desarrollo vegetal, haciendo que estos efectos sean menos evidentes.

Para el resto de tratamientos se observó que, a pesar de que se hayan podido introducir en el suelo compuestos fitotóxicos con la incorporación de las enmiendas (o desarrollarse estos posteriormente durante la degradación de la materia orgánica incorporada), los cuales podrían afectar negativamente al desarrollo vegetal (Gliotti et al., 1997), el desarrollo de cubierta vegetal en las parcelas tratadas era superior que en las parcelas control, indicando que las sustancias fitotóxicas, de existir, han sido degradadas en el suelo. Comportamientos similares han sido descritos por otros autores (Ros et al, 2003; Bastida et al, 2008).

El aumento de la cobertura vegetal en los suelos enmendados con respecto al suelo control puede ser consecuencia de que, junto a una importante cantidad de materia orgánica, las enmiendas orgánicas proporcionan un alto contenido en micro y macronutrientes que pueden ser beneficiosos para el desarrollo vegetal (O'Dell et al., 2007), así como unas condiciones físicas más adecuadas para el desarrollo radicular y el intercambio de agua y oxígeno en el suelo.

Como veremos más adelante, los suelos enmendados presentan mayores cantidades de nitrógeno en el suelo, llegando a ser sus valores hasta 5 veces superiores a los del control (S+RCd2) 5 años después de la enmienda. El nitrógeno es uno de los nutrientes más limitantes para el crecimiento de las plantas. Como ya demostraron otros autores (Bastida et al, 2008), una mayor presencia de este elemento junto con una mayor disponibilidad de los sustratos fácilmente accesibles para las plantas son las causas por las que se obtiene una mayor cubierta vegetal.

La presencia de una mayor cubierta vegetal provoca más aportes a los suelos de restos vegetales y exudados radiculares, por lo cual se incorporan mayores cantidades de carbono al suelo convirtiéndolo en un sumidero de este elemento. Además, una mayor densidad vegetal implica una mayor captación de CO<sub>2</sub> atmosférico, lo cual, de producirse a gran escala tendría efectos positivos con respecto a la mitigación del efecto invernadero.

En las Tablas 4.2.2 y 4.2.3 se muestran las especies vegetales observadas en el mes de mayo desde 2009 a 2012 en las parcelas en las que la enmienda fue incorporada a la capa arable del suelo y las observadas en mayo de 2010, 2011 y 2012 en las parcelas en las que la adición de la enmienda fue realizada mediante mulching. En ellas se observa que dos años después de la aportación de las enmiendas (2009), la diversidad vegetal de las parcelas control era mayor que la presentada por las parcelas enmendadas, las cuales presentaban mayoritariamente la presencia de la especie *Carrichtera annua*. Este decrecimiento en la diversidad tras la aportación de enmiendas orgánicas al suelo ha sido observado también por otros autores (Baer et al, 2003). La tendencia cambiante hacia una mayor diversidad vegetal en estos suelos ya se empezó a observar en el año siguiente, hasta alcanzar la diversidad que presentan en la actualidad. Cinco años después de la adición de la enmienda la diversidad vegetal en las parcelas enmendadas seguía siendo inferior a la del suelo control; esta diversidad no presentaba un patrón claro, así la especie más abundante es diferente para cada tratamiento, siendo la especie predominante en las parcelas control *Helianthemum almeriense*, mientras que para S+RCd1 era *Atractylis cancellata*, para S+RCd2, *Pallenis spinosa*, para S+RFd1 *Thymelaea hirsuta* y para S+RFd2 *Echium fastuosum*. En contraste, en las parcelas enmendadas mediante mulching, la especie predominante al margen del tipo de enmendante es la especie *Atractylis cancellata*. Todas estas especies son originarias de la zona mediterránea, característica esperada ya que con estos enmendantes no se suministran semillas provenientes de otras especies como ocurre cuando se realizan enmiendas con materiales vegetales.

**Tabla 4.2.2. Cobertura y diversidad vegetal en el suelo control y en los suelos enmendados mediante la aplicación de residuos a la capa arable del suelo.**

	2009					2010					2011					2012				
	Control	S+RCd1	S+RCd2	S+RFd1	S+RFd2	Control	S+RCd1	S+RCd2	S+RFd1	S+RFd2	Control	S+RCd1	S+RCd2	S+RFd1	S+RFd2	Control	S+RCd1	S+RCd2	S+RFd1	S+RFd2
Anagallis arvensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,3	22,1	28,3	14,2	10,6	3,07	31,22	0	0	0
Artemisia barrilieri	3,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,3	0	0	0	0	3,07	0	0	0	0
Atractylis cancellata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48,55	5,6	7,12	4,13	
Atriplex	0	0	0	0	0	0	3,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Avena sp	3,1	21,5	11,6	23,8	4,8	2,6	3,9	3,6	18,9	32,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bromus fasciculatus	3,1	2,1	2,1	0	0	0	3,9	0	0	0	0	0	0	5,4	0	0	0	0	0	0
Calendula	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	2,7	0	5,3	0	0	0	0	0
Cardo largo	0	0	0	0	4,8	0	10,4	0	0	0	3,3	8,5	17,6	22,1	18,6	3,07	8,63	12,6	8,62	4,12
Carrichtera annua	15,8	70,1	53,3	45,4	51,2	23,4	33,3	19,7	36,4	11,6	11,8	0	0	31,3	25,7	12,4	0	0	0	4,12
Centaurea solstitialis	3,1	0	0	0	0	2,6	3,9	3,6	8,6	11,6	0	2,5	2,7	5,4	5,3	0	0	0	0	0
Convolvulus althaeoides	0	0	0	0	0	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Crepis albida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Crepis vesicaria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,5	2,7	5,4	5,3	0	0	0	0	0
Diptotaxis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,6	0	0	0
Echium fastuosum	3,1	0	0	0	0	2,6	0	0	0	0	18,3	8,5	2,7	0	18,6	5,5	2,9	0	24,14	42,88
Eruca vesicaria	0	0	0	0	0	0	3,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fumana ericoides	3,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Helianthemum almeriense	3,1	0	0	0	0	43	0	39	0	0	38,4	0	17,6	0	0	53,2	0	0	0	0
Heliotropium peruvianum	0	0	0	0	0	0	0	3,6	0	0	0	2,5	2,7	0	0	0	0	0	0	0
Hordeum murinum	0	0	2,1	0	0	0	0	3,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactuca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,4	0	0	0	0	0	0
Lamarckia	0	0	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lavatera cretica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,9	0	4,43	12,24
Malva parviflora	0	0	2,1	23,8	19,6	0	0	3,6	8,6	32,6	0	0	0	0	5,3	0	0	0	4,44	0
Moricandia arvensis	0	0	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pallenis spinosa	3,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48,3	0	0
Piptatherum miliaceum	3,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plantago ovata	0	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plantago sp,	38,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reichardia	0	0	0	0	0	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reseda phyteuma	3,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,3	0	0	0	0
Ricinus communis	0	0	0	3,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salsola kali	0	0	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,7	0	0	3,07	0	5,6	0	0
Setaria	0	0	0	0	0	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sisimbrio	0	0	0	0	0	0	0	3,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Solanum nigrum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,4	0	0	0	0	0	0
Sonchus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0
Stipa capensis	3,1	2,1	20,4	0	0	2,6	22,5	19,7	8,6	0	3,3	8,5	17,6	5,4	0	3,07	2,9	22,3	0	0
T thymelaea, hirsuta	8,8	2,1	2,1	3,5	19,6	12,8	10,4	0	18,9	11,6	18,3	33,9	2,7	0	5,3	7,25	2,9	0	51,25	32,51
Teucrium capitatum	3,1	0	0	0	0	2,6	3,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>.

**Tabla 4.2.3. Cobertura y diversidad vegetal en el suelo control y en los suelos enmendados mediante la aplicación de residuos en superficie (mulching).**

	2010					2011					2012				
	Control	S+RCd1M	S+RCd2M	S+RFd1M	S+RFd2M	Control	S+RCd1M	S+RCd2M	S+RFd1M	S+RFd2M	Control	S+RCd1M	S+RCd2M	S+RFd1M	S+RFd2M
Anagallis arvensis	0	0	0	0	0	3,3	32,3	22,6	19,5	25,6	3,07	26,22	12,14	0	0
Artemisia barrilieri	0	0	3,2	0	0	3,3	4,1	0	0	0	3,07	0	0	0	0
Atractylis cancellata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	55,54	42,44	33,26	44,13
Atriplex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Avena sp	2,6	4,3	3,2	12,6	18,6	0	0	0	0	4,3	0	0	0	0	0
Bromus fasciculatus	0	1,8	3,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Calendula	0	0	0	0	0	0	4,1	2,3	7,3	4,3	0	0	0	0	0
Cardo largo	0	0	0	0	0	3,3	8,6	5,4	0	12,8	3,07	5,53	7,26	8,12	24,12
Carrichtera annua	23,4	32,6	32,3	28,9	40,5	11,8	0	0	0	21,4	12,4	0	0	11,17	13,25
Centaurea solstitialis	2,6	1,8	3,2	8,6	0	0	4,1	2,3	7,3	4,3	0	0	0	0	0
Convolvulus althaeoides	2,6	0	0	8,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Crepis albida	0	0	0	0	0	0	0	2,3	22,6	4,3	0	0	0	12,35	2,98
Crepis vesicaria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diptotaxis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Echium fastuosum	2,6	1,8	0	0	0	18,3	22,6	0	0	0	5,5	3,17	5,15	3,45	0
Eruca vesicaria	0	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fumana ericoides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Helianthemum almeriense	43	12,6	28,4	0	0	38,4	0	2,3	0	0	53,2	0	0	0	0
Heliotropium peruvianum	0	0	0	0	0	0	13,6	28,2	0	0	0	0	0	0	0
Hordeum murinum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactuca	0	0	0	0	0	0	0	0	7,3	0	0	0	0	0	0
Lamarckia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lavatera cretica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,17	0	3,45	2,98
Malva parviflora	0	1,8	3,2	8,6	22,6	0	0	0	0	0	0	0	0	3,45	0
Moricandia arvensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pallenis spinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piptatherum miliaceum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plantago ovata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plantago sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reichardia	2,6	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reseda phyteuma	0	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	6,3	0	12,87	0	0
Ricinus communis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salsola kali	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,07	0	0	0	0
Setaria	2,6	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sisimbrio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Solanum nigrum	0	0	0	0	0	0	0	0	7,3	4,3	0	0	0	0	0
Sonchus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stipa capensis	2,6	15,6	14,6	22,6	18,3	3,3	0	11,6	0	0	3,07	3,17	12,87	3,45	0
T thymelaea. hirsuta	12,8	22,3	8,6	10,1	0	18,3	10,6	22,8	28,6	18,4	7,25	3,17	7,26	21,28	12,53
Teucrium capitatum	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. M (mulching).

Como ya indicaron otros autores (Albaladejo et al., 1994; García et al., 2004) un factor clave en la degradación de los suelos es la pérdida de la cubierta vegetal, ya que ello provoca un incremento en los procesos de erosión y salinización de los suelos. En este experimento se ha puesto de manifiesto para todos los suelos enmendados con compost y para aquellos donde la enmienda RF es incorporada a la dosis más baja, que una única adición de enmienda orgánica puede lograr que 5 años más tarde, el suelo presente una mayor cubierta vegetal, lo cual contribuirá a proteger el suelo frente a los procesos de erosión. Este mayor desarrollo vegetal deriva, como veremos más adelante, de la mejora que la adición de la enmienda produce en las propiedades físicas, como son una mejora de la estabilidad de agregados de los suelos (Caravaca et al., 2002a), en las propiedades químicas incrementando el contenido de materia orgánica en los suelos (García et al., 1994) y biológicas, afectando de forma positiva a la comunidad microbiana del suelo (Roldan et al., 1994), y por tanto en su calidad (García et al., 2004).

### *Conclusiones parciales*

*La introducción en los suelos de enmiendas orgánicas ha dado lugar, a largo plazo, a un incremento en la densidad de la cobertura vegetal, conduciendo, al mismo tiempo, a una disminución de la diversidad vegetal. Al introducir una serie de sustratos fácilmente accesibles a plantas oportunistas favorece que inicialmente este tipo de plantas sea preponderante en los suelos enmendados mientras que transcurrido un tiempo, cuando estos nutrientes han sido consumidos, se inicia la implantación de especies más adaptadas a condiciones de aridez en detrimento de las plantas oportunistas.*

*Los mayores incrementos en la densidad de la cubierta vegetal se apreciaron en los suelos tratados con compost, a las dos dosis ensayadas, tanto cuando la enmienda se había aplicado mediante incorporación en la capa arable del suelo como cuando se había aplicado en superficie (mulching). En cambio, la adición de residuo fresco, si bien cuando se aplicaba a la dosis más baja (d1) incrementaba la densidad de cobertura vegetal comportándose de modo similar al compost, cuando se aplicaba a la dosis más alta (d2) presentaba a largo plazo el peor comportamiento mostrando valores de densidad de cobertura vegetal que aunque eran más elevados que los del suelo control, no se diferenciaban de éste de modo estadísticamente significativo.*

*El tipo de manejo utilizado para la adición de la enmienda no parece jugar un papel decisivo a medio plazo ni en desarrollo de la cubierta vegetal ni en la diversidad de las especies vegetales desarrolladas, obteniéndose resultados similares en relación a estos parámetros con ambos tipos de manejos (incorporación en la capa arable o mulching).*

*Por otra parte, debemos tener en cuenta que una mayor cubierta vegetal favorece un mayor aporte de restos vegetales y exudados radiculares al suelo. Ello provoca que se incorpore una mayor cantidad de carbono y que el suelo se convierta en un sumidero de este elemento. Además, la vegetación más densa podrá captar más CO<sub>2</sub> atmosférico, lo cual es indudablemente positivo desde el punto de vista ambiental. Todo ello pone de manifiesto que el aporte al suelo de las enmiendas orgánicas contribuirá a la mitigación de efecto invernadero.*

### **Parámetros físicos**

Una de las principales ventajas derivadas de la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo es la mejora que ejercen sobre sus propiedades físicas, sobre todo, las referidas a la estructura de los suelos. Este efecto, claramente positivo para la fertilidad y productividad del suelo, está fuertemente relacionado con el aporte exógeno de materia orgánica, y su influencia perdurará en el suelo mientras dicha fracción orgánica esté protegida del ataque microbiano, bien asociada a la superficie de las arcillas o localizada en el interior de los microporos.

Ya que los cambios de los parámetros físicos ocurren de forma más lenta que los de otro tipo de parámetros como los microbiológicos y bioquímicos, y son más permanentes en el tiempo, los análisis de estos parámetros se realizaron solamente al final del experimento.

El estudio de las propiedades físicas de los suelos enmendados con incorporación de la enmienda en la capa arable del suelo reveló que en todos los casos, la incorporación de la enmienda orgánica había ejercido un notable efecto positivo sobre las propiedades físicas analizadas. Así, cinco años después de la incorporación de la enmienda todos los suelos enmendados mostraban valores de capacidad de retención hídrica (CRH) superiores a los del suelo control, siendo las diferencias con el control estadísticamente significativas en los suelos enmendados a la dosis más alta (Figura 4.2.2). Del mismo modo, la estabilidad de agregados de los suelos enmendados era en todos los casos significativamente superior a la del suelo control. En este caso se observaron diferencias en función del material orgánico empleado mostrando los suelos enmendados con compost, a igualdad de dosis, una estabilidad de agregados significativamente superior a la de los suelos enmendados con RF. El suelo enmendado con la dosis más alta de compost (S+RCd2) mostró valores de capacidad de retención hídrica y estabilidad de agregados significativamente superiores a los del resto de los suelos enmendados (Figura 4.2.2).

Comparando el comportamiento de los suelos donde la incorporación de la enmienda se produjo mediante un rotovator, consiguiendo la incorporación en los 15-20 cm superficiales ("incorporación") con el de los suelos donde la enmienda se depositó formando una capa sobre la superficie del suelo (mulching), se aprecia que la tendencia en cuanto a la mejora de las propiedades físicas del suelo es similar con ambos tipos de aplicación de la enmienda (Figura 4.2.2). Los suelos enmendados en mulching muestran también valores de CRH y estabilidad de agregados significativamente superiores a los del control, siendo también el tratamiento con compost a d2 el que presentaba los valores más altos de ambos parámetros en concordancia con estos resultados, Haynes (1980) observó un incremento en la CRH del suelo tras la adición de compost de residuos orgánicos urbanos mediante mulching.

Con ambos tipos de manejo (incorporación o mulching) se produce un aumento en el contenido de materia orgánica del suelo, lo cual está estrechamente relacionado con la estabilidad de los agregados (Tisdall & Oades, 1982; Carter, 2002; Whalen et al., 2003; Piccolo y Mbagwu, 1990; Rothon, 2000, Martínez et al., 2008). Así, se observó en todas las parcelas tratadas una relación positiva entre el incremento del porcentaje de agregados estables y la dosis de composts añadida al suelo (Figura 4.2.2). Similares resultados fueron encontrados por Sparke et al., (2011). La estabilidad de agregados es uno de los indicadores de calidad de los suelos más ampliamente reconocidos ya que este parámetro presenta una rápida respuesta a los cambios producidos en los suelos (Lapied et al., 2009). Piccolo et al. (1997) y Whalen et al. (2003) sugirieron que la estabilidad de los agregados dependería de la composición química

de la materia orgánica en el compost y de la cantidad de ácidos húmicos liberados dentro del suelo. Por otra parte, estos autores coinciden en afirmar que la estabilidad de agregados esta correlacionada con los ácidos húmicos pero no con los ácidos fúlvicos, porque son los ácidos húmicos los que están directamente involucrados en la formación de los complejos arcilla-humus.

Para ambos tipos de manejo de la enmienda hay que destacar el hecho de que, si bien en los tratamientos con compost el efecto positivo de la enmienda sobre la CRH y la estabilidad de agregados del suelo incrementaba con la dosis, en el caso del RF no se observaba este incremento del efecto positivo al incrementar la dosis, presentando los suelos tratados a d2 (S+RFd2 y S+RFd2M) valores de estos parámetros similares a los de los suelos tratados a d1, sugiriendo que la aplicación de RF a esta dosis tan elevada frena de algún modo el efecto beneficioso de la aplicación de la enmienda (Figura 4.2.2).

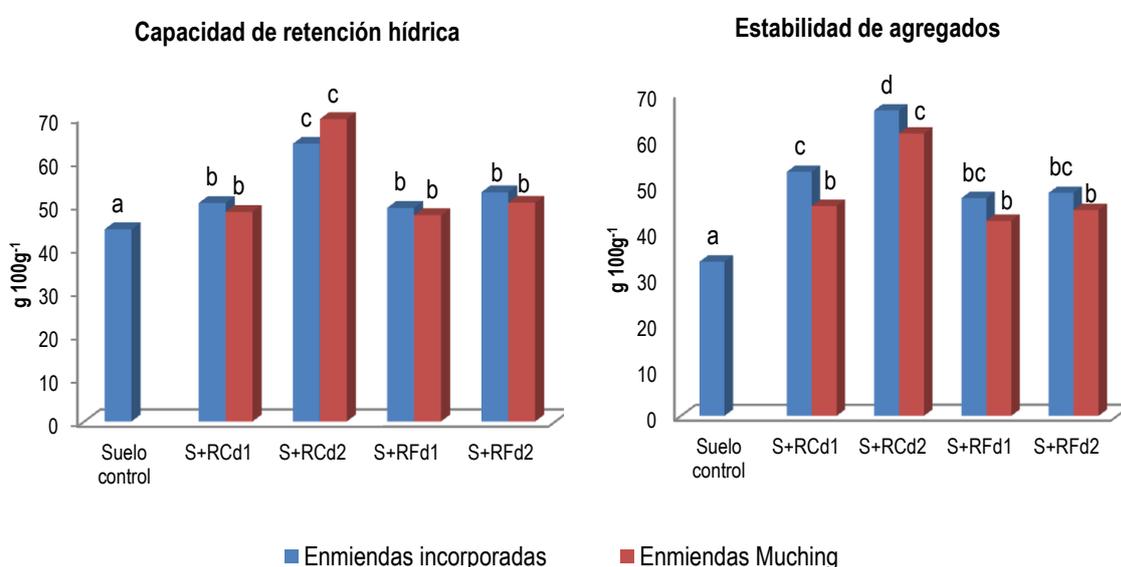


Figura 4.2.2. Capacidad de retención hídrica (CRH) y estabilidad de agregados en los suelos enmendados y el control 5 años después de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey (P ≤ 0,05).

Por otro lado, independientemente del tipo de manejo, todos los suelos enmendados mostraban, aún después de 5 años, menor densidad, y por tanto mayor porosidad que el suelo control sin enmendar (Figura 4.2.3). Esto era de esperar ya que la menor densidad aparente es el resultado de la mayor macroporosidad, ya que se generan espacios dentro de la matriz del suelo por efecto del material orgánico adicionado. Vemos así que las mayores cantidades de materia orgánica adicionada generan menores valores de densidad aparente y aumentos en los valores de porosidad total. Este hecho ha sido también observado por otros autores tales como Kay y Vandenbygaart (2002); Tejada et al., (2006) y Sparke et al., (2011).

Los suelos tratados con compost mostraban, para una misma dosis menores valores de densidad real y aparente y mayores valores de porosidad que los suelos enmendados con RF si bien las diferencias no

siempre eran estadísticamente significativas. Se vuelve a poner de manifiesto la mayor eficiencia del compost en relación al residuo fresco en la mejora de las propiedades físicas del suelo.

Cabe indicar que es generalmente aceptado que la estructura del suelo domina las propiedades físicas y las funciones de éste (Dexter, 1997). Una mejora en la estructura normalmente implica un incremento en la porosidad teniendo esto un efecto positivo en la aireación y en las propiedades hídricas (Berger & Hager, 2000; Sparke et al., 2011).

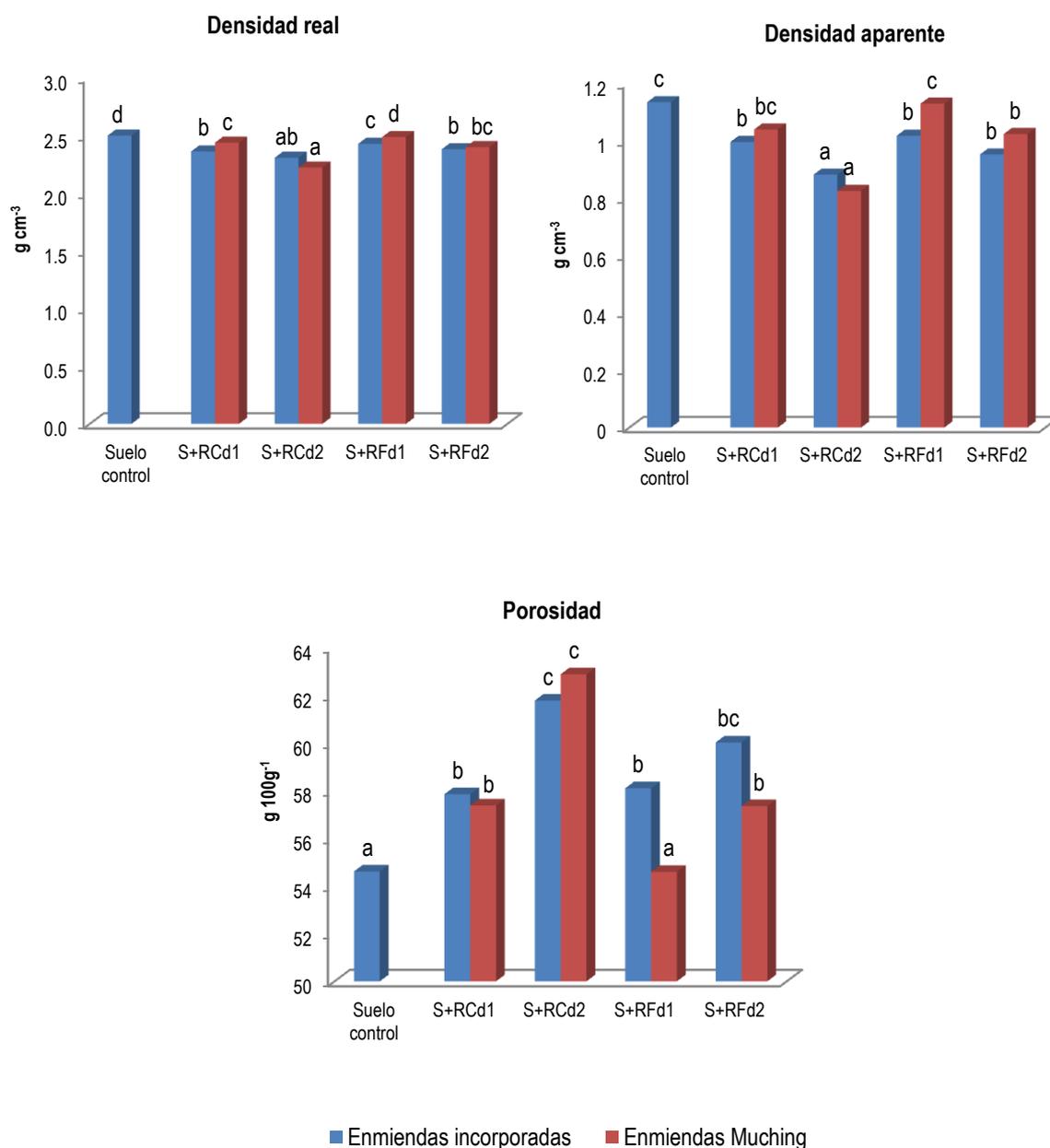


Figura 4.2.3. Densidad real, aparente y porosidad en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de la incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. M: mulching. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey (P ≤ 0,05).

El desarrollo de una adecuada estructura en el suelo puede ejercer efectos positivos en dos sentidos. En primer lugar favorece la estabilidad del suelo (de hecho observamos un aumento de la estabilidad de agregados) (Lacherveque et al., 2006), lo que resulta crucial para evitar fenómenos de erosión y pérdida de horizontes superficiales que arrastrarían la materia orgánica. En segundo lugar, el aumento en la capacidad de retención hídrica en los tratamientos con enmienda puede favorecer el desarrollo vegetal, la cual, como han observado otros autores (Mabuhay et al., 2006), resulta vital para proveer al suelo de entradas de materia orgánica derivadas del propio desarrollo vegetal. Estos hechos, como más tarde se estudiará, pueden tener un efecto claro en la dinámica de la actividad y la estructura de la comunidad microbiana.

De acuerdo con nuestros resultados, algunos autores han indicado la conveniencia del empleo de dosis altas de enmienda, siendo especialmente convenientes para la recuperación de las funciones hidrológicas de los suelos degradados (Larney & Janzen, 1996; Pagliai et al., 1981) donde según Larney y Janzen, (1996) la efectividad para la recuperación es mayor al realizarse grandes aportes instantáneos de materia orgánica para conseguir su permanencia por más tiempo en el suelo. Por otra parte, la adición de materia orgánica aumenta la estabilidad estructural (Tisdall & Oades, 1982; Piccolo & Mbagwu, 1990; Sasal *et al.*, 2000), disminuye la densidad aparente (Khaleel et al., 1981; Clapp, et al., 1986; Tester, 1990) y mejora las tasas de infiltración de agua y la conductividad hidráulica (Felton et al., 1995).

### **Parámetros físico-químicos**

#### **pH y conductividad eléctrica**

El pH es un parámetro que influye en los procesos que se producen en el suelo, afectando en ocasiones a la disponibilidad de los elementos necesarios para la nutrición de las plantas, así como a la capacidad de intercambio iónico y a la actividad microbiana. Además, es un factor decisivo en la disponibilidad de los metales pesados para las plantas, ya que al disminuir su valor se incrementa la solubilidad de los mismos, y por tanto, su concentración en la solución del suelo, lo que hace que dichos metales sean más fácilmente absorbibles por las plantas, aumentando su peligrosidad. Este hecho hay que tenerlo en cuenta cuando se realizan enmiendas orgánicas como las que nosotros utilizamos, puesto que a veces introducen en el suelo metales pesados, si bien nunca deben encontrarse en cantidad elevada.

Cuando se utilizan residuos orgánicos como enmendantes, las causas principales que pueden hacer variar el pH del suelo son diversas: mineralización de la materia orgánica, procesos de nitrificación, compuestos ácidos generados en la actividad microbiológica, la acidez de cambio que aparece debido al efecto de las sales cuando los residuos se incorporan al suelo, etc. (Gestring & Jarrell, 1982). De cualquier forma, la modificación del pH del suelo estará en función de la capacidad tampón de éste.

Las enmiendas orgánicas bajaron, en general, el valor del pH del suelo respecto al suelo control en el momento de su aplicación. Este fenómeno ocurre en suelos con un pH elevado como es nuestro caso, mientras que en los suelos ácidos la tendencia sería a aumentar dichos valores de pH (Clapp et al., 1986).

Manejo por incorporación de la enmienda en la capa arable del suelo

En la Tabla 4.2.4 se muestra la evolución de los valores de pH, medidos en agua (relación 1/5), en los diferentes suelos a lo largo de los 5 años de experimentación.

**Tabla 4.2.4. Evolución del pH en los suelos enmendados y el control durante los 5 años de experimentación.**

	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	8,22 (0,10)	8,17 (0,14)	8,37 (0,05)	8,15 (0,05)	8,20 (0,05)	7,96 (0,01)
S+RCd1	7,83 (0,10)	7,93 (0,12)	7,88 (0,08)	8,17 (0,06)	7,91 (0,01)	7,92 (0,02)
S+RCd2	7,72 (0,04)	8,01 (0,38)	7,49 (0,03)	7,65 (0,05)	7,54 (0,06)	7,73 (0,07)
S+RFd1	7,99 (0,05)	8,24 (0,11)	8,02 (0,06)	8,24 (0,07)	8,00 (0,07)	7,89 (0,07)
S+RFd2	7,85 (0,04)	8,01 (0,38)	7,86 (0,03)	8,18 (0,10)	7,79 (0,05)	7,85 (0,02)

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses). ( ): Error estándar, n=3.

El pH de los suelos sufrió pequeñas fluctuaciones a lo largo del tiempo de experimentación, las cuales no llegaron a ser en la mayoría de los casos significativas, hecho similar al observado por O'Connor et al. (1996). Inicialmente, la adición de la enmienda produjo una ligera disminución del pH del suelo, siendo ésta más acusada en los suelos enmendados con la dosis más alta (Tabla 4.2.4), debido a que estos materiales presentan valores de pH más bajos que el suelo y al adicionarse en mayor proporción su incidencia sobre el pH del suelo es mayor. El pH disminuyó ligeramente con el tiempo en el suelo control mientras que en los suelos enmendados incrementó ligeramente o se mantuvo, de modo que después de 5 años todos los suelos presentaban, en general, valores semejantes de pH que oscilaban entre 7,7 y 8,0. A los 6 meses de la enmienda se observó un ligero incremento en los valores de pH de los suelos enmendados, lo cual es posiblemente debido a la producción de amonio durante la descomposición inicial de la materia orgánica; posteriormente el pH tendía a disminuir como consecuencia de la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular en la degradación de la materia orgánica (García, 1990) y de posibles fenómenos de nitrificación del  $NH_4^+$  y la consecuente producción de protones que van a acidificar el medio (McAndrew & Malhi, 1992). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas de pH al final del experimento, debidas al tipo de enmienda o a la distinta dosis aplicada.

Como comentamos anteriormente, una de las limitaciones que tiene la aplicación de los residuos orgánicos cuando se emplean como enmiendas al suelo, es el incremento de la conductividad eléctrica que puede generar en dicho suelo, debido a la elevada cantidad de aniones y cationes solubles que poseen estos materiales (Portal, 1986; Gallardo-Lara & Nogales, 1987; El-Shakweer et al., 1998). Un aumento de salinidad en el suelo puede tener efectos negativos sobre las propiedades físicas, microbiológicas y bioquímicas de los mismos (Liang et al., 2005; Tejada et al. 2006). Se admite que a partir de 2 dS  $m^{-1}$  ya disminuye el rendimiento de las plantas más sensibles.

Como se observa en la Tabla 4.2.5, todas las enmiendas orgánicas incrementaron la conductividad eléctrica del suelo al que habían sido incorporadas.

**Tabla 4.2.5. Evolución de la conductividad eléctrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) en los suelos enmendados y el control durante los 5 años de experimentación**

	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	182,2 (12,03)	140,2 (20,71)	160,4 (16,98)	124,2 (11,13)	109,0 (17,78)	145,6 (8,07)
S+RCd1	1722,3 (81,82)	542,3 (103,89)	729,0 (120,08)	356,0 (47,15)	350,8 (37,53)	335,7 (26,08)
S+RCd2	4256,7 (133,82)	1782,2 (104,57)	2139,7 (160,74)	1586,5 (95,58)	1152,2 (16,28)	1025,3 (61,98)
S+RFd1	1211,6 (99,08)	898,5 (132,45)	1119,3 (78,40)	545,3 (38,96)	367,5 (54,13)	313,0 (10,54)
S+RFd2	1443,2 (84,62)	2078,0 (38,00)	1735,6 (137,61)	1256,8 (170,50)	1252,0 (295,38)	625,3 (33,29)

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses). ( ): Error estándar,  $n=3$ .

Este aumento en la conductividad eléctrica es debido a la mineralización de la materia orgánica y a la acumulación de las sales. Al tratarse de un experimento de campo de larga duración la conductividad eléctrica fluctuará no sólo con el tipo y la dosis de aplicación de la enmienda orgánica, sino que su evolución en el suelo se verá igualmente determinada por las condiciones ambientales, sobretudo en climas semiáridos. Inicialmente, la adición de las enmiendas orgánicas produjo un aumento significativo de la conductividad eléctrica en todos los suelos enmendados y durante todo el periodo experimental los valores de conductividad de los suelos enmendados se mantuvieron por encima de los del suelo control, lo cual coincide con lo observado por otros autores en ensayos similares ( Bernal et al., 1992; Díaz-Marcote, 1994; Ros, 2000). Los suelos tratados con la dosis más alta de compost (S+RCd2) eran los que mostraban inicialmente los valores más elevados de conductividad eléctrica, sin embargo, estos valores disminuyeron considerablemente durante los 6 primeros meses de experimentación. En todos los casos se observó una clara disminución de la conductividad eléctrica con el tiempo, debido a los lavados de las sales por efecto de las lluvias así como a la absorción de nutrientes por la vegetación que se desarrolló de modo espontáneo en las parcelas, siendo todos los valores de conductividad eléctrica después de 5 años, aceptables para ese tipo de suelo. Este incremento inicial de la conductividad eléctrica seguido de un decrecimiento a lo largo del tiempo, coincide con lo observado por otros autores en experimentos de rehabilitación de suelos degradados utilizando dosis más bajas de enmienda, llegando los suelos enmendados a presentar con el tiempo valores similares a los del suelo control (White et al., 1997; Ros et al, 2003; Bastida et al, 2007).

### Manejo por mulching

En cuanto a las parcelas donde las enmiendas fueron añadidas mediante mulching, se observó que 5 años después de la adición de la enmienda, los suelos enmendados mostraban valores de pH significativamente superiores a los del suelo control, a excepción del tratamiento S+RCd2M. Este aumento puede ser debido al aumento de las bases de cambio que aportan las enmiendas a los suelos (Shen et al., 1996), manteniéndose estos mayores valores incluso después de 5 años. No obstante, el aumento que experimentan los suelos al ser tratados con mulching no supone un efecto importante, debido a que en

todos los casos el rango de pH se encuentra entre 7,5 y 8,5, no tratándose por tanto de valores que puedan representar un efecto perjudicial sobre las poblaciones vegetales o microbianas del suelo (Figura 4.2.4).

Si comparamos el efecto del modo de adición de la enmienda orgánica (por incorporación en la capa arable o en mulching) sobre los valores de pH 5 años después de la enmienda, observamos que el tipo de manejo de la enmienda influye en los valores de pH del suelo, mostrando los suelos tratados en mulching valores de pH, en general, más elevados que los de los suelos donde la enmienda se incorporó a la capa arable, particularmente con la adición de RF (Figura 4.2.4).

Con respecto a la conductividad eléctrica, los valores encontrados en los suelos de las parcelas en mulching eran semejantes a los encontrados en las parcelas con incorporación de la enmienda en la capa arable, presentando tan sólo el suelo tratado en mulching con la dosis más alta de RF valores de conductividad significativamente superiores a los del suelo con incorporación de la enmienda (Figura 4.2.4). En ningún caso se superaban los valores de  $2 \text{ dS m}^{-1}$ , por lo que se considera que tampoco existe riego de salinización del suelo cuando se emplea la técnica de mulching.

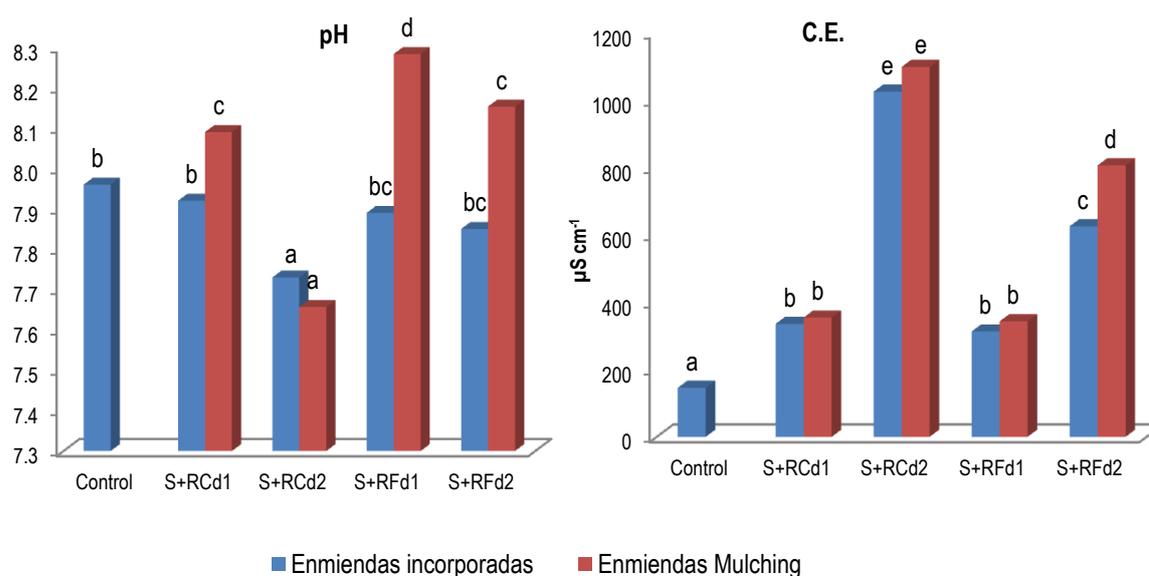


Figura 4.2.4. Valores de pH y conductividad eléctrica (CE) en los suelos con incorporación de enmienda en la capa arable y tratados en mulching 5 años después de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

El hecho de que tras 5 años de haberse producido la adición de la enmienda, los valores de C.E. permanezcan altos es debido a la escasez de lluvia, lo cual impide el lavado de las sales que se adicionan con las enmiendas orgánicas, a pesar del tiempo transcurrido, pero pese a los altos valores presentados por las parcelas enmendadas con compost en dosis alta, no consideramos que estos valores de conductividad eléctrica sean problemáticos, excepto para algún tipo de planta excesivamente sensible. De hecho, como se ha comentado anteriormente, los suelos tratados con la dosis más alta de compost eran los que mostraban mayores valores de cobertura vegetal. Estos valores de CE tampoco serán perjudiciales

para las poblaciones microbianas, como pusieron en su día de manifiesto algunos autores (García et al., 1996).

### **Parámetros químicos**

#### **Estado nutricional del suelo**

Como hemos visto anteriormente, a los materiales orgánicos utilizados en este experimento (RC y RF) se les puede atribuir un cierto valor fertilizante en cuanto a su contenido en nitrógeno, fósforo y potasio, nada despreciable por otra parte, desde un punto de vista nutricional (Tabla 4.1.2 del apartado 4.1.2 del Capítulo IV de esta Memoria).

Por ello, con la incorporación de enmiendas orgánicas a suelos degradados ubicados en regiones semiáridas como la Mediterránea, se puede conseguir un doble objetivo: incrementar su contenido en materia orgánica, con todo lo que esto conlleva, y mejorar el estado nutricional del suelo. Ambos factores se consideran claves para mejorar la calidad del suelo. Con la incorporación de este tipo de enmiendas al sistema suelo-planta se aprovechará el potencial fertilizante que encierra su doble carga, orgánica y mineral.

#### **Nitrógeno total y sus fracciones**

El nitrógeno es el macronutriente de mayor importancia en la producción vegetal. El nitrógeno es el único nutriente esencial para las plantas que no es liberado a partir de los minerales en los suelos, que es requerido en concentraciones relativamente altas por la mayoría de las plantas, y cuyas funciones biológicas dentro de los sistemas vivos le sitúan como un importante constituyente de proteínas, ácidos nucleicos, porfirinas y alcaloides. En los ecosistemas terrestres casi el 95% del nitrógeno total se encuentra asociado a la materia orgánica de los mismos (Schulten & Schnitzer, 1998). El nitrógeno es absorbido por las raíces bajo las formas de ión nitrato e ión amonio.

#### **Manejo por incorporación de la enmienda en la capa arable del suelo**

La incorporación de los distintos enmendantes al suelo aumentó el contenido en nitrógeno total del mismo, siendo las diferencias, para una misma dosis de aplicación, entre los suelos enmendados con RF y los enmendados con compost poco notables (Figura 4.2.5). El contenido de N total permaneció prácticamente constante durante el tiempo de experimentación lo que sugiere que las pérdidas de este nutriente producidas por lixiviación o volatilización (amonio) se ven compensadas por los "input" que llegan al ecosistema. Cinco años después de la enmienda, los suelos tratados a la dosis más alta presentaban para ambas enmiendas contenidos de N total significativamente superiores al del suelo control (Tabla II.1 del Anexo).

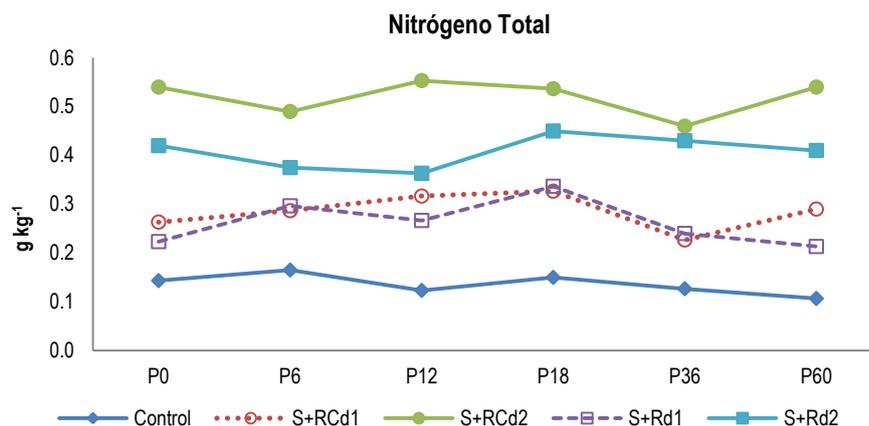


Figura 4.2.5. Evolución del contenido de N total en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

El nitrógeno en forma de amonio es fácilmente disponible para las plantas. Si los niveles de amonio se acumulan en el suelo más rápidamente de lo que lo toman las plantas, las bacterias del suelo (bacterias nitrificantes) lo transforman en nitrato.

La adición de las enmiendas orgánicas produce inicialmente un incremento considerable del contenido de amonio del suelo, mayor cuanto mayor es la dosis (Figura 4.2.6; Tabla II.2 del Anexo). Este incremento de amonio es debido, por una parte al aportado por la propia enmienda y por otra, a que en la primera fase de mineralización de estos materiales se produce amonio. Sin embargo, este amonio disminuye rápidamente con el tiempo debido a su absorción por las plantas, pérdidas por lixiviación o volatilización y a su transformación en nitratos por parte de las bacterias nitrificantes presentes en el suelo (Ros et al., 2000).

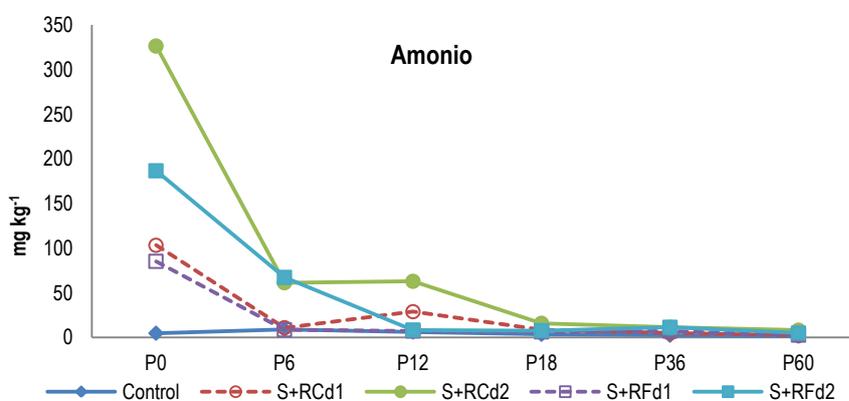


Figura 4.2.6. Evolución del contenido amonio en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

El problema ambiental más importante relativo al ciclo del N, es la acumulación de nitratos en el subsuelo que, por lixiviación, pueden incorporarse a las aguas subterráneas o bien ser arrastrados hacia los cauces y reservorios superficiales. La lixiviación de nitratos hacia el subsuelo puede contaminar los acuíferos subterráneos, creando graves problemas de salud si se consume agua rica en nitratos, debido a su transformación en nitritos por participación de unas bacterias existentes en el estómago y vejiga urinaria. A su vez, los nitritos se transforman en ciertos compuestos cancerígenos (nitrosaminas), que afectan al estómago e hígado. La cantidad de nitratos que se lixivian hacia el subsuelo depende del régimen de pluviosidad y del tipo del suelo. La mayoría de los suelos poseen abundantes partículas coloidales, tanto orgánicas como inorgánicas, cargadas negativamente, con lo que repelerán a los aniones, y como consecuencia, estos suelos lixiviarán con facilidad a los nitratos.

Ya que el nitrógeno contenido en los residuos urbanos se encuentra principalmente en forma orgánica (Ayuso, 1996), la adición de las enmiendas no incrementaba inicialmente el contenido de nitratos del suelo (Figura 4.2.7). A medida que la materia orgánica aportada con los residuos se iba mineralizando, el nitrógeno orgánico era transformado a formas inorgánicas de N y el contenido de nitratos en los suelos enmendados iba incrementando, observándose un máximo en el contenido de nitratos a los 12 meses (S+RF d1 y d2) y 18 meses (S+RCd2) de la enmienda, disminuyendo a continuación (Figura 4.2.7). Los valores más elevados de nitratos se produjeron en los suelos enmendados con RF (valor máximo de 0,2%) observándose pocas diferencias entre las dos dosis empleadas. En el caso del compost los contenidos de nitratos de los suelos enmendados a la dosis más alta (valor máximo 0,168%) fueron superiores a los de los suelos enmendados a dosis baja (valores entre 0,026 y 0,039%) durante todo el tiempo experimental. Estas concentraciones elevadas de nitratos en las dosis altas eran de esperar, pero debemos tener en cuenta que pretendemos con este estudio profundizar sobre el comportamiento de las dosis altas de residuos orgánicos en este tipo de suelos y para ello debemos tener presente que existirá un balance entre las características positivas que genera el aporte de materia orgánica exógena y los riesgos y perjuicios que estas dosis puedan conllevar.

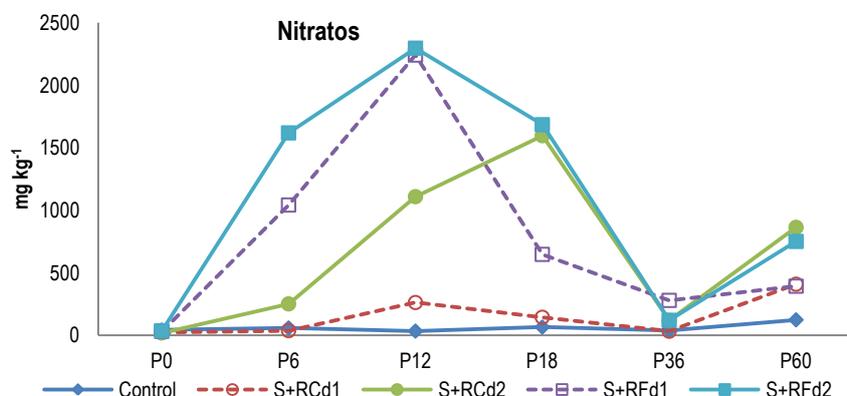


Figura 4.2.7. Evolución en los nitratos en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

Tuvimos en cuenta este previsible efecto de los nitratos en el suelo realizando el estudio de nuestras parcelas en una zona no considerada como vulnerable y en la que la capa freática no se encontraba cerca de la superficie.

Como hemos indicado se apreciaba una disminución pronunciada en el contenido de nitrato de los suelos enmendados al final del experimento donde los mayores valores los presentan los suelos enmendados a la dosis más alta (0,085-0,075%) mientras que los contenidos de nitratos de los suelos enmendados a la dosis más baja no difieren significativamente de los del suelo control (0.04-039%)( Tabla II.3 del Anexo).

### Manejo por mulching

La adición de los materiales orgánicos mediante mulching aumentó en la misma medida que la adición mediante incorporación en la capa arable el contenido de N total del suelo, excepto para S+RCd2M que presentaba mayor contenido de N que S+RCd2 (Figura 4.2.8). Para el resto de los tratamientos los contenidos de N total en los suelos enmendados a los 5 años de la adición de la enmienda eran semejantes independiente del modo de adición de la enmienda al suelo (por incorporación o por mulching). Esto es posiblemente debido a que trascurrido un tiempo, los procesos de mineralización y humificación tienden a igualar el contenido de este elemento en el suelo.

Cabe destacar que todas las parcelas enmendadas presentaban mayores valores de N total que el control tras 5 años de la incorporación de la enmiendas, lo que supone una mejora importante de la calidad del suelo desde un punto de vista agronómico.

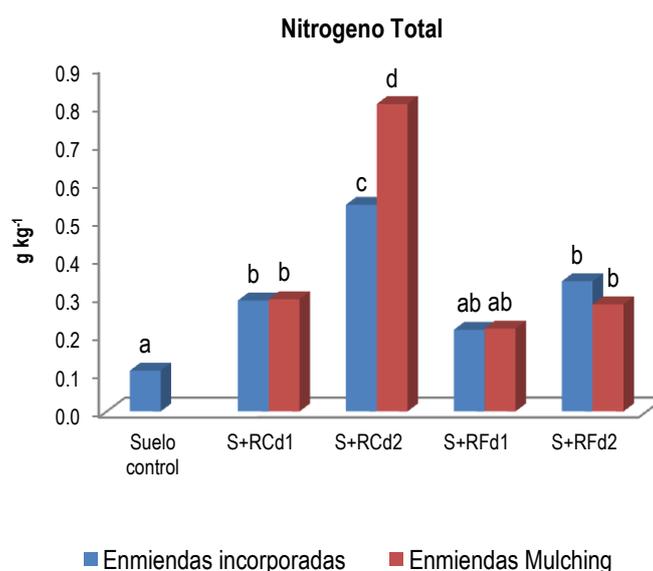


Figura 4.2.8. Contenido de N total en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey (P ≤ 0,05).

El amonio producido por los materiales orgánicos y que es oxidado y actúa como sustrato de la nitrificación, puede verse afectado tanto por la cantidad como por la calidad de la materia orgánica añadida (Wheatley et al., 2001) y de hecho, algunos autores observaron que la adición de materiales orgánicos al suelo incrementa el potencial de nitrificación (Hopkins et al., 1997; Wheatley et al., 2001). El modo de adición de la enmienda tampoco afectaba de modo considerable, 5 años después de la adición de la enmienda, al contenido de amonio del suelo (Figura 4.2.9).

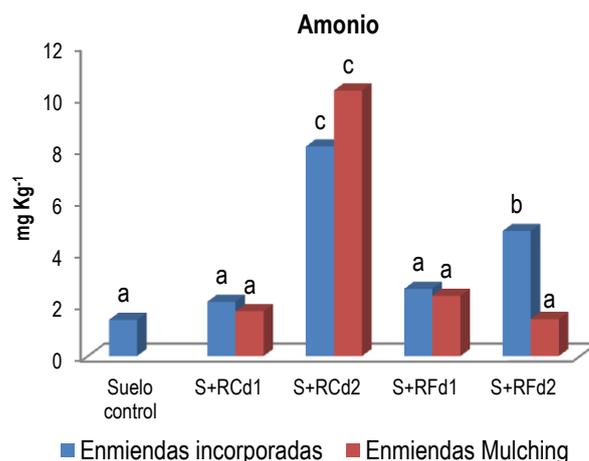


Figura 4.2.9. Contenido de amonio en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

El contenido de nitratos incrementaba de forma significativa en los suelos enmendados mediante mulching con relación a los suelos enmendados mediante incorporación de la enmienda en la capa arable del suelo (Figura 4.2.10), indicando que la mineralización del nitrógeno orgánico se ve afectada por el manejo que reciban las enmiendas orgánicas.

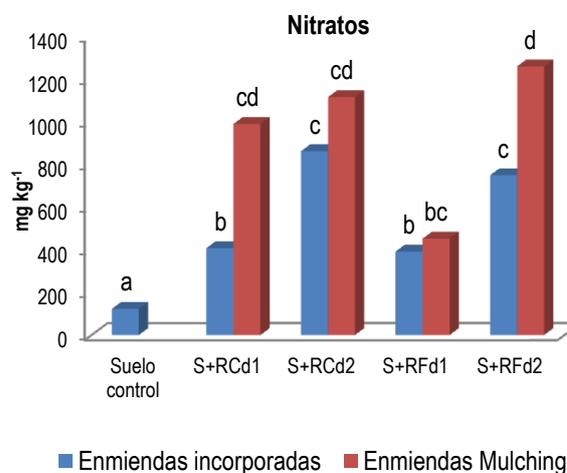


Figura 4.2.10. Contenido de nitratos en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Cabe pensar que la mayor retención de agua derivada de la aplicación del mulching haya contribuido a una menor lixiviación de este compuesto por efecto de la lluvia. Son muchas las investigaciones que demuestran que el uso de mulching en los suelos provoca una retención de humedad incluso en regiones áridas y semiáridas (Gill et al., 1996; Zaongo et al., 1997) y que la lixiviación desde las enmiendas al suelo se producen de forma más pausada, lo que explicaría el hecho de que 5 años después de la enmienda los suelos tratados con mulching presenten mayor cantidad de nitratos que los suelos donde las enmiendas se incorporaron a la capa arable.

Al igual que se observó en los suelos con adición de enmienda mediante incorporación, las parcelas en mulching mostraban a los 5 años de la incorporación de la enmienda contenidos en nitrógeno orgánico y formas minerales de N, producidas en los procesos de mineralización, significativamente superiores a los del suelo control.

El estudio comparativo del efecto de la técnica de aplicación de la enmienda (mulching o incorporación en la capa arable) sobre este nutriente, ha puesto de manifiesto que las diferentes técnicas de incorporación de la enmienda no establecían grandes diferencias en cuanto al contenido de amonio y de N total del suelo pero que sin embargo, si influenciaban el contenido de nitratos de los suelos presentando las parcelas en mulching contenidos de nitratos significativamente superiores, siendo el tratamiento S+RFd2M el que presentaba el mayor contenido de este compuesto.

### **Fosforo total y extraíble**

El fósforo es un macro-elemento esencial para el crecimiento de las plantas. La concentración de fósforo en el suelo suele ser baja, no superando el 0.5% en todas sus formas. En materiales orgánicos como los residuos orgánicos urbanos, entre un 50 y un 70% del fósforo existente se suele encontrar en forma inorgánica (Darst & Murphy, 1990).

Para que el fósforo pueda ser asimilado por las plantas tiene que encontrarse en forma inorgánica. Para ello, el fósforo orgánico contenido en la materia orgánica se mineraliza por la acción de los microorganismos del suelo (hidrólisis motivada por las enzimas fosfatasas) pasando a formas inorgánicas de fósforo, utilizables por las plantas. Este fósforo inorgánico puede sufrir una fijación biológica quedando inmovilizado en las estructuras de los microorganismos y por tanto, inaccesible para las plantas. A la muerte de estos, el fósforo en forma asimilable por la planta, puede también perderse por precipitación (formando fosfatos insolubles), adsorción en los coloides del suelo y en menor medida lixiviación. El contenido de fósforo asimilable del suelo será la resultante, por tanto, de todos estos procesos.

### **Manejo por incorporación de la enmienda en la capa arable del suelo**

Como se observa en la Figura 4.2.11, todos los tratamientos orgánicos produjeron inicialmente un aumento del contenido de fósforo total en el suelo. Este incremento se corresponde con el contenido en fósforo de los materiales utilizados y era significativamente superior (Tabla II.4 del Anexo) en el caso de las parcelas enmendadas con compost, siendo especialmente alto su valor para la dosis más alta (S+RCd2). Los contenidos de P total se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo del periodo experimental.

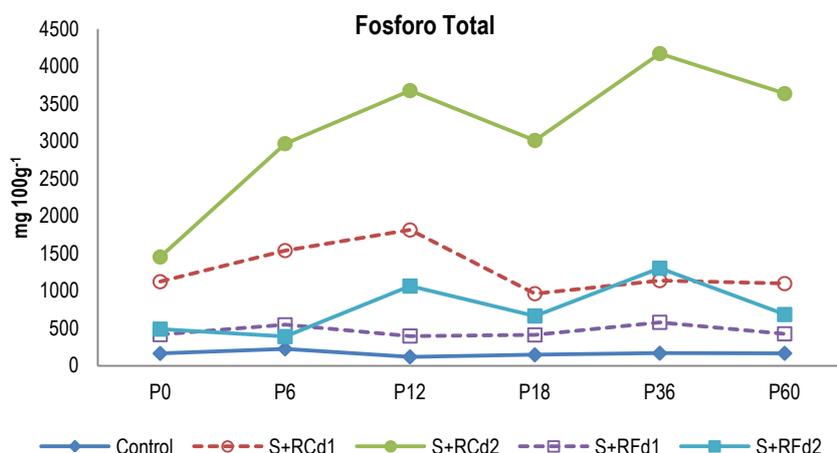


Figura 4.2.11. Evolución del contenido de fósforo total en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

En general, la aplicación de enmiendas orgánicas incrementa el contenido de fósforo extraíble en el suelo (Martínez *et al.* 2003, Larchevêque *et al.* 2008). En nuestro estudio, todos los suelos enmendados presentaron valores de fósforo extraíble superiores al del suelo control, siendo estos valores particularmente elevados en el tratamiento S+RCd2 al final del experimento (Figura 4.2.12; Tabla II.5 del Anexo). A igualdad de dosis, los suelos enmendados con compost presentaban mayores contenidos de P total y extraíble que los suelos tratados con RF, siendo estos contenidos mayores en los suelos tratados con la dosis más alta de enmienda.

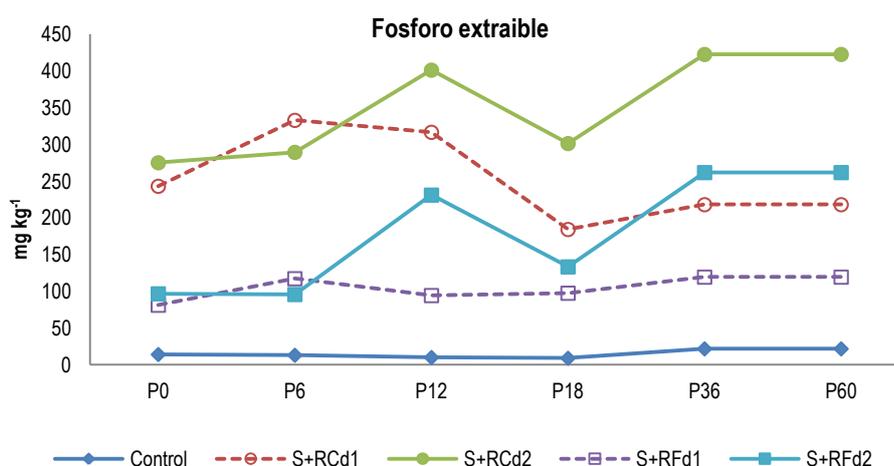


Figura 4.2.12. Evolución del contenido de fósforo extraíble en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

### Manejo por mulching

Los suelos enmendados mediante mulching mostraban, a igualdad de dosis, contenidos de P total semejantes a los de los suelos con incorporación de la enmienda en la capa arable, a excepción del tratamiento S+RCd2 que presentaba valores significativamente mayores en las parcelas en mulching (Figura 4.2.13).

Para el fósforo extraíble, sin embargo, vemos que los valores eran significativamente superiores para la dosis más alta en ambos materiales orgánicos, cuando las enmiendas son incorporadas en la capa arable en lugar de ser adicionadas en mulching. El menor contenido de fósforo extraíble observado en los suelos tratados en mulching a la dosis más alta podría deberse a que la mayor retención de agua que se produce en estas parcelas favorecería la absorción de este nutriente por las raíces de las plantas. Este hecho también fue observado por Pinamonti (1998), al incorporar residuos orgánicos de origen doméstico mediante mulching a los suelos.

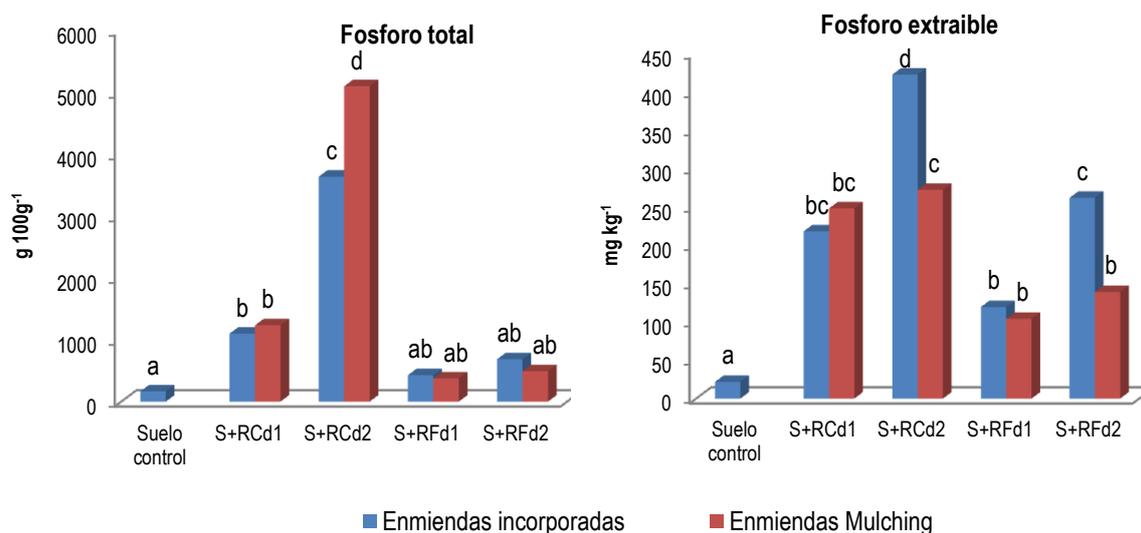


Figura 4.2.13. Contenido de fósforo total y fósforo extraíble en los suelos enmendados y control 5 años después de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Vemos que la incorporación de enmiendas orgánicas aumentaba en todos los casos y con ambos tipos de manejo, el contenido de fósforo total y extraíble con respecto al suelo control después de 5 años de haberse producido la aportación de la enmienda.

Estos resultados coinciden con los observados por otros autores. Así, Giusquiani et al. (1998) en un experimento de 12 meses de incubación observaron que la adición de la fracción orgánica de basuras domésticas a dos suelos diferentes incrementaba la solubilidad del fósforo, manteniéndose el incremento inicial hasta el final del experimento. O'Connor et al. (1986) tanto en experimentos de campo como de laboratorio, comprobaron que el lodo podía servir como un excelente enmendante para incrementar los niveles de fósforo en suelos calizos. Estos autores observaron asimismo, que el fósforo procedente del lodo

era bastante más soluble que el de otros residuos orgánicos y que incrementaba el nivel de este elemento en el suelo inmediatamente después de su adicción, manteniendo dicho nivel de fósforo extraíble durante un periodo de tiempo comprendido entre uno y dos años.

### Potasio total y extraíble

El potasio suele encontrarse en el suelo en mayores cantidades que el fósforo, variando su contenido entre 0,5 y 3%. De cualquier forma este elemento suele ser difícilmente utilizable al estar retenido por las arcillas o formar parte de estructuras y redes cristalinas. Este elemento debido a su movilidad dentro de la planta, neutraliza los ácidos orgánicos resultantes del metabolismo, aumenta la actividad fotosintética y es el principal regulador de la economía hídrica, ya que actúa sobre la presión osmótica celular, disminuyendo la transpiración y manteniendo turgentes las células. Además, el potasio es un importante activador enzimático.

#### Manejo por incorporación de la enmienda en la capa arable del suelo

El contenido de potasio, incluido el detectado en el suelo control, presentaba un comportamiento similar, independientemente del tipo de enmienda incorporada, durante todo el periodo experimental (Figura 4.2.14). Si bien inicialmente los contenidos de potasio total en los suelos enmendados mediante la incorporación de la enmienda eran significativamente superiores para las dosis altas al del suelo control, a partir de los 6 meses de la aplicación de las enmiendas, las diferencias entre los suelos tratados y control dejaban de ser estadísticamente significativas (Tabla II.6 del Anexo), si bien los contenidos se mantenían por encima del contenido del control.

Cabe destacar que, en general, la concentración de potasio en los materiales orgánicos utilizados no es alta (0,79 para RF y 0,81% para el compost, Tabla 4.2.2). A pesar de ello, dicho potasio se encuentra en su mayor parte en forma inorgánica (Costa et al., 1991, Hernández, 1994) y esto hace que sea fácilmente asimilable por las plantas (Perez et al., 1986).

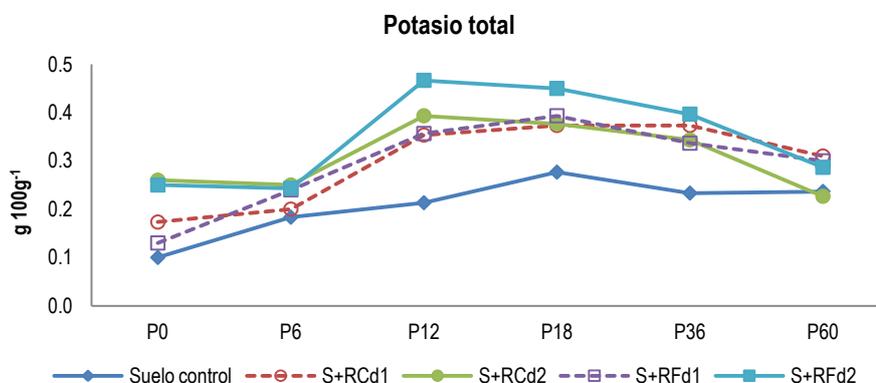


Figura 4.2.14. Evolución del contenido de potasio total en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de la incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

En relación con el potasio extraíble, todos los enmendantes orgánicos incrementaron significativamente su contenido en el suelo, apreciándose un mayor incremento inicial con la enmienda de compost en dosis alta (S+RCd2) (Figura 4.2.15; Tabla II.7 del Anexo). Esto se debe a que si bien la concentración de potasio en los materiales orgánicos no es alta, la mayor parte de este potasio se encuentra en forma inorgánica, por todo esto, aunque los valores de potasio total no se ven especialmente afectados por la enmienda, sí se aprecia un incremento significativo en el potasio extraíble. A los 5 años de la enmienda, todos los suelos enmendados mostraban asimismo, valores de K extraíble significativamente superiores al del suelo control.

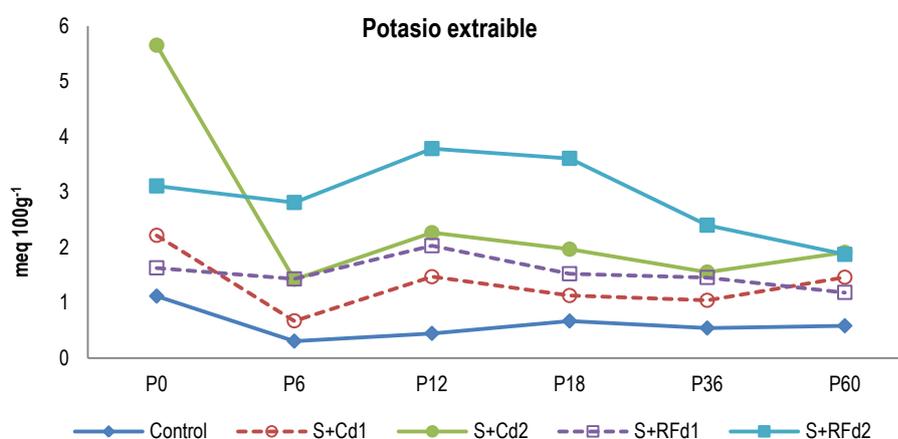


Figura 4.2.15. Evolución del contenido de potasio extraíble en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

### Manejo por mulching

Al igual que ocurría en las parcelas tratadas con incorporación de la enmienda, en las parcelas en mulching no se apreciaban, a los 5 años de la enmienda, diferencias significativas entre los contenidos de K total de los suelos enmendados y el control; sin embargo, los suelos enmendados presentaban contenidos de K extraíble significativamente superiores al control, mayores cuanto mayor había sido la dosis de enmienda aplicada inicialmente (Figura 4.2.16).

En cuanto a la influencia del distinto modo de aplicación de la enmienda sobre el contenido en el suelo de este elemento, comparado los contenidos de K, tanto total como extraíble, de las parcelas en mulching con los de las parcelas con incorporación de la enmienda, no se observaron diferencias significativas ni en el potasio total ni en el potasio extraíble, presentando los suelos al cabo de 5 años contenidos similares de este nutriente independientemente del tipo de manejo de la enmienda utilizado (Figura 4.2.16).

Destacar que mientras el contenido de potasio extraíble no se ve influenciado por el tipo de manejo empleado para la adición de la enmienda, sí se observan diferencias significativas en cuanto a la dosis empleada, siendo los contenidos de K extraíble en los suelos tratados a la dosis más alta significativamente superiores a los de los suelos tratados a la dosis más baja con ambos enmendantes orgánicos.

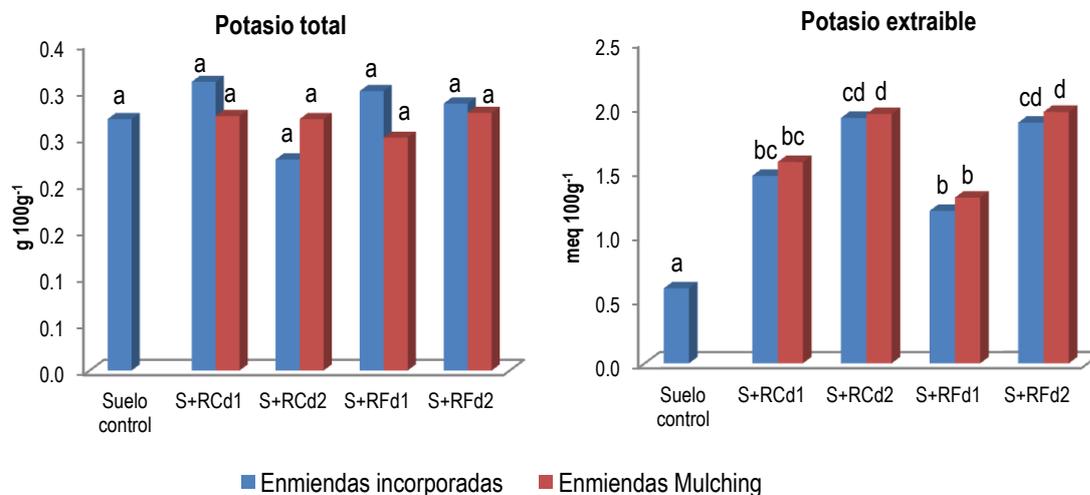


Figura 4.2.16. Contenido de potasio total y potasio extraíble en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Podemos concluir que el estado nutricional de los suelos enmendados se ha visto mejorado al incrementarse las formas extraíbles de los principales macronutrientes, destacando los mayores valores presentados por el tratamiento con compost a la dosis más alta, tanto en las parcelas con incorporación de las enmiendas en la capa arable del suelo como en las tratadas en mulching.

Durante el tiempo de realización del experimento, se producen cambios lógicos en todos los macronutrientes, en particular cuando se determinan sus formas asimilables por la planta. Además de los fenómenos físicos y químicos a que se ven sometidos los mencionados macronutrientes, la aparición de vegetación espontánea en las parcelas también influye sobre los contenidos de dichos elementos.

### Micronutrientes y metales pesados en los suelos

Una de las mayores limitaciones en la aplicación de residuos orgánicos a los suelos, reside en los aportes de algunos contaminantes que pueden formar parte de su composición, destacando los metales pesados por su toxicidad y persistencia en los ecosistemas. Algunos elementos son micronutrientes esenciales para las plantas, pudiendo ser considerados como tóxicos cuando sus concentraciones alcanzan niveles altos en el sistema. Por ello, el análisis de estos elementos en los suelos enmendados tiene un doble propósito: por un lado, estudiar el aspecto nutricional de los aportes realizados con estos residuos orgánicos y, por otro, establecer los posibles riesgos de contaminación por una acumulación excesiva de los mismos.

En general, se suele utilizar el concepto de *metales pesados* para definir aquellos elementos que se consideran contaminantes ambientales por ser tóxicos a pequeñas concentraciones y por tener un efecto persistente y acumulativo. Bajo la denominación de metales pesados suelen incluirse una serie de elementos de la Tabla Periódica que muestran como rasgos comunes ciertas propiedades metálicas y una

densidad superior a  $6 \text{ g cm}^{-3}$ , además de compartir una característica fundamental que determina la trascendencia de su estudio: su potencial tóxico al intervenir en los procesos bioquímicamente activos de los organismos vivos.

### Elementos totales

La evolución de los elementos totales que han sido introducidos con las adiciones de enmiendas orgánicas en experimentos de larga duración, puede ser una buena herramienta para entender la dinámica que siguen en el suelo y como afectan al resto de componentes del ecosistema. El incremento del contenido de metales pesados en el suelo es uno de los principales efectos negativos que se han indicado de modo general como consecuencia de la aplicación al suelo de compost de residuos orgánicos (Moreno et al., 2003; Belyaeva et al., 2005).

#### Manejo por incorporación de la enmienda en la capa arable del suelo

Las enmiendas orgánicas utilizadas aportaban metales pesados al suelo, mostrando los suelos enmendados contenidos superiores a los del suelo control en la mayoría de los casos (Tabla 4.2.7). El zinc era el elemento que más incrementaba con la adición de las enmiendas, seguido por el cobre y el plomo, en este orden. Los mayores incrementos en estos elementos se observaron con la adición de compost, en particular cuando se adicionaba en la dosis más alta. No obstante, a pesar de la gran cantidad de residuo adicionado al suelo en la dosis más alta, el contenido de metales pesados en los suelos enmendados estaba en todos los casos por debajo de los límites establecidos para suelos por la legislación de la Unión Europea (European directive 86/278/CEE) (Tabla 4.2.6).

**Tabla 4.2.6. Límites de la UE para metales pesados en suelo (European Directive 86/278/CEE)**

Metales pesados	Límites EU
Cd / $\text{mg kg}^{-1}$	3,00
Cu / $\text{mg kg}^{-1}$	210
Cr / $\text{mg kg}^{-1}$	150
Ni / $\text{mg kg}^{-1}$	112
Pb / $\text{mg kg}^{-1}$	300
Zn / $\text{mg kg}^{-1}$	540

El contenido en cromo no se vio incrementado, en general, por la adición de las enmiendas, y únicamente en el caso de S+RCd2 se observaron cantidades de este elemento ligeramente superiores a las del suelo control a lo largo del tiempo de experimentación (Tabla 4.2.7). Asimismo, las enmiendas orgánicas utilizadas no introducen Cd en el suelo, presentando todos los suelos contenidos similares de este elemento e inferiores, en general, a  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  (Tabla 4.2.7).

Los valores de metales pesados encontrados en los suelos enmendados en estos suelos no parecen tener efectos adversos ni sobre las plantas ni sobre los microorganismos del suelo, a juzgar por el desarrollo de

cobertura vegetal observado y los resultados obtenidos en el análisis de algunas propiedades microbiológicas y bioquímicas en los mismos.

**Tabla 4.2.7. Evolución del contenido de metales pesados en el suelo control y suelos enmendados tras 5 años de la incorporación de la enmienda.**

Zn (ppm)	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	14,13 (2,41)	30,45 (2,58)	22,70 (2,08)	20,17 (2,29)	28,97 (1,65)	17,57 (0,64)
S+RCd1	52,65 (2,55)	86,10 (16,95)	103,56 (4,10)	68,49 (3,04)	124,30 (10,80)	78,17 (12,88)
S+RCd2	199,60 (25,20)	156,70 (21,75)	210,29 (48,79)	278,88 (20,68)	159,17 (10,30)	183,70 (37,71)
S+RFd1	18,33 (4,19)	28,93 (3,41)	39,49 (4,02)	42,74 (9,06)	57,83 (4,19)	35,57 (7,14)
S+RFd2	39,50 (4,75)	22,75 (8,34)	67,84 (19,60)	63,45 (14,67)	145,13 (4,75)	66,50 (11,18)
Cu (ppm)	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	4,85 (0,05)	4,65 (0,05)	14,07 (2,56)	12,87 (1,81)	14,03 (0,51)	6,17 (0,23)
S+RCd1	22,05 (1,30)	22,20 (0,75)	47,80 (7,31)	32,42 (1,87)	65,60 (10,30)	29,47 (3,89)
S+RCd2	92,90 (3,80)	51,50 (6,30)	100,41 (9,84)	128,93 (12,72)	67,50 (6,58)	70,27 (9,05)
S+RFd1	6,45 (0,85)	7,85 (0,25)	16,91 (1,24)	17,06 (1,05)	24,87 (2,60)	11,43 (0,38)
S+RFd2	11,27 (0,95)	6,15 (1,27)	35,23 (0,27)	27,94 (1,16)	36,83 (9,50)	17,73 (5,17)
Pb (ppm)	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	7,83 (1,32)	5,07 (1,32)	30,70 (1,46)	25,41 (2,43)	18,10 (9,86)	4,53 (0,23)
S+RCd1	14,07 (3,61)	11,93 (3,61)	42,54 (3,03)	32,69 (0,41)	12,47 (4,83)	12,00 (4,01)
S+RCd2	30,07 (0,80)	18,50 (0,80)	51,40 (0,63)	67,90 (7,07)	24,73 (5,83)	22,30 (6,59)
S+RFd1	9,20 (2,18)	8,10 (2,18)	31,98 (1,06)	32,46 (3,52)	13,77 (0,49)	9,07 (1,30)
S+RFd2	15,45 (2,05)	7,75 (2,05)	29,72 (1,39)	37,19 (3,72)	39,60 (2,70)	14,50 (3,91)
Cr (ppm)	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	6,15 (1,45)	9,35 (0,40)	4,20 (0,99)	17,40 (1,33)	13,88 (2,50)	19,60 (1,44)
S+RCd1	7,30 (1,71)	9,70 (0,80)	6,10 (1,31)	25,01 (0,84)	19,19 (1,32)	17,87 (2,78)
S+RCd2	6,00 (0,75)	27,85 (0,30)	11,60 (4,98)	42,60 (5,86)	46,67 (2,20)	34,50 (7,80)
S+RFd1	6,53 (0,10)	4,50 (0,70)	5,67 (3,09)	17,72 (1,86)	12,44 (1,50)	16,50 (3,35)
S+RFd2	7,13 (0,09)	7,10 (1,70)	5,68 (2,10)	13,46 (2,33)	13,90 (2,48)	21,03 (1,27)
Cd (ppm)	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	0,60 (0,02)	<0,5	0,68 (0,06)	0,60 (0,04)	<0,5	<0,5
S+RCd1	0,83 (0,05)	<0,5	0,97 (0,14)	0,97 (0,20)	0,77 (0,06)	<0,5
S+RCd2	0,93 (0,02)	<0,5	1,28 (0,06)	1,38 (0,23)	0,67 (0,05)	<0,5
S+RFd1	0,63 (0,03)	<0,5	0,64 (0,03)	0,61 (0,03)	0,93 (0,15)	<0,5
S+RFd2	0,93 (0,07)	<0,5	0,64 (0,04)	0,60 (0,02)	0,60 (0,85)	<0,5

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses). ( ): error estándar, n=3.

Para las parcelas mulching vemos que los niveles de estos elementos tampoco han sobrepasado los límites establecidos por la normativa legal vigente (Tabla 4.2.8).

**Tabla 4.2.8. Contenido de metales pesados en el suelo control y en los suelos enmendados mediante mulching tras 5 años de la incorporación de la enmienda.**

	Cd (ppm)	Cu (ppm)	Cr (ppm)	Ni (ppm)	Pb (ppm)	Zn (ppm)
S+RCd1M	<0,5	29,8 (9,03)	11,23 (2,17)	5,96 (1,14)	12,20 (0,78)	87,43 (12,75)
S+RCd2M	<0,5	123,13 (16,41)	38,73 (9,04)	21,73 (2,51)	45,00 (7,62)	308,75 (27,05)
S+RFd1M	<0,5	7,33 (1,76)	7,15 (0,75)	6,30 (1,10)	6,36 (0,81)	37,10 (5,46)
S+RFd2M	<0,5	10,33 (1,42)	6,33 (1,08)	5,73 (0,32)	9,92 (1,82)	45,23 (5,15)

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. ( ): error estándar, n=3.

La aplicación de compost, especialmente en dosis alta, sigue presentando valores más altos para todos los elementos con respecto a los suelos enmendados con RF, mostrando una mayor persistencia de estos elementos en el sistema.

Hay que tener en cuenta que los suelos donde se realiza la enmienda orgánica tienen pH neutro-básico, lo cual unido al hecho de que son suelos calizos, colabora decididamente a insolubilizar metales pesados en el suelo, no facilitando su paso a la planta. También cabe destacar que esta aportación de enmienda es única y que por eso se pueden utilizar estas dosis tan elevadas de enmienda, ya que no hay riesgo de acumulación por aportes continuados de estos elementos.

#### Conclusiones parciales:

*Podemos concluir que, independientemente del modo de aplicación de la enmienda (en superficie o mediante incorporación a la capa arable del suelo), la adición de ambos tipos de enmienda al suelo mejora a ambas dosis las propiedades físicas del mismo, incrementado su porosidad, capacidad de retención hídrica y el porcentaje de agregados estables, mostrándose el compost más eficiente que el residuo fresco en la mejora de estas propiedades físicas. Hay que destacar el hecho de que mientras en el caso del compost el incremento de la dosis lleva aparejado un incremento del efecto positivo de la enmienda sobre las propiedades físicas del suelo, en el caso del residuo fresco esta mejora con el incremento de la dosis sólo es evidente en relación a la porosidad del suelo.*

*El tipo de manejo seguido para la aplicación de la enmienda (incorporación o mulching) no juega un papel relevante en la mejora de las propiedades físicas del suelo consideradas en este estudio.*

*En cuanto a los valores de pH del suelo vemos que a pesar de observarse ciertas fluctuaciones con la adición de las enmiendas, estas variaciones no son importantes, manteniéndose los pH de los suelos enmendados muy cercanos en todo momento al pH del suelo control, lo cual es normal dado el carácter ciertamente básico del suelo, cercano al presentado por las enmiendas incorporadas. Por tanto el suelo no experimenta un cambio de pH que pueda provocar un comportamiento distinto en el resto de parámetros del mismo.*

*Por otra parte, aunque las enmiendas orgánicas aumentaron la CE del suelo, los valores más altos en los suelos enmendados, al final del experimento, están por debajo del umbral de  $2 \text{ dS m}^{-1}$  establecido como perjudicial para las plantas sensibles a la salinidad. Del mismo modo, la mayor acumulación de nitratos observada en los suelos enmendados tampoco resulta preocupante ya que debido a que los nitratos se liberan gradualmente, y solo se realiza una única adición de materia orgánica, la lixiviación de los nitratos resultantes de esta práctica no es probable que resulte problemática, especialmente en las zonas semiáridas donde la lluvia es escasa. Tampoco se ha observado un incremento preocupante de metales pesados en los suelos enmendados ya que aún en los suelos tratados con la dosis más elevada de enmienda los contenidos de estos elementos quedaban por debajo de los límites establecidos por la normativa vigente.*

*En cuanto al potencial de las enmiendas orgánicas como fertilizantes, los datos obtenidos ponen de manifiesto que estas enmiendas pueden actuar como una fuente alternativa de nutrientes de lenta liberación evitando así, al menos en parte, la pérdida de nutrientes por lixiviación o insolubilización (Tognetti et al., 2008; Dimas López et al., 2001) y suministrando energía altamente disponible para los microorganismos del suelo (Anderson & Domsch, 1989). Durante el tiempo de realización del experimento, se producen cambios lógicos en todos los macronutrientes, observándose cinco años después de la enmienda una mejora de la calidad nutricional del suelo.*

*El modo de aplicación de la enmienda al suelo, por incorporación en la capa arable, o disposición en superficie (mulching), no influye, en general, en el efecto de la enmienda sobre estos parámetros del suelo.*

*Con carácter general hemos de indicar que el posible efecto tóxico que estos materiales poseen y que es transferido al suelo con su reciclaje en el mismo, no es sencillo de evaluar. Debemos achacar este hecho a los efectos tanto positivos como negativos derivados de la enmienda, lo cual hace enmascarar unos con otros, dificultando así los criterios a emplear. Sin embargo, y por lo que hemos visto hasta el momento, el reciclaje en el suelo de compuestos orgánico como los propuestos por nosotros tiene más aspectos positivos que negativos, en particular cuando dicho reciclado se realiza de manera coherente.*

### **Efecto sobre el contenido de carbono orgánico y las propiedades microbiológicas del suelo**

#### **Evolución del carbono orgánico y sus fracciones**

Uno de los objetivos principales en la aplicación de enmiendas orgánicas en estos suelos degradados es recuperar y mantener la fertilidad natural en los suelos a través de incrementar sus contenidos en materia orgánica.

En este apartado se estudia la evolución de distintas fracciones de carbono determinándose los contenidos de carbono orgánico total además de los componentes más biodegradables de la materia orgánica, tales como el carbono hidrosoluble y los carbohidratos hidrosolubles, por constituir las fuentes de energía más inmediatas para los microorganismos del suelo. El estudio de las sustancias húmicas se realizará de forma más exhaustiva más adelante, por tratarse de parámetros que aportan gran información sobre el estado del "pool" de carbono estable en el suelo.

### Manejo por incorporación de la enmienda en la capa arable del suelo

El carbono orgánico total ( $C_{org}$ ) engloba a todas las fracciones orgánicas susceptibles de ser oxidadas existentes en el suelo, por lo que sus variaciones pueden informar de los procesos que sigue el carbono de los suelos que han recibido enmiendas orgánicas.

Todos los suelos enmendados presentaron a lo largo de todo el experimento contenidos de  $C_{org}$  significativamente ( $p \leq 0.05$ ) superiores a los del suelo control (Figura 4.2.17; Tabla II.8 del Anexo), siendo los valores de  $C_{org}$  de los suelos tratados con la dosis más alta de enmienda (d2) superiores a los de los suelos tratados con la dosis más baja (d1).

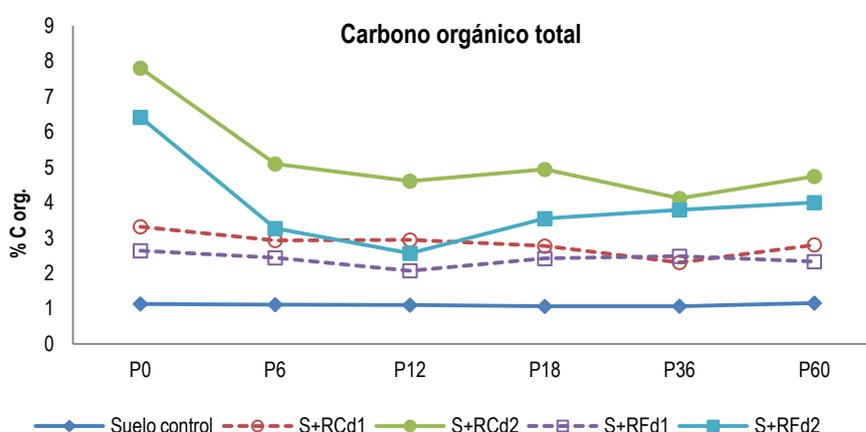


Figura 4.2.17. Evolución del carbono orgánico total. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

Hay que señalar que estas mayores cantidades de  $C_{org}$  detectadas en los suelos enmendados 5 años después de la enmienda no corresponden únicamente al C inicialmente aportado por la enmienda y fijado en el suelo, sino que también contribuyen a este “pool” de carbono los aportes derivados de los exudados radiculares y restos vegetales procedentes de la vegetación espontánea desarrollada en estos suelos.

El contenido de  $C_{org}$  del suelo control ha permanecido constante a lo largo de todo el periodo experimental, con valores comprendidos entre (1,06 y 1,15 % $C_{org}$ ), mientras que el contenido de  $C_{org}$  en los suelos tratados disminuyó durante los 12 primeros meses debido a la mineralización de la materia orgánica, incrementando ligeramente o manteniéndose constante a continuación. Según algunos autores (Pascual et al 1997, Ros et al 2000) aproximadamente la mitad de la materia orgánica adicionada con esta clase de enmiendas, se mineraliza en los 12 primeros meses. El ligero incremento de  $C_{org}$  observado a partir de los 12 meses de la enmienda puede ser debido, como ya hemos indicado, a la cubierta vegetal aparecida en las parcelas (Ros et al., 2003; Tejada et al., 2006, Bastida et al., 2008). La mayor cobertura vegetal presente en las parcelas enmendadas aporta una mayor entrada de carbono y contribuye así a los “inputs” de dicho carbono mediante los exudados radiculares y restos vegetales que se incorporan al suelo.

Se demuestra por tanto que las enmiendas orgánicas mejoran también a largo plazo la cantidad de carbono en el suelo, contribuyendo así a que se genere una reserva de este elemento en el mismo, hecho muy positivo si se consigue fijar dicho carbono en su fracción mineral donde queda protegido del ataque por parte de los microorganismos, y por tanto, poco susceptible a ser mineralizado, o en forma de compuestos de carbono resistentes a la mineralización.

El diferente tipo de enmienda empleada (RF o RC) no parece influir de modo significativo en el contenido total de  $C_{org}$  presente en el suelo 5 años después de la enmienda, observándose tan solo diferencias en los contenidos de  $C_{org}$  del suelo en función de la dosis de enmienda (d1 y d2) añadida inicialmente al suelo.

Con respecto a las fracciones más mineralizables, como son el carbono hidrosoluble y los carbohidratos hidrosolubles, se observó inicialmente un incremento significativo ( $p \leq 0,05$ ) del contenido de estas fracciones de carbono con la adición de las enmiendas, que era más acusado en el suelo tratado con la dosis más alta de compost (Figura 4.2.18; Tabla II.9 del Anexo).

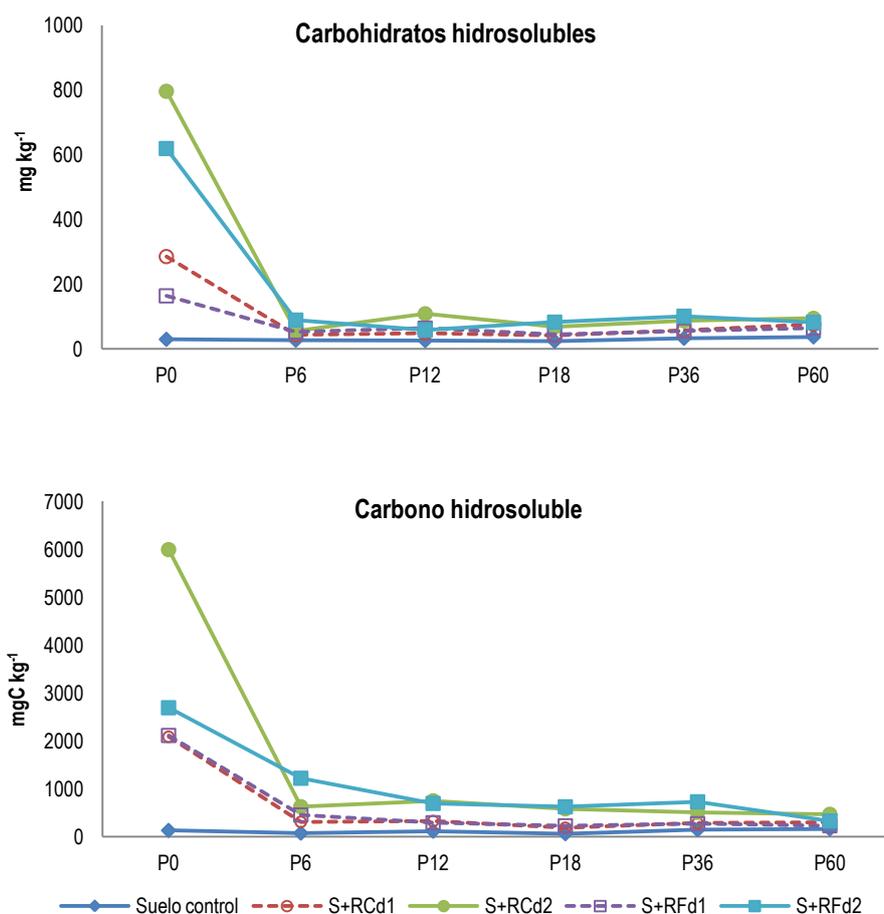


Figura 4.2.18. Evolución del contenido de carbohidratos y carbonos hidrosolubles. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

Estas fracciones de carbono sufrían en todos los tratamientos una fuerte mineralización durante los primeros 6 meses con pérdidas de 85-73% (S+RCd1), 89-61% (S+RFd1), 92-88% (S+RCd2) y 88-73% (S+RFd2), respectivamente para el carbono hidrosoluble y los carbohidratos hidrosolubles, manteniéndose después prácticamente constantes a lo largo de todo el periodo experimental. Sin embargo, en el suelo control los valores de carbono hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles no variaban de modo significativo ( $p \leq 0.05$ ) a lo largo de todo el periodo experimental. En estos parámetros sí se apreciaron diferencias en función del tipo de enmienda empleada, así, para una misma dosis de aplicación, los contenidos de carbono hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles al final de los 5 años de experimentación eran significativamente ( $p \leq 0.05$ ) superiores en los suelos enmendados con compost que en los enmendados con RF (Figura 4.2.18; Tabla II.9 del Anexo). Los suelos enmendados con dosis altas de compost presentaron los valores más altos para ambos parámetros.

### Manejo por mulching

Del mismo modo que en las parcelas donde las enmiendas fueron incorporadas a la capa arable del suelo, en los suelos tratados mediante mulching se observaron 5 años después de la enmienda mayores contenidos de  $C_{org}$  en los suelos enmendados que en el control (Figura 4.2.19). Este incremento fue especialmente alto para S+RCd2M, donde el contenido de  $C_{org}$  era incluso significativamente superior ( $p \leq 0.05$ ) al del suelo donde las enmiendas se aplicaron mediante incorporación.

Para este tipo de manejo, al igual que en el manejo por incorporación, no se observaron a los 5 años de la adición de la enmienda diferencias en los contenidos de  $C_{org}$  debido al tipo de enmienda (RC o RF) en los suelos enmendados a d1, mientras que en los suelos enmendados a d2, a diferencia de lo observado en las parcelas con incorporación de la enmienda en la capa arable, el contenido de  $C_{org}$  en el suelo tratado con compost (S+RCd2M) era significativamente superior al del suelo tratado con RF (S+RFd2M).

Mientras que el tipo de manejo (en mulching o por incorporación) no mostró influencia sobre los contenidos de  $C_{org}$  del suelo cuando las enmiendas se aplicaron a d1, cuando la aplicación se hacía a la dosis más elevada el mulching favorecía más que la incorporación en la capa arable la retención de  $C_{org}$  en el suelo cuando la enmienda empleada era compost, mientras que lo contrario ocurría en el caso de la adición de residuo fresco.

Los contenidos de carbono hidrosoluble seguían un patrón similar al comentado para el  $C_{org}$ , mostrando el tratamiento S+RCd2M contenidos de carbono hidrosoluble significativamente superiores a S+RFd2M y a S+RCd2, mientras que en los carbohidratos hidrosolubles ocurría justo al contrario, se apreciaban diferencias significativas entre RC y RF a d1 mientras que a d2 las diferencias entre los dos tipos de residuos no eran significativas (Figura 4.2.19).

El mayor contenido de fracciones orgánicas en los suelos enmendados puede ser debido por una parte, a la existencia de una fracción del carbono inicialmente incorporado con la enmienda orgánica que no se ha mineralizado por ser de carácter más recalcitrante y por otra parte, al hecho de que estas enmiendas han permitido un incremento en el desarrollo vegetal, el cual ha sido más acusado en las parcelas enmendadas con compost, a ambas dosis, y con RF a dosis baja, lo cual incrementa las entradas de carbono (Pascual et al., 1999; Ros et al., 2003) debido a la incorporación al suelo de los restos vegetales y a los exudados

radiculares (Campbell & Zentner, 1993), favoreciendo la formación de materia orgánica en el suelo (García et al., 1992), lo cual resulta de vital importancia a la hora de crear en dicho suelo un “pool” de carbono. Este hecho no sólo tendría connotaciones positivas a nivel edáfico, sino también a nivel de cambio global. Además, dicha materia orgánica es fundamental en el mantenimiento y mejora de las propiedades físicas del suelo (Stevenson, 1982; Roldán et al., 1996) y en la unión de microagregados (Metzger & Yaron, 1987; Haynes & Swift, 1990; Lacherveque et al., 2006), promoviendo la estabilidad del suelo, como se observó anteriormente en el estudio de los parámetros físicos y del desarrollo vegetal, lo que inevitablemente irá unido a un mayor desarrollo microbiano.

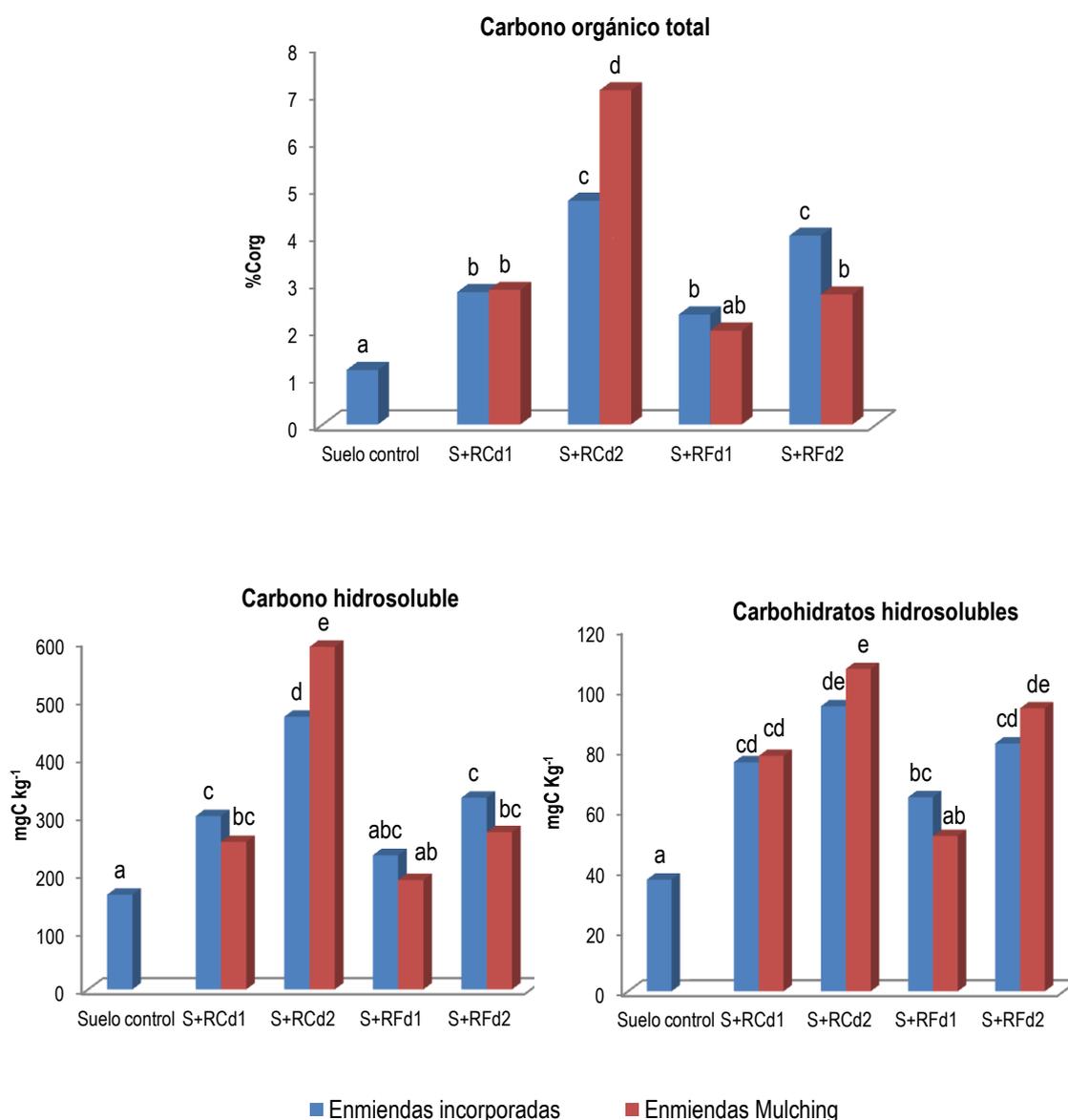


Figura 4.2.19. Contenido de carbono orgánico total, carbono hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### *Conclusiones parciales:*

*Podemos decir que los distintos enmendantes estudiados, destacando el tratamiento de compost en dosis alta, hacen aumentar de forma significativa, el contenido de materia orgánica en el suelo lo cual queda reflejado tanto en el contenido de carbono orgánico total como en el carbono de la fracción hidrosoluble. Ambas fracciones de carbono descienden con el tiempo, debido a los procesos de mineralización.*

*La incorporación de las enmiendas al suelo incrementa en el mismo, el contenido de fracciones lábiles, capaces de actuar como alimento energético para los microorganismos. Esto implica una revitalización de la actividad microbiana en dichos suelos, influenciada favorablemente por la aparición de una cubierta vegetal estable. Así vemos que tras 5 años de la aportación de la enmienda, los valores de estas fracciones más lábiles de carbono siguen presentando valores superiores al suelo control, siendo los suelos tratados con compost a la dosis más alta los que presentan valores más elevados en ambos métodos de incorporación (incorporación o mulching).*

*El tipo de manejo de la enmienda no influye en el contenido de  $C_{org}$  y su fracción hidrosoluble cuando las enmiendas se emplean a la dosis más baja (1%  $C_{org}$ ), sin embargo, a la dosis más alta (3%  $C_{org}$ ) el manejo en mulching favorece más que la incorporación de la enmienda la acumulación de C en el suelo cuando la enmienda es con compost, mientras que en el caso de residuo fresco favorece la mineralización.*

*Vemos así que la introducción en el suelo de un material orgánico (ya sea estabilizado o fresco) produce un enriquecimiento del suelo en materia orgánica y en diversas fracciones de carbono, lo que promueve una mejora en su fertilidad y productividad, así como una fijación de carbono en el suelo que contribuye a mitigar el efecto invernadero, y a conseguir hacer del suelo un verdadero sumidero de carbono.*

### **Tamaño y actividad general de las poblaciones microbianas**

Como ya se ha comentado anteriormente, no existe un único parámetro que nos aporte suficiente información sobre el estado en el que se encuentra la actividad microbiológica del suelo, debido a la compleja dinámica de este sistema, por lo que es aconsejable utilizar varios parámetros y analizar conjuntamente la información que proporcionan.

La adición de enmiendas orgánicas puede ejercer un papel vital en la mejora de la calidad microbiológica del suelo ya que tanto los nutrientes como el carbono orgánico que aportan al suelo contribuirán a incentivar el desarrollo y actividad de sus comunidades microbianas (Bastida et al., 2008). El carbono de biomasa microbiana es un parámetro que actúa como indicador del tamaño de dicha comunidad microbiana (Nannipieri et al., 1990), la cual, es considerada un buen indicador de la fertilidad del suelo, ya que responde rápidamente y es sensible a los cambios que se producen en el mismo (Powelson et al, 1987, García et al, 2000, Ros et al, 2006). Sin embargo, este parámetro no discrimina entre las poblaciones microbianas que se encuentran activas en el suelo y las que se hallan en estado latente (esporuladas). Por ello, para conocer la actividad metabólica general de los microorganismos del suelo hemos recurrido a parámetros tales como el contenido de adenosín-trifosfato (ATP) (Nannipieri et al., 1990), el cual es reflejo de las células activas, la medida de la respiración microbiana, uno de los parámetros más frecuentemente usados para cuantificar actividad microbiana en el suelo (Zagal et al., 2002), y que está directamente relacionada con la descomposición de residuos orgánicos provenientes de distintas fuentes (Sylvia et al.,

1998; Celis et al., 2009), y la actividad deshidrogenasa, por ser una enzima intracelular que aporta información sobre los procesos de fosforilación (García et al. 2005).

### Manejo por incorporación de la enmienda en la capa arable del suelo

En las parcelas en las que la enmienda fue incorporada a la capa arable del suelo, se observó una gran incidencia inicial de la enmienda sobre el crecimiento de las poblaciones microbianas (Figura 4.2.20), mostrando los suelos enmendados valores de biomasa microbiana significativamente ( $p \leq 0.05$ ) superiores a los del suelo control. Este incremento del tamaño de las poblaciones microbianas se mantuvo a lo largo de todo el periodo experimental, de modo que 5 años después de la incorporación de la enmienda todos los suelos enmendados seguían mostrando valores de C de biomasa significativamente superiores a los del control, apreciándose sólo leves diferencias entre los tratamientos orgánicos, no estando influenciado este parámetro ni por tipo de enmienda ni por la dosis empleada (Tabla II.10 del Anexo).

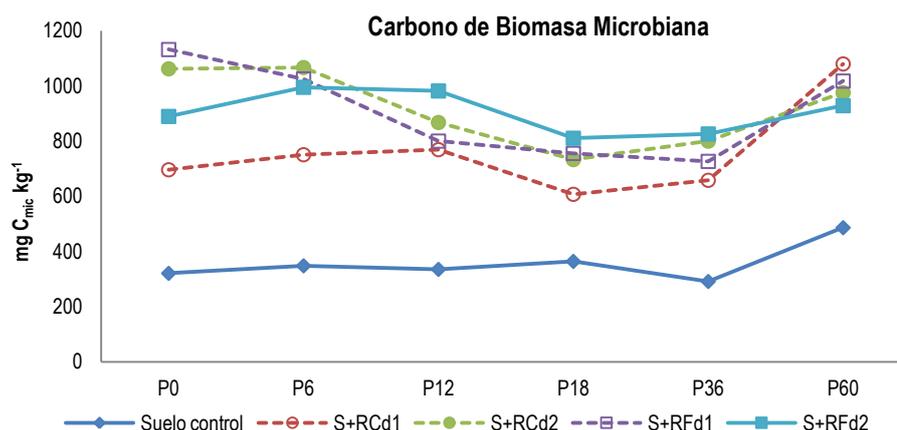


Figura 4.2.20. Evolución del carbono de la biomasa microbiana en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

Este incremento inicial de la biomasa microbiana en los suelos enmendados es atribuible tanto a la estimulación del crecimiento de los microorganismos autóctonos del suelo, debido a los nutrientes y compuestos lábiles de carbono aportados por las enmiendas junto con la mejora en las condiciones físicas del suelo (mayor porosidad), como a la propia biomasa microbiana aportada por la enmienda al suelo. Otros autores han estudiado este doble efecto (Pascual et al., 1997, García et al., 1998; Stamatiadis et al., 1999, García-Gil et al., 2000; Ros et al., 2003a). Autores como Anderson y Domsch (1993) e Insam y Parkinson (1989) también han encontrado una relación directa entre este parámetro y el C<sub>org</sub>, lo cual coincide con lo encontrado por nosotros, al observarse que en todo momento presentó el carbono de biomasa valores superiores al suelo control, confirmando la alta disponibilidad de este carbono para su utilización por parte de los microorganismos. Sin embargo, otros estudios revelan una disminución en los niveles de biomasa microbiana y una alteración en la diversidad y en la estructura de las comunidades del suelo debido a la

presencia de metales pesados que a veces pueden contener estos materiales (Johnsen et al., 2001, Crecchio et al., 2004). En nuestro caso las enmiendas utilizadas no mostraron altos contenidos de metales pesados (Tablas 4.2.6- 4.2.8) por lo que no ha habido impedimento para que los microorganismos se desarrollaran.

Como se observa en la Figura 4.2.21, la respiración basal del suelo experimentó al inicio un fuerte incremento en todos los suelos tratados, lo cual es indicativo de la gran estimulación de la actividad microbiana que produce la adición de la enmienda. Los valores de respiración disminuyeron drásticamente durante los primeros 6 meses, como era de esperar, al producirse una fuerte mineralización de la materia orgánica, apreciándose al final de experimento que pese a que todos los suelos tratados seguían manteniendo valores para este parámetros superiores a los del suelo control, estas diferencias no siempre eran estadísticamente significativas, siendo el suelo tratado con compost a dosis alta el que presentaba mayor valor de respiración a los cinco años de la aplicación de la enmienda (Tabla II.11 del Anexo).

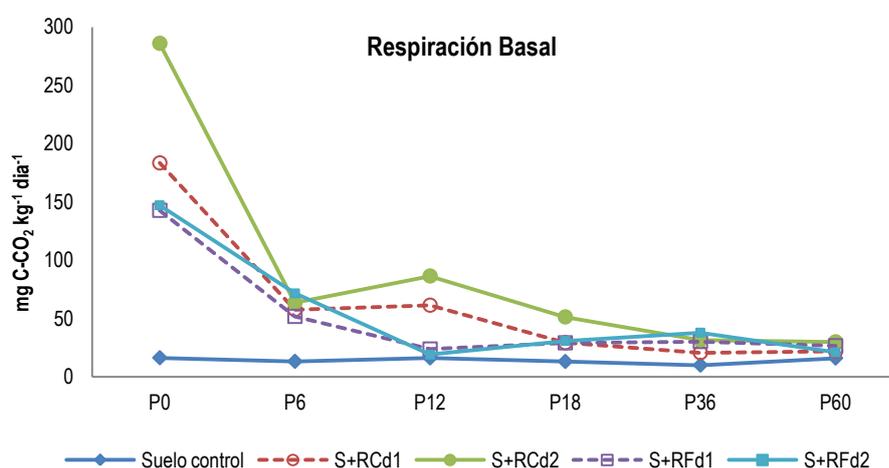


Figura 4.2.21. Evolución de la respiración basal en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

Los resultados de respiración basal sugieren un efecto positivo de la enmienda sobre la actividad de las poblaciones microbianas, situación que ha sido también señalada por numerosos autores (Zagal et al., 2002, Ros et al., 2003, Varnero et al., 2004, Teuber et al., 2007, Celis et al. 2009). A medida que el contenido de carbono fácilmente disponible iba disminuyendo, la tasa de respiración de los microorganismos también disminuía (Varnero et al., 2004; Barrera et al., 2006).

Como ya se ha indicado, otros parámetros importantes a considerar a la hora de evaluar la actividad microbiana son el contenido de adenosín-trifosfato (ATP) (Nannipieri et al., 1990) y la actividad deshidrogenasa por ser también ambos marcadores de la actividad metabólica global de los microorganismos del suelo.

Tal como se observó en la respiración del suelo, tanto la actividad deshidrogenasa como el contenido de ATP incrementaron notablemente tras la adición de la enmienda, indicativo de la gran estimulación de la actividad de las poblaciones microbianas del suelo como consecuencia del gran aporte energético que suponen estas enmiendas. Como ya se ha indicado, conforme se van agotando estas fuentes de energía debido a la progresiva degradación por parte de los microorganismos de los compuestos más biodegradables aportados con las enmiendas, la actividad metabólica de las poblaciones microbianas del suelo va decreciendo y consecuentemente los valores de estos parámetros (contenido de ATP y actividad deshidrogenasa) que son indicadores de dicha actividad irán disminuyendo. A partir de los 3 años (P36) se observó una estabilización de los valores de estos parámetros sugiriendo que se ha llegado a un cierto estado de equilibrio en el ecosistema después de la “explosión” de actividad provocada en el mismo por el aporte de estas enmiendas (Figura 4.2.22; Tabla II.12 del Anexo).

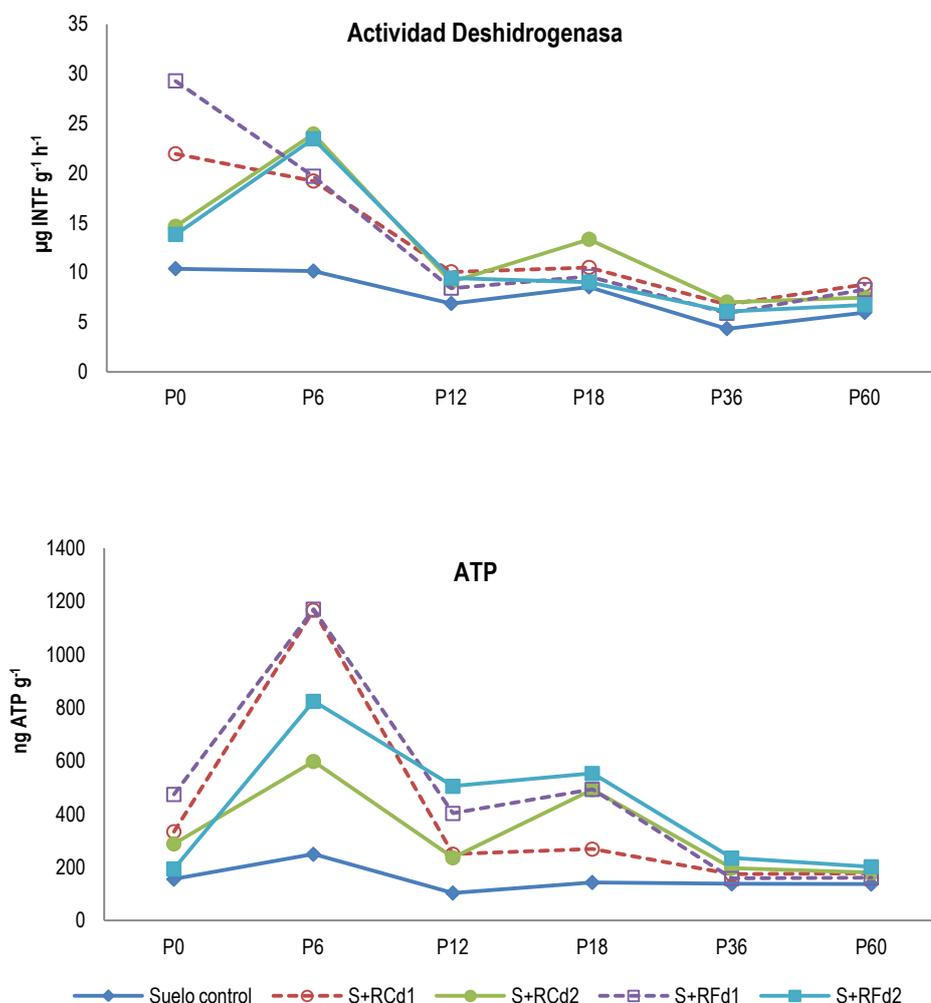


Figura 4.2.22. Evolución del contenido de ATP y actividad deshidrogenasa en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

### Manejo por mulching

Al igual que ocurría en las parcelas con incorporación de la enmienda, los suelos enmendados en mulching presentaban 5 años después de la adición de la enmienda valores de carbono de biomasa microbiana significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) a los del control, siendo el tratamiento con la dosis más alta de compost (S+RCd2M) el que mostraba el mayor contenido de poblaciones microbianas, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre este tratamiento y todos los demás. Es de destacar el hecho de que la aplicación de RF a la dosis más alta no llevaba aparejada, al cabo de 5 años, un incremento en el contenido de biomasa microbiana de ese suelo en relación al tratamiento con RF a d1, contrariamente a lo que se observaba para RC, siendo sus valores incluso inferiores, aunque no de un modo significativo, a los observados para d1.

En cuanto a los parámetros indicadores de la actividad microbiana, se observó que 5 años después de la enmienda en mulching los suelos tratados con RC presentaban valores de respiración basal, ATP y actividad deshidrogenasa superiores, en general, a los del suelo control, observándose tan sólo un incremento en los valores de estos parámetros con la dosis, en caso de la respiración (Figura 4.2.23). Sin embargo, los suelos tratados con RF no mostraban, en general, diferencias significativas con el control en lo que respecta a estos parámetros, y tan sólo los valores de ATP incrementaban con la dosis, aunque no de modo significativo (Figura 4.2.23).

En la actividad deshidrogenasa, es donde queda más claramente reflejado el menor efecto positivo de la enmienda con RF mediante mulching, presentando los suelos tratados con este residuo valores de actividad similares (d1) o incluso inferiores (d2) a los del control, lo cual sugiere una influencia negativa sobre la actividad microbiana de la aplicación en mulching del residuo fresco a la dosis más elevada.

Al comparar el efecto de las dos diferentes técnicas de manejo empleadas para la adición de la enmienda (incorporación en los 15-20 cm superiores o mulching) sobre el carbono de biomasa microbiana vemos que los suelos enmendados mediante incorporación de la enmienda a la capa arable presentaban valores de carbono de biomasa algo mayores que los de los suelos con el mismo tratamiento pero aplicado en mulching, si bien las diferencias no llegaban a ser estadísticamente significativas. La única excepción la constituye el tratamiento con compost en dosis alta (S+RCd2), donde los valores de carbono de biomasa eran significativamente superiores cuando las enmiendas se habían incorporado mediante la técnica de mulching (Figura 4.2.23).

Es de destacar que independientemente del tipo de manejo, los valores más bajos de carbono de biomasa de los suelos enmendados se encontraron, 5 años después de la enmienda, en los suelos tratados con la dosis más alta de RF. No obstante, al final del periodo experimental todos los suelos enmendados presentaban valores de carbono de biomasa significativamente superiores que el suelo control, lo cual es de gran importancia si tenemos en cuenta que el carbono de la biomasa microbiana da idea de la potencial actividad microbiana de un suelo (Nannipieri et al., 1990). Estos mayores valores pueden deberse a la mayor presencia de materia orgánica fácilmente biodegradable, que estimula el crecimiento microbiano autóctono del suelo, o a la mayor presencia de microorganismos exógenos al suelo, que fueron incorporados junto con los enmendantes (Perucci, 1992). También el incremento de este parámetro puede deberse a la aportación de sustratos y nutrientes que realizan los restos vegetales del suelo, procedentes de la vegetación espontánea generada en las diferentes parcelas. Este hecho podría explicar el menor valor

presentado por las parcelas con RF a la dosis más alta donde la vegetación existente a los 5 años de la enmienda era significativamente inferior a la presentada por el resto de parcelas con enmienda.

En relación a la respiración basal, los suelos enmendados con RCd2, especialmente en el tratamiento en mulching, presentaban 5 años después de la enmienda valores significativamente mayores a los del resto de suelos enmendados, los cuales presentaban valores más similares entre sí y cercanos al suelo control (Figura 4.2.23). De estos resultados y bajo las condiciones de manejo a las que ha estado sometido el suelo, se puede decir que la dosis alta de compost es la que más ha mantenido en el tiempo la revitalización del agrosistema, como consecuencia de la aplicación inicial de la enmienda y de las interacciones con la vegetación que actúa como una fuente de carbono y nutrientes para los microorganismos (Pascual et al., 2000), lo cual favorece el desarrollo y actividad de las poblaciones microbianas.

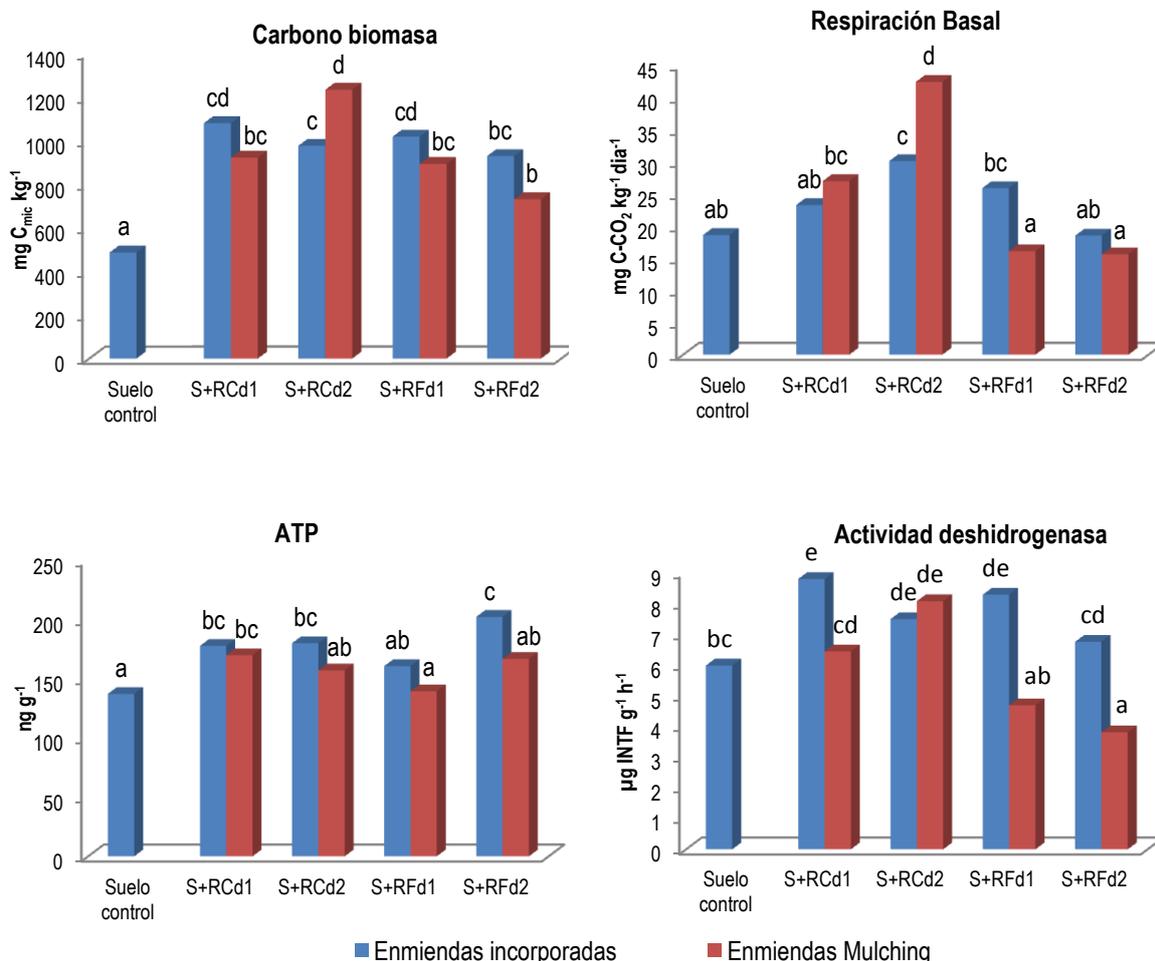


Figura 4.2.23. Contenido en el carbono de la biomasa, respiración basal, ATP y actividad deshidrogenasa en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de la incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Con respecto al contenido de ATP de los suelos, se observaban pocas diferencias, a igualdad de enmienda y dosis, entre los contenidos de ATP de los suelos en función de la técnica de aplicación de la enmienda utilizada a los 5 años de la adición de la enmienda, tan sólo los suelos tratados con RF a d2 presentan cuando la enmienda se ha realizado por incorporación, contenidos de ATP significativamente superiores a los de los suelos tratados en mulching (Figura 4.2.23).

Debemos tener en cuenta que a los 5 años de la incorporación de las enmiendas se considera que el sistema se encuentra en equilibrio. Cuando sobre un suelo se realizan acciones drásticas, como por ejemplo la incorporación de una enmienda orgánica a gran escala, los resultados obtenidos en los primeros meses deben ser estudiados y explicados con prudencia, ya que podemos considerarlos como “transitorios”. Como ejemplo aclaratorio a lo que queremos decir indicaremos que si el carbono de la biomasa microbiana es un reflejo de las poblaciones microbianas del ecosistema, cuanto mayor sea ésta, mejor debería estar la calidad del suelo y su nivel de recuperación y entonces deberíamos indicar que la mejor calidad de suelo estaría en el “punto 0”, donde los valores de carbono de biomasa microbiana en los suelos enmendados son muy altos. Sin embargo dichos valores son “transitorios” ya que van evolucionando hasta llegar a su valor real, el cual lo alcanzan cuando el suelo llega al equilibrio. Hasta entonces, procesos de mineralización, descomposición y ajustes para “asumir y asimilar” la enmienda hace que existan valores elevados, anómalos en cuanto a la realidad del suelo.

Basándonos en los datos referidos al quinto año, en donde el equilibrio entre enmienda y suelo se ha producido, podemos pues concluir que en general, la adición de estas enmiendas es positiva, independientemente del método de aplicación, ya que produce una mejora de un modo estable en un parámetro tan importante como es la biomasa microbiana del suelo, así como de su actividad.

Por otra parte, el hecho de introducir enmiendas más o menos estabilizadas (compost o residuos frescos) en los suelos degradados, no genera una diferencia clave de comportamiento, y tampoco se aprecian diferencias importantes con respecto a la dosis empleada cuando el enmendante es compost, donde no se aprecia claramente que el incremento de la dosis de la enmienda orgánica aplicada refleje una mejora en las características microbiológicas proporcional a la dosis empleada, excepto cuando la enmienda se incorpora en mulching.

Como ya encontraron otros autores (Bastida et al., 2008), vemos que la reactivación de las poblaciones microbianas se debe, en general, más al hecho de haber incorporado una fuente de materia orgánica que aporta sustratos a los microorganismos, que al nivel de estabilidad de dicha enmienda.

Con respecto al modo de aplicación de la enmienda (mediante incorporación o mulching), vemos que la actividad microbiana se ve más favorecida cuando la enmienda se aplica mediante incorporación a la capa arable del suelo cuando se trata de residuo fresco (RF), mientras que los efectos de la aplicación de compost a dosis elevada se ven potenciados, en general, con la aplicación de la enmienda en mulching.

#### *Conclusiones parciales:*

*La aplicación de las diferentes enmiendas orgánicas ha producido una recuperación de la calidad microbiológica del suelo. La actividad de la comunidad microbiana (medida como actividad microbiana general del suelo mediante ATP, respiración, o actividad deshidrogenasa) incrementó con la aplicación de enmiendas a los suelos degradados, debido posiblemente a los sustratos que introducen en el suelo, bien directamente o bien mediante la vegetación que se desarrolla en el suelo de forma espontánea, y que activa la síntesis de enzimas generando una mejora en la calidad microbiológica de los suelos receptores. También el carbono de la biomasa microbiana mostró un incremento significativo para todos los tratamientos incluso 5 años después de la enmienda, tanto cuando la aplicación fue en superficie como cuando se realizó mediante incorporación a la capa arable del suelo. El desarrollo y actividad de la comunidad microbiana del suelo se ve poco influenciado por el tipo de enmienda orgánica adicionada (compost o RF) cuando la enmienda se incorpora a la capa arable del suelo, observándose también, en general, poca influencia de la dosis en este tipo de manejo*

*Contrariamente, la aplicación de la enmienda en muchos casos muestra diferencia entre el tipo de enmienda aplicada, presentando los suelos tratados con compost en mulching mayores valores de biomasa y actividad microbiana que los tratados con RF. Asimismo el tratamiento con la dosis más elevada de compost da lugar a un mayor desarrollo y actividad microbiana que el tratamiento a dosis más baja. Por otra parte, hay que señalar que mientras que el tratamiento en mulching incrementa, con respecto a la aplicación mediante incorporación, los efectos positivos sobre el crecimiento y actividad microbiana de la adición de compost a dosis elevadas (d2), cuando se trata de residuo fresco ocurre todo lo contrario.*

#### **Actividades específicas en los suelos: actividades hidrolasas**

Las enzimas son una importante herramienta como índices de los diversos procesos de degradación que sufre el suelo (Mckinley et al., 1985, Tiquia 2002) por estar implicadas en la descomposición de la materia orgánica del mismo. Las actividades enzimáticas de origen extracelular estudiadas en este trabajo son hidrolasas que aportan información sobre los ciclos del carbono ( $\beta$ -glucosidasas), nitrógeno (ureasas) y fósforo (fosfatasas) en el suelo (García et al., 2002) y están implicadas en la fertilidad de éste, poniendo a disposición de las plantas y de los propios microorganismos los nutrientes necesarios para su desarrollo.

#### **Manejo por incorporación de la enmienda en la capa arable del suelo**

Inicialmente, la incorporación de los materiales orgánicos provocó un aumento en la actividad  $\beta$ -glucosidasa, activándose la dinámica del ciclo del carbono y los procesos de mineralización asociados a los mismos (Figura 4.2.24). Durante los 6 primeros meses, todos los suelos enmendados sufrieron importantes aumentos de actividad, llegando a alcanzar valores hasta 6 veces superiores con respecto al suelo control en el tratamiento S+RCd1, y cuatro veces superior para los tratamientos con la dosis más alta (S+RCd2 y S+RFd2), mientras que el tratamiento S+RFd1 mostraba una actividad 2,5 veces superior a la del control. Tras este importante incremento inicial, todos los tratamientos presentaron un decrecimiento hasta al final del

experimento, donde presentaban valores superiores al suelo control pero de una forma menos acusada, siendo los incrementos en relación al control 63% (S+RCd1), 64% (S+RCd2), 67% (S+RFd1) y 2% (S+RFd2). Vemos así que, excepto el tratamiento S+RFd2, el resto de suelos enmendados no presentaban diferencias significativas entre ellos al final del experimento, pero sí con el control (Tabla II.13 del Anexo).

La disponibilidad de fósforo constituye uno de los factores más limitantes para el desarrollo del cultivo (Attiwill & Adams, 1993), ya que las plantas solamente son capaces de asimilar las formas inorgánicas de este elemento, por lo que el fósforo orgánico debe ser primero hidrolizado por las fosfatasas, cuyo origen está en las propias raíces de la planta, en los hongos y en los microorganismos del suelo (Krämer y Green, 2000). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los ésteres fosfatos y tienen una especificidad relativamente amplia, capaz de actuar sobre un gran número de sustratos de estructura muy variada (Alef et al., 1995).

Las medidas de las fosfatasas en los suelos reflejan la actividad de las enzimas unidas a los coloides y a las sustancias húmicas, las enzimas libres en la solución del suelo y las fosfatasas asociadas a los restos vegetales y microorganismos activos metabólicamente (Nannipieri et al., 1990), por lo que pueden ser un buen indicador de la mineralización potencial del fósforo orgánico en los agrosistemas (Dick & Tabatabai, 1993).

Al igual que se observó para la actividad  $\beta$ -glucosidasa, la actividad fosfatasa del suelo incrementaba significativamente con la adición de ambas enmiendas a cualquiera de las dosis empleadas, manteniéndose estos valores de actividad fosfatasa significativamente superiores a los del suelo control durante todo el periodo experimental (Figura 4.2.24; Tabla II.13 del Anexo). Vemos que tras un incremento inicial en todos los tratamientos, disminuye la actividad presentando todos los suelos tratados valores significativamente ( $p \leq 0.05$ ) superiores al suelo control: 48% (S+RCd1), 61% (S+RCd2), 42% (S+RFd1) y 51% (S+RFd2) 5 años después de la adición de la enmienda. Asimismo, se observaron diferencias significativas entre dosis para un mismo tipo de enmienda así como diferencias significativas entre los dos tipos de enmienda cuando se habían aplicado a la dosis más alta (Figura 4.2.24).

Tanto para la actividad  $\beta$ -glucosidasa como para la actividad fosfatasa, se produce inicialmente un aumento de estas actividades en los suelos enmendados con respecto al suelo control, debido al aporte con la enmienda de los sustratos específicos de estas enzimas, así como de biomasa microbiana capaz de sintetizar dichas enzimas (Liang et al., 2005; Tejada et al., 2006).

Con el tiempo se va tendiendo hacia un equilibrio, disminuyendo la actividad. La mayor actividad observada a los 5 años de la enmienda en los suelos tratados con relación al control es posiblemente debida al mayor aporte de los sustratos específicos de estas enzimas en estos suelos, tanto a través de los exudados radiculares y restos vegetales aportados por la vegetación desarrollada sobre ellos, como por la degradación de sustratos más complejos. Los suelos enmendados con dosis altas de RF, constituyen una excepción, no mostrando diferencias significativas de actividad  $\beta$ -glucosidasa con respecto al suelo control, probablemente por tratarse de unas parcelas donde la vegetación espontánea no ha sido tan abundante como la desarrollada en las demás parcelas enmendadas.

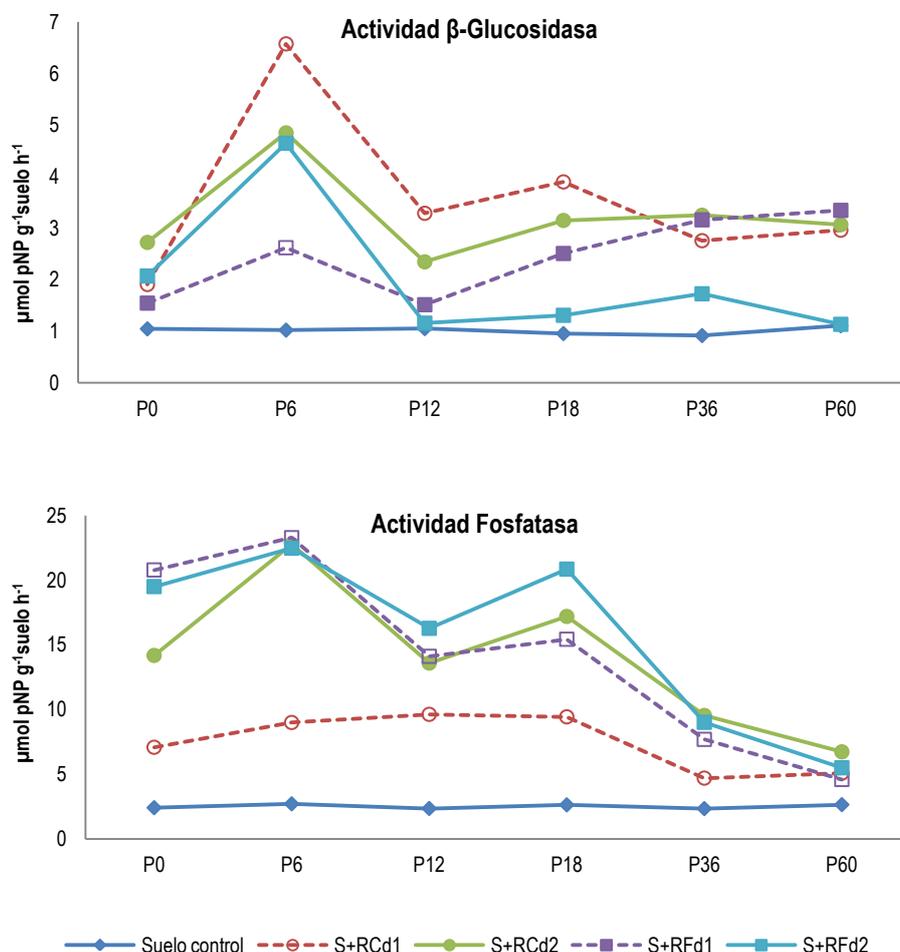


Figura 4.2.24. Evolución en las actividades fosfatasa alcalina y  $\beta$ -glucosidasa en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

En cuanto a la actividad ureasa sabemos que la enzima ureasa está íntimamente ligada al ciclo del nitrógeno y a todos los procesos que tienen lugar en suelos que han recibido algún tipo de fertilización mineral nitrogenada. El origen de esta enzima es fundamentalmente microbiano, desarrollando su actividad principalmente de forma extracelular (Bremmer & Mulvaney, 1978), pudiendo estar estabilizada en el suelo mediante asociaciones con sustancias húmicas (Nannipieri et al., 1996) o formando complejos órgano-minerales (Gianfreda et al., 1995a). A diferencia de lo observado para las dos enzimas anteriores, los suelos tratados presentaban inicialmente valores de actividad ureasa significativamente ( $p \leq 0.05$ ) inferiores al del suelo control (Figura 4.2.25; Tabla II.14 del Anexo), probablemente debido a la inhibición enzimática provocada por el elevado contenido de amonio de las enmiendas que induce una inhibición feed-back de esta enzima al ser el producto de la reacción catalizada por la enzima. A lo largo del experimento y dependiendo de cada tratamiento, la actividad ureasa sufrió fluctuaciones para finalmente presentar valores

cercanos al suelo control, excepto el tratamiento S+RCd2, que seguía teniendo valores significativamente ( $p \leq 0.05$ ) inferiores a los del suelo control 5 años después de la adición de la enmienda.

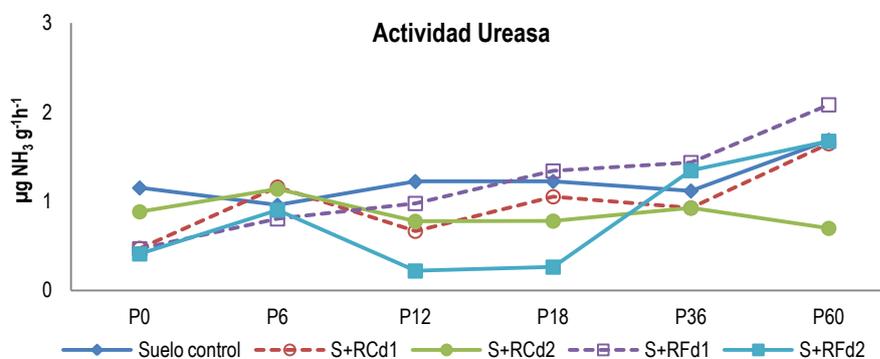


Figura 4.2.25. Evolución en la actividad ureasa en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . P0 (1 semana); P6 (6 meses); P12 (12 meses); P18 (18 meses); P36 (36 meses); P60 (60 meses).

### Manejo por mulching

Cinco años después de la adición de la enmienda los suelos de las parcelas tratadas en mulching con RC mostraban valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa significativamente superiores al control, mayores cuanto mayor era la dosis. Sin embargo, la actividad de esta enzima en los suelos tratados con RF no se diferenciaba de modo significativo de la del control, siendo la actividad del tratamiento S+RFd2 inferior a la del tratamiento S+RFd1 aunque no de modo significativo, poniendo de relieve un efecto negativo del aumento de la dosis en los tratamientos con RF (Figura 4.2.26). Esta disminución de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en los suelos tratados con la dosis más elevada de RF también se observaba en los suelos en que la adición de enmienda se había realizado mediante incorporación.

La actividad fosfatasa se comportaba de un modo similar a la  $\beta$ -glucosidasa, si bien los valores de actividad fosfatasa en los suelos tratados con RF sí eran significativamente superiores a los del control. Cabe destacar que tampoco en este caso se observaron diferencias entre dosis para los suelos tratados con RF, hecho éste que también se observaba en los suelos enmendados mediante incorporación de la enmienda en la capa arable (Figura 4.2.26). Sin embargo, los suelos tratados con RC presentaban diferencias significativas tanto con el control como entre dosis.

Si comparamos los resultados obtenidos con los dos tipos de manejo ensayados (enmiendas incorporadas a la capa arable del suelo y enmiendas en mulching), los suelos tratados con compost a dosis d2 presentaban mayores valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa y de actividad fosfatasa que los enmendados mediante incorporación a la capa arable, mientras que para el resto de tratamientos los valores de actividad eran menores cuando la enmienda se aplicaba en mulching, si bien las diferencias con los suelos enmendados mediante incorporación a la capa arable no siempre eran estadísticamente significativas.

Para la actividad ureasa, los suelos presentaban, tras 5 años de la incorporación de la enmienda, valores similares o ligeramente inferiores al del suelo control en todos los casos, no presentando importantes diferencias de comportamiento para los dos tipos de manejo realizados, excepto para S+RCd2, donde los suelos tratados mediante incorporación de la enmienda presentaban valores significativamente inferiores a los tratados en mulching e inferiores a los del suelo control.

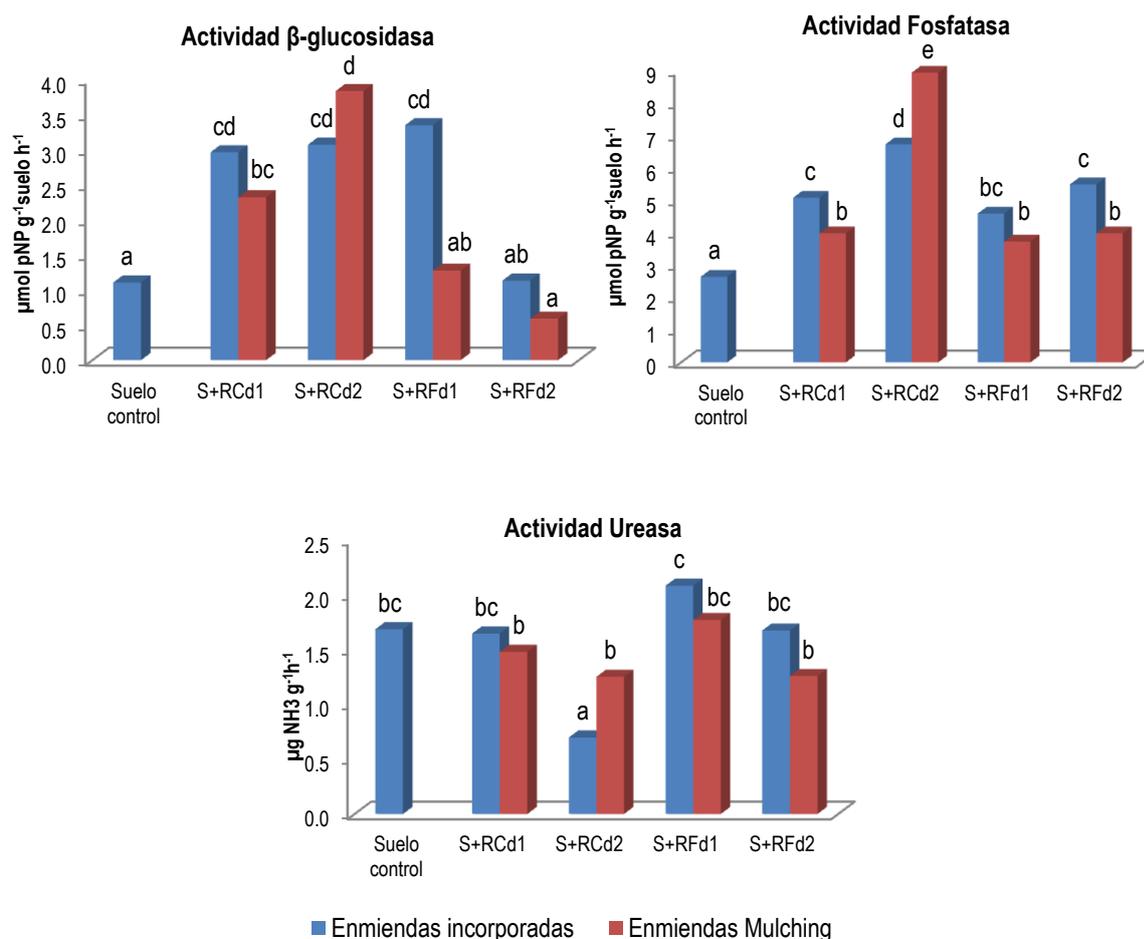


Figura 4.2.26. Actividades fosfatasa alcalina,  $\beta$ -glucosidasa y ureasa en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ )

La evolución de las actividades enzimáticas implicadas en las principales reacciones de los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, fósforo y carbono en los suelos enmendados con RF y compost, pone de manifiesto, para ambos tipos de manejo, un aumento en el metabolismo microbiano como resultado de los procesos catabólicos de las fracciones lábiles de carbono que han sido incorporadas con estas enmiendas orgánicas al suelo. No obstante, la adición de estos residuos provoca distintas respuestas en las enzimas hidrolasa: así, la actividad ureasa presenta iguales valores o incluso menores que el suelo control pudiendo

estar provocado este hecho por la inhibición de su síntesis por la presencia en el suelo del producto de la reacción de hidrólisis. Hemos observado que tras 5 años desde la incorporación de la enmienda, la actividad ureasa presentaba valores iguales o menores a los del suelo control prácticamente en todos los suelos enmendados, en ambas dosis y con ambos métodos de aplicación de la enmienda. Con respecto al comportamiento de esta enzima podemos encontrar resultados contradictorios en experimentos de larga duración en función del tipo, cantidad y manejo del residuo incorporado a los suelos, así como de las condiciones experimentales. En general, se ha observado que el empleo de fertilizantes orgánicos incrementa la actividad ureasa (Kandeler et al., 1999; Lalonde et al., 2000; Fernandes et al., 2005), posiblemente debido a una mayor persistencia de la enzima en los suelos enmendados, especialmente con materiales compostados (Pascual et al., 2002). Sin embargo, Marschner et al. (2003) observaron que la actividad ureasa no se veía afectada tras veinte años de aplicación de diferentes tratamientos orgánicos, entre ellos estiércol, lo que atribuyeron a la adición de dosis relativamente bajas. En nuestro caso parece que esta actividad ureasa podría estar inhibida debido a un aumento de metabolitos de tipo amonio procedentes de la degradación de los materiales orgánicos (McCarty et al., 1992), lo cual provoca un descenso en la síntesis de esta enzima por parte de las poblaciones microbianas del suelo, al haber suficiente producto de reacción para ser utilizado por las mismas. Se podría pensar como otra posible causa una inhibición debida a un contenido excesivo de metales pesados en los suelos enmendados (Tabatabai, 1977; Frankenberger et al., 1983; Marzadori et al., 2000), especialmente el cobre, por ser un inhibidor fuerte de esta enzima al interaccionar con los grupos -SH de las cisteínas que son fundamentales para el desarrollo de su actividad catalítica (Hughes et al., 1968). El hecho de que S+RCd2M, más rico en Cu (123,13 mg kg<sup>-1</sup>) presente mayor actividad ureasa que S+RCd2, con menor concentración de Cu (70,27 mg kg<sup>-1</sup>) nos lleva a desechar esta hipótesis.

En cuanto a la actividad  $\beta$ -glucosidasa, los suelos enmendados con compost han presentado, independientemente del modo de incorporación del mismo, un incremento significativo con respecto al control. Este comportamiento coincide con el encontrado por otros autores ya que en general, la incorporación de residuos orgánicos al suelo estimula la síntesis de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, activándose la dinámica del ciclo del carbono en los suelos enmendados, así como los procesos de mineralización asociados al mismo (García-Gil, 2001; Bol et al., 2003; Ros et al., 2003; Antolín et al., 2005; Böhme & Böhme, 2006). Sin embargo, cuando la enmienda se adicionaba sin compostar (RF), se observaba que mientras a dosis baja el tipo manejo en la adición de la enmienda jugaba un papel importante, apreciándose claramente la conveniencia de incorporar la enmienda a la capa arable del suelo, no se apreciaban diferencias importantes para la aplicación a la dosis más alta. Cabe destacar que la contribución de los exudados radiculares de la vegetación espontánea aparecida en las parcelas es determinante para el mantenimiento de esta actividad en el suelo (Ros et al., 2003; Plaza et al., 2004) y se da el hecho que las parcelas enmendadas con dosis alta de RF eran las que presentaban la menor densidad de cobertura vegetal, pero este hecho no explicaría lo acontecido en la parcelas S+RFd1M.

Para la actividad fosfatasa el incremento se ha producido en todos los suelos enmendados. Diferentes estudios han mostrado que esta enzima aumenta cuando mejora el contenido de materia orgánica del suelo (García-Gil et al., 2004b; Antolín et al., 2005) o cuando aumentan los requerimientos de P por parte del cultivo y de los microorganismos (Böhme & Böhme, 2006), mientras que desciende si la disponibilidad de fósforo es elevada (Lalonde et al., 2000; Bol et al., 2003). En nuestro caso, la permanencia de valores altos

para esta actividad después de 5 años puede ser explicada por la presencia del sustrato necesario aportado por la vegetación espontánea aparecida en las parcelas.

*Conclusiones parciales:*

*El estudio realizado pone de manifiesto el efecto positivo que tiene sobre la calidad microbiológica de un suelo sometido a procesos de degradación la aplicación de enmiendas orgánicas al mismo, ya que se produce una mejora en sus propiedades bioquímicas, debido a la reactivación de su biomasa microbiana, la cual constituye la principal fuente de las enzimas que están implicadas en las principales reacciones de los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, fósforo y carbono.*

*El comportamiento de las diferentes actividades enzimáticas estudiadas durante el tiempo de duración del experimento, presenta algunas diferencias según la actividad enzimática de la que se trate, debido a que dichas enzimas responden a sustratos específicos. El comportamiento de la actividad depende también del tipo de enmienda que se incorpore al suelo: compost o residuo fresco. Aunque en ambos casos, en general, después de la adición al suelo se produce un aumento de las diferentes actividades enzimáticas, para continuar con una evolución descendente durante los primeros meses, a excepción de la ureasa que se comporta de modo inverso.*

*Pasados estos meses se observa que el sistema ha alcanzado un equilibrio, gracias a la reactivación de los microorganismos del suelo y a la generación de una cubierta vegetal (este hecho es claramente fundamental para la actividad enzimática). Los valores de la actividad enzimática, en general, permanecen más altos que los del suelo control 5 años después de la adición de las enmiendas.*

*El tratamiento que presenta un comportamiento más favorable, mostrando mayores valores de biomasa microbiana y actividad  $\beta$ -glucosidasa y fosfatasa es el compost en dosis alta cuando la aplicación se realiza en superficie (mulching), si bien, cabe destacar que todos los tratamientos, excepto el tratamiento de residuo fresco en la dosis más alta, muestran 5 años después de la incorporación de la enmienda, valores superiores al suelo control. Para la actividad ureasa, los valores de actividad de los suelos tratados eran iguales o inferiores al del suelo control, debido probablemente a un mecanismo de retroalimentación que inhibe su síntesis en función de los sustratos presentes en el suelo.*

*Podemos resumir diciendo que la aplicación de las distintas enmiendas orgánicas ha producido una recuperación de la calidad microbiológica del suelo, mostrando un incremento significativo de los parámetros que determinan la actividad microbiana de dicho suelo.*

### **Evaluación de la recuperación de la calidad microbiológica del suelo**

Como se ha comentado con anterioridad, los suelos presentan unas características que cambian de forma prácticamente continuada, y a lo largo del tiempo de manera irreversible. Todo ello hace que los estudios de suelos tengan una gran dificultad, debido a que estamos hablando de una matriz sumamente compleja formada por una parte viva en constante movimiento, y otra parte mineral que tiene una dinámica mucho más lenta; pero ambas partes tienen su función de manera inequívoca. En consecuencia, como ya se ha comentado, resultará muy complicado que exista una sola medida ya sea biológica, física o química que

sea útil para determinar el estatus de un suelo, pudiendo a partir de dicha medida decidir cuál sería su salud y calidad (Frankerberger y Dick, 1983; Nannipieri et al., 1990; Ceccanti y García, 1994; Puglisi et al., 2006). Por tanto, el uso de varios parámetros es más adecuado y amortiguaría las variaciones provocadas en uno solo de ellos y es por este hecho que hemos realizado análisis de diversos parámetros para conseguir una visión global y real del estado de nuestros suelos tras haber sido tratados con las enmiendas orgánicas.

Por otra parte, podemos contemplar la posibilidad de analizar de forma más concisa los datos obtenidos hasta ahora empleando índices de calidad. Por ello, para evaluar el grado de recuperación de la calidad microbiológica del suelo con los diferentes tratamientos realizados hemos utilizado el índice de degradación microbiológica del suelo (IDM), propuesto por Bastida et al., (2006) para suelos semiáridos, al ser un parámetro que nos permiten estimar en qué estado de degradación y desertificación se encuentran nuestros suelos en base al cálculo de parámetros que tienen en cuenta la actividad de las poblaciones microbianas (parámetros biológicos, microbiológicos y bioquímicos). Este índice tiene la ventaja, sobre otros índices, de dar a cada parámetro una cierta independencia y además, los parámetros contenidos en el índice incluyen información sobre ciclo de N, contenido en fracciones de C, actividad microbiana, fuentes de energía, etc., lo cual hace que el índice sea completo. Otra ventaja de los parámetros utilizados es su alta sensibilidad a los estreses ambientales, así como el hecho de que se encuentran relacionados con los flujos de energía, la transformación de nutrientes y los ciclos de los elementos en el suelo (Puglisi et al., 2005), esto es, con la funcionalidad microbiana del suelo.

El IDM nos permite poner de manifiesto de forma cuantitativa el estado de degradación microbiológica en el que se encuentran los suelos semiáridos, así como determinar la eficacia de la adición de diferentes enmiendas orgánicas como estrategia para la recuperación de suelos abandonados. Este índice resulta de la suma de los valores normalizados y ponderados de los siguientes parámetros (Ecuación 1).

#### Ecuación 1:

$$\text{IDM} = [0,89 * (1 / (1 + (a/4,87)^{-2,5}))] + [0,86 * (1 / (1 + (b/11,09)^{-2,5}))] + [0,84 * (1 / (1 + (c/1,79)^{-2,5}))] + [0,75 * (1 / (1 + (d/95,03)^{-2,5}))] + [0,72 * (1 / (1 + (e/18,01)^{-2,5}))]$$

donde:

*a* es el valor de la actividad deshidrogenasa en  $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$

*b* es el valor de los carbohidratos hidrosolubles en  $\text{mg kg}^{-1}$

*c* es el valor de la actividad ureasa en  $\mu\text{mol NH}_3 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$

*d* es el valor del C hidrosoluble en  $\text{mg kg}^{-1}$

*e* es el valor de la respiración basal  $\text{mg C-CO}_2 \text{kg}^{-1}$

Para nuestros suelos tratados con enmiendas orgánicas hemos obtenido los siguientes valores para este índice de degradación biológica (Tabla 4.2.9)

**Tabla 4.2.9. Cambio del Índice de Degradación Microbiológica del suelo con los distintos tratamientos 5 años después de la incorporación de la enmienda.**

Tratamiento	Suelo control	S+RCd1	S+RCd2	S+RFd1	S+RFd2
Enmiendas incorporadas	1,44	3,13	3,32	2,93	2,81
Enmiendas Muching		2,99	3,18	2,70	2,57

*S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>*

De acuerdo con Bastida et al. (2006) este índice permite diferenciar niveles de degradación del suelo (muy alto, alto, bajo y nulo), mostrando los suelos menor nivel de degradación microbiológica a medida que los valores del IDM a. Así, valores de  $IDM \leq 0.65$ , o entre 0.66 y 1.54 serían indicativos de un nivel muy alto o alto de degradación, respectivamente, mientras que valores entre 1.55-3.08 serían indicativos de bajos niveles de degradación, y valores de  $\geq 3.09$  indicarían un nivel nulo de degradación microbiológica.

Este índice nos permite diferenciar niveles de degradación del suelo (muy alto, alto, bajo y nulo) y, debido a la alta sensibilidad de los parámetros que lo constituyen, es una herramienta adecuada para la detección temprana de cambios en el suelo y para la monitorización de los efectos que en ellos puedan acontecer.

En base a estudios previos se establecieron diferentes niveles de degradación del suelo (Tabla 4.2.10). Así, valores de  $IDBS \leq 0.65$ , o entre 0.66 y 1.54 serían indicativos de un nivel muy alto o alto de degradación, respectivamente, mientras que valores entre 1.55-3.08 serían indicativos de bajos niveles de degradación, y valores de  $\geq 3.09$  indicarían un nivel nulo de degradación microbiológica.

**Tabla 4.2.10. Clasificación de suelos utilizados de acuerdo con los niveles del Índice de Degradación Microbiológica (IDM)**

Nivel de degradación	Rango
Muy alto	$\leq 0,65$
Alto	0,66-1,54
Bajo	1,55-3,08
Nulo	$\geq 3,09$

De acuerdo con este índice, el suelo de partida presentaba un nivel alto de degradación microbiológica ( $IDM = 1,44$ ), apreciándose una clara recuperación de esta calidad microbiológica 5 años después de la adición de las enmiendas orgánicas, pasando el nivel de degradación microbiológica de los suelos tratados a ser bajo o nulo.

Se aprecia una evidente mejora en la calidad microbiológica de los suelos que han sido tratados con compost siendo especialmente beneficioso el empleo de compost en la dosis más alta para ambos tipos de manejo y en dosis media cuando se ha aplicado la enmienda orgánica mediante incorporación. Se hace así evidente la mejora experimentada por estos suelos tratados. El tratamiento con la dosis más alta de RF aplicada en mulching mostraba los valores más bajos de IDM, indicativo de la menor recuperación de calidad microbiológica conseguida con este tratamiento. En concordancia con lo encontrado por Bastida et

al., (2006) aquellos suelos con mayor contenido en C y mayor cobertura vegetal han mostrado los mayores valores para este índice.

Estos resultados vienen a confirmar lo anteriormente encontrado al estudiar los diferentes indicadores simples, los cuales apuntaban hacia la mejora en la calidad de los suelos, alejándose del peligro de la degradación, cuando incrementamos su materia orgánica mediante la aplicación de enmiendas orgánicas de calidad y a dosis adecuada.

### **Íncidencia de las enmiendas en la formación y características de los ácidos húmicos del suelo**

Las sustancias húmicas son probablemente los materiales de carácter orgánico más ampliamente distribuidos en la naturaleza, representando aproximadamente el 50% de la materia orgánica total del suelo (Tonelli et al., 1997), y puesto que es de la materia orgánica del suelo de donde todos los microorganismos obtendrán sus fuentes energéticas, y a partir de ella dichos microorganismos organizarán toda la vida del suelo, no cabe duda de la importancia vital de esa fracción en el suelo.

Ha sido ampliamente estudiado el efecto beneficioso que la incorporación de la materia orgánica de los residuos orgánicos, especialmente la estabilizada e higienizada mediante el compostaje, ejerce sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo, enriqueciéndolo simultáneamente en compuestos similares a las sustancias húmicas y en elementos nutritivos más disponibles para los microorganismos y las plantas (Dick & McCoy, 1993; Bastida et al 2008). Autores como Senesi et al. (2007) también han corroborado la importancia del uso como enmiendas de los residuos orgánicos urbanos, considerándolos como una valiosa fuente de material húmico para el suelo.

Las sustancias húmicas derivan principalmente de la descomposición de animales y plantas. En particular, los compuestos de las paredes celulares de las plantas, tales como la lignina y polisacáridos junto con compuestos lipídicos y material proteico, contribuyen a la estructura y composición de las sustancias húmicas a través de los diferentes procesos de humificación (Lu et al, 2000; Jindo. et al 2011). Por esta razón, la adición de residuos orgánicos al suelo debería incrementar la reserva de sustancias húmicas en el suelo y también alterar sus propiedades químicas y funcionales, dependiendo de la naturaleza de la enmienda orgánica empleada y de las condiciones medioambientales presentes en los suelos (Ouédraogo et al. 2001; Adani et al, 2007, Jindo et al, 2011).

De forma general, los compuestos que componen la materia orgánica del suelo se pueden clasificar como:

- *Sustancias no húmicas*, que consisten en compuestos químicamente definidos como son carbohidratos, proteínas, péptidos, aminoácidos, grasas, lípidos y ácidos orgánicos de bajo peso molecular, entre otros. La mayoría de estos compuestos son degradados rápidamente, tanto en suelos como en sedimentos, por la microflora.

- *Sustancias húmicas*, que se encuentran en todos los ambientes terrestres y acuáticos, y pueden considerarse como un grupo de sustancias orgánicas heterogéneas constituidas por un conjunto de moléculas altamente polimerizadas, de peso molecular relativamente alto y con un color entre amarillo y negro. Estas sustancias amorfas y con propiedades coloidales e hidrofílicas muy marcadas, están

constituidas principalmente por C, H, O y N. Contienen estructuras moleculares alifáticas y aromáticas y muestran alta capacidad de intercambio catiónico, así como gran cantidad de grupos ácidos (carboxílicos y fenólicos).

Como ya se indicó en la Introducción de esta Memoria de Tesis Doctoral, para el estudio de las propiedades químicas y coloidales de la materia orgánica en el suelo y más concretamente de las sustancias húmicas, es necesario su aislamiento de la matriz inorgánica asociada a ella, mediante la extracción química con disolventes, pudiéndose clasificar en base a su solubilidad en tres grupos universalmente reconocidos:

- Ácidos húmicos: Constituidos por la fracción insoluble en agua en condiciones ácidas ( $\text{pH} < 2$ ) pero soluble a valores mayores de pH.
- Ácidos fúlvicos: Fracción soluble en agua en todo el intervalo de pH.
- Humina: Fracción insoluble a cualquier valor de pH.

La estructura química de las sustancias húmicas ha sido uno de los temas de investigación más controvertido de las últimas décadas para los investigadores de la ciencia del suelo, y son pocos los modelos capaces de describir adecuadamente la complejidad estructural de estas sustancias.

Aunque resulta aún imposible dilucidar exactamente la estructura de las sustancias húmicas, sí es posible en cambio hacer hipótesis sobre los posibles modelos estructurales basándose en datos derivados de procesos degradativos o de pirólisis, estudios espectroscópicos, composición elemental, contenido de grupos funcionales, la alifaticidad y la aromaticidad de estas sustancias, así como de su comportamiento e interacción química entre partes de su misma estructura en disolución.

El principal objetivo que se persigue cuando se fraccionan los extractos de sustancias húmicas es reducir su heterogeneidad para facilitar la aplicación de las distintas técnicas analíticas y se basa en la separación de sus componentes aprovechando alguna propiedad relacionada con su composición molecular.

Se han empleado diferentes procedimientos para el fraccionamiento de las sustancias húmicas contenidas en la materia orgánica soluble, siendo el método más utilizado el que se basa en la variación del pH, dada la distinta solubilidad de tales sustancias según que el medio sea ácido o alcalino. De este modo, disminuyendo el valor de pH del extracto, generalmente obtenido en medio alcalino, hasta valores próximos a 2, se consigue la separación convencional en dos fracciones: Ácidos húmicos (AH) y ácidos fúlvicos (AF).

Nuestra comprensión de los cambios inducidos en las sustancias húmicas de los suelos tras la incorporación de tratamientos orgánicos es todavía limitada (Adani et al., 2007), especialmente en el caso de los suelos semiáridos. Bajo estas condiciones semiáridas, los suelos están expuestos a intensos procesos de mineralización, bajas precipitaciones y altas temperaturas, todo lo cual restringe la producción de biomasa y la entrada de residuos orgánicos a los suelos, dificultando la humificación de la materia orgánica de los mismos.

Dado que los procesos de humificación son procesos lentos requiriéndose un cierto tiempo para la formación de compuestos húmicos relativamente estables, en este trabajo de Tesis Doctoral el estudio de las sustancias húmicas se llevó a cabo al final del periodo experimental, cinco años después de la adición de las enmiendas. Para ello, las sustancias húmicas fueron extraídas de los suelos de las parcelas en estudio mediante pirofosfato sódico alcalino (0.1 M), separando los ácidos húmicos por precipitación

mediante la acidificación del extracto a pH 2. De este modo se obtuvieron por un lado los ácidos húmicos (AH) y por otro, la fracción soluble a pH 2 (FS) que engloba a los ácidos fúlvicos y al resto de compuestos orgánicos extraíbles con pirofosfato (carbohidratos, aminoácidos, etc.).

Como se observa en la Figura 4.2.27, cinco años después de la adicción de las enmiendas, todos los suelos enmendados, tanto en mulching como mediante incorporación de la enmienda a la capa arable del suelo, mostraban contenidos tanto de sustancias húmicas (SH) como de ácidos húmicos (AH) y de la fracción de sustancias húmicas soluble a pH=2 (FS) significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) a los del suelo control. Los incrementos de los valores de C de AH presentados por los suelos enmendados en relación al control oscilaban entre 3 veces para S+RFd1M y 17 veces para S+RCd2M.

Las SH y los AH presentaron un comportamiento similar frente a la introducción de las enmiendas, viéndose ambos parámetros afectados tanto por la dosis como por el grado de estabilización de la enmienda orgánica. Así, los suelos tratados con compost, material más estabilizado debido al proceso de compostaje sufrido, presentaban mayores contenidos de SH y AH que los tratados con residuos frescos a igualdad de dosis. Asimismo, independientemente del modo de aplicación de la enmienda, se observó un incremento del contenido de sustancias húmicas y de ácidos húmicos significativamente mayor en los suelos tratados con la dosis más alta de enmienda. Sin embargo, se observó que en los suelos tratados con la dosis más alta el modo de aplicación de la enmienda incidía en el contenido de sustancias húmicas y de ácidos húmicos, variando este efecto en función del tipo de enmienda. Así, mientras que en los suelos tratados con compost los mayores valores de SH y AH se encontraron cuando la enmienda se aplicaba en mulching, en los suelos tratados con RF los mayores contenidos de ambos parámetros se detectaban cuando la enmienda se había añadido mediante incorporación en la capa arable (Figura 4.2.27).

Con respecto a la fracción de sustancias húmicas soluble a pH 2, se observaron también diferencias entre dosis, mostrando, para un mismo tratamiento, los suelos tratados a la dosis más alta mayores contenidos de FS que los tratados a dosis más baja. Asimismo, se observó incidencia del tipo de enmienda aplicada en el contenido de esta fracción mostrando los suelos tratados con RF menores contenidos de FS que los tratados con RC, aunque las diferencias no siempre eran estadísticamente significativas (Figura 4.2.27). En relación a los contenidos en el suelo de esta fracción, no se encontraron diferencias significativas al comparar los distintos manejos de aplicación de la enmienda. Los incrementos con respecto al suelo control de esta fracción de carbono oscilaban entre 2,5 veces superior para S+RFd1 y 6.5 veces para S+RCd2M.

Vemos así, que la adición inicial de enmiendas orgánicas ha causado un marcado incremento, con respecto al control, en la cantidad de ambas fracciones, AH y FS, 5 años después de la incorporación de las enmiendas.

El mayor incremento en el contenido de estas fracciones tanto en los suelos de las parcelas donde la enmienda había sido incorporada en la capa arable como en las enmendadas en mulching, se observó, a igualdad de dosis, en los suelos enmendados con compost. Este hecho es probablemente debido al carácter más estable y estructurado de la materia orgánica del compost capaz, por tanto, de fomentar en el suelo el progreso de los procesos de humificación (Ros et al., 2000; Bastida et al., 2008). Otro posible factor que puede contribuir al mayor contenido de AH en estos tratamientos podría ser la presencia de una mayor cobertura vegetal en estos suelos, la cual provoca el mantenimiento de altos niveles de carbono que

pueden ser incorporados a las fracciones más estables de la materia orgánica (Ros et al., 2003; Tejada et al., 2006).

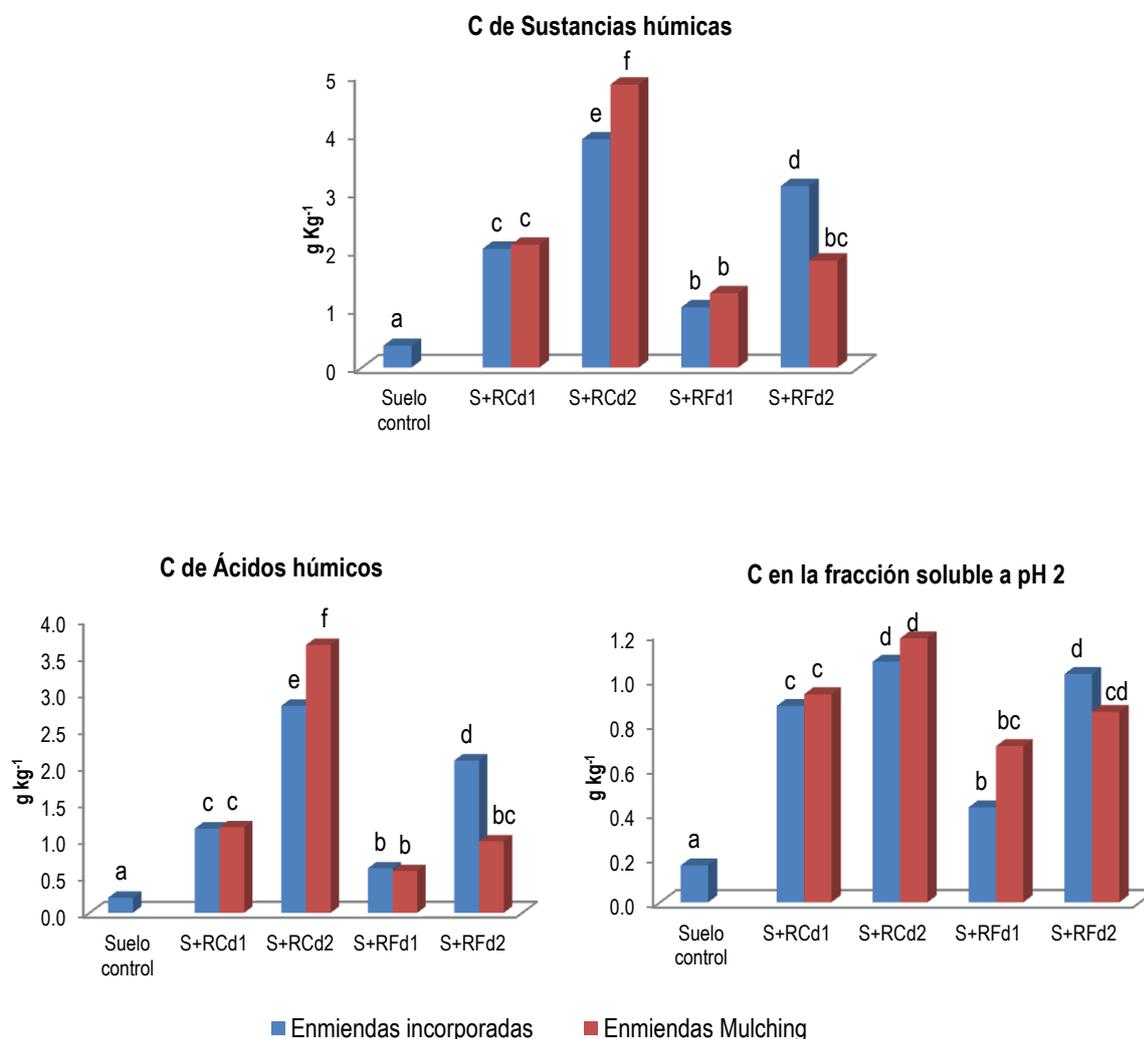


Figura 4.2.27. Contenido de carbono de sustancias húmicas, ácidos húmicos y de la fracción de sustancias húmicas soluble a pH 2 en los suelos enmendados y control tras 5 años de incorporación de las enmiendas. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada tratamiento (letra minúscula) la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### Análisis elemental de los ácidos húmicos

La importancia de los ácidos húmicos, como parte fundamental en el mantenimiento y mejora de las propiedades físicas, microbiológicas y químicas del suelo, ha llevado a miles de investigadores a interesarse por el estudio de su estructura (Almendros, 2002).

El análisis elemental informa sobre la distribución porcentual de los elementos mayoritarios que constituyen estas macromoléculas, que genéricamente son carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre. La composición elemental de estos compuestos puede estar afectada por el pH, el tipo de material mayoritario del que proceden, la vegetación y la edad del suelo. Otros factores que pueden afectar su composición,

derivan de la metodología empleada para la extracción y purificación de las sustancias húmicas y del contenido en humedad, así como del manejo previo que reciban las mismas (Stevenson, 1994).

La composición elemental de los AH extraídos fue determinada usando un CHN autoanalizador Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Foster City, CA). El contenido de oxígeno (O) fue calculado mediante la diferencia a 100 de la suma de los valores de CNH ( $O\% = 100 - C\% - H\% - N\%$ ).

En la tabla 4.2.11 se muestra la composición elemental de los ácidos húmicos extraídos de los suelos de las parcelas en estudio 5 años después de la incorporación de la enmienda. Otra forma de expresar la información del análisis elemental es mediante el uso de las relaciones entre átomos.

**Tabla 4.2.11. Análisis elemental de los ácidos húmicos extraídos de los suelos enmendados por incorporación en la capa arable del suelo y del suelo control 5 años después de la enmienda.**

	g/100g					relaciones atómicas		
	C	H	N	S	O	H/C	N/C	O/C
Suelo control	48,47(2,3)	4,78(0,03)	5,69(0,06)	0,68(0,02)	41,06(4,2)	1,18(0,03)	0,10(0,01)	0,64(0,03)
S+RCd1	48,97(3,2)	5,08(0,02)	7,39(0,08)	1,76(0,03)	38,57(2,3)	1,25(0,02)	0,13(0,01)	0,59(0,04)
S+RCd2	48,65(2,8)	4,84(0,03)	6,82(0,05)	1,56(0,04)	39,69(2,8)	1,20(0,02)	0,12(0,01)	0,61(0,02)
S+RFd1	50,02(3,8)	5,01(0,02)	6,04(0,08)	1,27(0,05)	38,03(1,8)	1,20(0,03)	0,10(0,01)	0,58(0,03)
S+RFd2	51,37(2,6)	5,22(0,02)	6,51(0,02)	1,27(0,02)	37,00(1,4)	1,22(0,02)	0,11(0,01)	0,54(0,02)

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. ( ): error estándar, n=3.

En general, la información encontrada en la bibliografía sobre las propiedades de los ácidos húmicos obtenidos a partir del compost y de los efectos que las aplicaciones que esta enmienda tiene sobre los ácidos húmicos autóctonos del suelo es más limitada que la existente para otros residuos orgánicos. Siendo esta bibliografía especialmente escasa cuando se trata de algo tan específico como la adición de este tipo de enmiendas mediante mulching. En la Tabla 4.2.12 se muestra la composición elemental de los ácidos húmicos extraídos de los suelos enmendados con compost y con RF en las parcelas enmendadas mediante mulching.

**Tabla 4.2.12. Análisis elemental de los ácidos húmicos extraídos de los suelos enmendados mediante mulching y del suelo control 5 años después de la enmienda.**

	g/100g					relaciones atómicas		
	C	H	N	S	O	H/C	N/C	O/C
S+RCd1M	50,01(1,12)	5,04(0,05)	6,04(0,08)	1,46(0,06)	38,91(3,6)	1,21(0,06)	0,10(0,01)	0,58(0,04)
S+RCd2M	52,38(1,08)	5,97(0,06)	6,97(0,13)	1,32(0,08)	34,69(2,8)	1,37(0,03)	0,11(0,01)	0,50(0,05)
S+RFd1M	50,87(0,89)	5,45(0,04)	5,75(0,06)	1,17(0,08)	37,93(3,2)	1,29(0,03)	0,10(0,01)	0,56(0,02)
S+RFd2M	50,68(0,75)	5,51(0,02)	6,51(0,11)	1,23(0,03)	37,30(1,8)	1,31(0,05)	0,11(0,01)	0,55(0,01)

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. ( ): error estándar, n=3.

Los porcentajes de los elementos estudiados en los ácidos húmicos procedentes de estos suelos están, para ambos tipos de manejo de la enmienda (aplicación en superficie o en mulching), dentro de los rangos encontrados en la bibliografía (Schnitzer, 1978; Riffaldi et al., 1983; García et al., 1989).

Para todos los suelos enmendados vemos que a pesar del significativo incremento observado en la cantidad de carbono en la fracción húmica y soluble a pH 2 de los suelos con la incorporación de las enmiendas, el análisis elemental de C, N, H y O de los ácidos húmicos extraídos del suelo sólo detectó pequeñas variaciones en su composición elemental, sugiriendo, que el aporte inicial de las enmiendas, si bien incrementa el contenido de sustancias húmicas y ácidos húmicos de los suelos tratados, no altera de modo drástico, a medio plazo, la composición elemental de los mismos. No obstante, los ácidos húmicos de los suelos tratados exhibían una mayor proporción de C, N y S y una menor proporción de oxígeno que los AH del suelo control, no apreciándose diferencias notables en cuanto a la composición elemental de los AH en relación al modo de aplicación de la enmienda. Los principales cambios en relación al tipo de enmienda aplicada se observaron en la concentración de N y de S, que, a igualdad de dosis, tendía a ser mayor en los suelos enmendados con compost, y consecuentemente, la relación N/C era también mayor en los AH de estos suelos (Tablas 4.2.11-4.2.12) (Stevenson, 1994; Velasco et al. 2004). En general, los AH de los suelos tratados con compost eran los que presentaban los valores más altos de N, probablemente debido a una mayor presencia de N total en el compost. La mayor proporción de N y S en los AH de los suelos enmendados frente a los del suelo control podría deberse a una mayor presencia de compuestos proteínicos y una mayor presencia de S proveniente de la incorporación de detergentes en los lodos, que introducirán estos compuestos en la molécula de los AH nativos del suelo (Senesi et al., 1996; Fernández et al., 2008).

Por otra parte, las relaciones atómicas H/C, N/C y O/C proporcionan información muy útil para identificar los distintos tipos de sustancias húmicas, modelizar cambios estructurales en la molécula y establecer aproximaciones a la fórmula molecular de la misma (Steelink, 1985). Así, los AH de todos los suelos enmendados presentaban valores más bajos para la relación O/C que los AH del control, lo que sugiere un contenido menor de grupos funcionales oxigenados (ácidos carboxílicos, grupos fenólicos, carbonil, alcohol y metoxil) en los AH de los suelos enmendados (Sánchez-Monedero et al., 2002; Zhang et al, 2011).

Otra importante característica de estos ácidos húmicos es su concentración de H y su relación atómica H/C, los cuales son comúnmente usados como un indicador del grado de maduración de las sustancias húmicas, mostrando los AH un carácter tanto más aromático cuanto menor es el valor de esta relación H/C (Belzile et al., 1997; Lu et al., 2000). En nuestro caso se apreciaban menores valores de la relación H/C en los AH en el suelo control que en los AH de los suelos enmendados pero cabe destacar que estas diferencias no son demasiado importantes, lo cual sugiere una tendencia a la estabilización de los nuevos AH formados en estos suelos.

### **Caracterización estructural y química de los ácidos húmicos**

El hecho de que las sustancias húmicas y entre ellas la fracción de ácidos húmicos (AH) estén constituidas por una compleja mezcla de moléculas, hace su estudio particularmente difícil si lo comparamos con el de moléculas discretas. La composición de estas sustancias varía en gran medida dependiendo del material de

partida y del método de extracción, por lo que para una buena caracterización de las mismas es necesario normalmente aplicar más de un método analítico.

El desarrollo de las diferentes técnicas espectrales como la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier o la resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  han permitido avanzar considerablemente en el estudio y entendimiento de la estructura de los ácidos húmicos y por tanto, en el estudio y entendimiento de sus funciones y relaciones en el suelo con los nutrientes y contaminantes (Almendros, et al., 1998; Ribeiro, et al., 2001; Chefetz, et al., 2002). Así, por medio de espectroscopia  $^{13}\text{C}$ -RMN en estado sólido se han podido establecer significantes diferencias en la composición de las fracciones de la materia orgánica asociadas a distintos componentes minerales (Christensen, 1996; Guggenberg et al., 1995; Randall et al., 1995) y mediante espectroscopia FT-IR se ha podido determinar su diferente estabilidad en el suelo (Ellerbrock & Kaiser, 2005).

### **Caracterización estructural (FT-IR) de los ácidos húmicos**

Los espectros de infrarrojo son de gran utilidad en el análisis y caracterización de las sustancias húmicas y de los ácidos húmicos porque muestran bandas que son el reflejo directo de sus estructuras moleculares (Ribeiro et al., 2001; Kang, et al., 2003) además de ser de gran utilidad para evaluar los cambios producidos en la estructura química de la molécula, la presencia o ausencia de impurezas inorgánicas y las posibles interacciones con metales y pesticidas (Senesi & Loffredo, 1999). Los espectros de infrarrojos obtenidos a partir de los ácidos húmicos extraídos del suelo permiten el estudio comparativo de los mismos a partir del número y de la intensidad relativa de los picos observados para cada muestra.

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (IR-TF) se obtuvieron con un equipo Bruker EQUINOX 25. Se registraron los espectros entre 4000 y 200  $\text{cm}^{-1}$  con resolución de 1  $\text{cm}^{-1}$ . Las pastillas para la lectura por IR, se obtuvieron prensando con una fuerza de 3 ton una mezcla previamente molida de KBr y ácidos húmicos liofilizados.

En la Tabla 4.2.13 se señalan las principales bandas de absorción observadas en los espectros de IR-TF de los ácidos húmicos en estudio y su asignación a los diferentes grupos funcionales (Andjelkovic et al., 2006; Song et al., 2001; Amir et al., 2003; Lguirati et al., 2005; Samios et al., 2007).

Los espectros de los ácidos húmicos del suelo control y de los suelos enmendados 5 años después la incorporación de la enmienda se muestran en la Figura 4.2.28. Los perfiles de IR eran bastante similares en todos los AH residiendo las mayores diferencias en la intensidad relativa de las bandas del espectro. Así, se observaban ciertas diferencias entre los AH del suelo control y los de los suelos enmendados, así como entre los AH de los diferentes tratamientos, dependiendo del tipo de enmienda o del tipo de manejo usado para la aplicación de la enmienda (incorporación a la capa arable o en mulching).

Los espectros IR-TF obtenidos para los AH en estudio eran similares a los encontrados por otros autores (Stevenson, 1994; Jindo et al., 2011). Para todos los AH se apreciaba una intensa y amplia banda aproximadamente a 3400  $\text{cm}^{-1}$ , atribuida generalmente a tensión O-H, y N-H de varios grupos funcionales (Andjelkovic et al., 2006), cuya intensidad era mayor en los AH del control y de los suelos tratados en

mulching que en el resto de AH (a excepción de S+RCd1), indicando una pérdida de grupos alcohol en estos últimos AH.

**Tabla 4.2.13: Bandas de IR y su asignación.**

Longitud de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación de la banda
775-975	Inclinación fuera del plano del enlace C–H aromático.
1030-1080	Estiramiento C–O–C de éteres aromáticos, carbohidratos y polisacáridos
1170	Vibraciones del grupo alcohol, CH <sub>2</sub> o grupos C-O.
1200-1260	Estiramiento C–OH de grupos aromáticos y estiramiento C–O–C de éteres arílicos y fenoles.
1380-1400	Deformación de los O–H, estiramiento C–O de fenoles, estiramiento anti-simétrico COO- y deformación C-H en alifáticos.
1440-1460	Deformación C–H alifáticos en ácidos grasos y grasas
1510- 1560	Estiramiento C-C de aromáticos, deformación N–H y estiramiento C=N de grupos amida.
1580-1600	Estiramiento C=N en amidas secundarias y C=O en quinonas, ácidos cetónicos y amidas.
1630- 1650	Estiramiento C=C de aromáticos, estiramiento C=O en quinonas, ácidos cetónicos y amidas primarias.
1700-1735	Estiramiento C-O carboxílicos, cetónicos y ésteres
2680- 2685	Estiramiento de OH con puentes de H.
2850	Estiramiento asimétrico C-H de –CH <sub>3</sub> y –CH <sub>2</sub> – en cadenas alifáticas.
2920-2930	Estiramiento C-H alifático (simétrico y asimétrico) de –CH <sub>3</sub> y –CH <sub>2</sub> –.
3300- 3500	Vibraciones de los grupos O–H de fenoles, alcoholes y ácidos carboxílicos y vibraciones de los N-H de amidas y aminas,

En las regiones de absorción derivada de C-H alifáticos se observó lo siguiente: un pico agudo a 2930-2920 cm<sup>-1</sup> correspondiente a las tensiones C-H de grupos alifáticos (Andjelkovic et al., 2006; Song et al., 2001), de mayor intensidad relativa en los AH de los tratamientos del control que en los AH de los suelos tratados, con excepción del tratamiento S+RFd2M, cuyos AH presentaban una intensidad de banda superior a los del suelo control. Entre los AH de los suelos enmendados, los procedentes de los suelos enmendados con compost presentaban mayor intensidad en esta banda que los de los suelos enmendados con RF, para ambas dosis y para ambos tipos de manejo. En la banda de 2860-2850 cm<sup>-1</sup> correspondiente también a estiramiento C-H en cadenas alifáticas, se observaba en la mayoría de los espectros de AH de los suelos enmendados un hombro de pequeña intensidad que no se apreciaba en los AH del suelo control y que era más pronunciado en los AH de los suelos tratados con RF, en particular en los AH de los suelos tratados con incorporación de la enmienda en la capa arable. La tercera banda de vibraciones C-H de grupos alifáticos, alrededor de 1440-1480 cm<sup>-1</sup>, era de pequeña intensidad en todos los espectros, observándose tan sólo un pequeño pico tanto en los AH del suelo control como en los de los suelos enmendados, con la excepción de los AH de los suelos de mulching tratados a la dosis más alta de enmienda (S+RCd2M y

S+RFd2M) cuyos espectros mostraban un pico agudo, de intensidad media, bien definido, indicando un mayor contenido de alifáticos en estos AH.

Son diversos los autores que han observado un claro incremento en la intensidad de estas bandas de alifáticos en los espectros de IR-TF de AH de suelos enmendados en relación a los AH del suelo sin enmendar (Gigliotti et al., 1997; Brunetti et al., 2007; Hueso et al., 2012); sin embargo, en nuestro estudio, solo se observaba un ligero aumento de alifáticos en algunas regiones del espectro. Watanabe et al. (2007), en un estudio sobre la influencia en las características de los AH de continuadas aportaciones de estiércol a un suelo de cultivo, observaron que si bien la adición de la enmienda incrementaba el contenido de AH, no se observaban alteraciones apreciables en las características químicas de estos AH, lo que atribuyeron a la similitud entre los AH originarios del suelo y los AH aportados por la enmienda. En nuestro caso, al margen de esta posible similitud entre los AH originarios del suelo y los aportados con las enmiendas, es posible que en las transformaciones sufridas en el suelo por las enmiendas en los 5 años transcurridos desde su aplicación al suelo, se hayan perdido gran parte de estos componentes alifáticos, disminuyendo la contribución de estos compuestos alifáticos por parte de la enmienda a los AH del suelo en relación a compuestos proteínicos y polisacáridos que como veremos a continuación se incorporan en mayor medida a estos AH. En los AH de los suelos tratados con incorporación de la enmienda en la capa arable se observa un hombro aproximadamente a  $1725\text{ cm}^{-1}$  asociado a la tensión C=O de COOH y grupos carbonilos de cetonas, que no aparece en los AH del control; la desaparición de este pico es posiblemente debido al hecho de que la mayoría de estos grupos carboxílicos se encuentran en forma de sales (El-Sayed et al, 1996), favorecido por el propio método de extracción de los ácidos húmicos, ya que con el pirofosfato sódico como extractante estos grupos se encontrarán en forma de carboxilatos y, por tanto, la señal está desplazada hacia la región de  $1650\text{ cm}^{-1}$  (Hernández et al., 1993). La fuerte absorción aparecida a  $1630\text{-}1650$ , atribuida, entre otros muchos grupos, a grupos  $\text{COO}^-$  (Chai et al., 2007), parece confirmar esta hipótesis; esta banda de absorción presentaba mayor intensidad y amplitud en los AH de los suelos enmendados que en los del control, englobando dentro de esta banda la región de  $1580\text{-}1600$ , en la que en los AH del suelo control solo se detecta un amplio hombro, y que es atribuida a la presencia de amidas secundarias, quinonas y ácidos cetónicos. La mayor intensidad de esta banda se detectó en los AH de los suelos enmendados con compost, seguidos por los ácidos húmicos de los suelos enmendados con RF. Esta banda se encuentra asignada a compuestos nitrogenados procedentes de cadenas peptídicas que forman parte de grupos amidas, indicando un mayor contenido de proteínas en los AH de los suelos enmendados. Asimismo, en el espectro de los AH de los suelos enmendados se observaba una banda de intensidad media próxima a  $1540\text{ cm}^{-1}$  asociada a la presencia de compuestos nitrogenados, fundamentalmente a la deformación N-H y a la tensión C=N de amidas (banda amida II), que no se apreciaba en los AH del suelo control.

Asimismo, se detectó una banda amplia de intensidad media centrada entre  $1400$  y  $1380\text{ cm}^{-1}$  fundamentalmente adscrita a la deformación O-H y a la tensión C-O de OH fenólicos, a la deformación C-H de grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  y/o a la tensión antisimétrica de grupos  $\text{COO}^-$ , que presenta un pico bien definido en los AH del suelo control y en los AH de los suelos en mulching (excepto los AH del tratamiento S+RCd1M), mientras que en el resto de los AH tan sólo presentaba un pequeño pico poco definido, señalando de nuevo una mayor similitud de los AH de los suelos tratados en mulching con el control en relación a los AH de los suelos enmendados mediante incorporación de la enmienda en la capa arable.

En todos los AH se apreciaba también una banda ancha de intensidad media-fuerte centrada a 1240-1260  $\text{cm}^{-1}$ , mostrando los AH de los suelos enmendados una intensidad menor que los del suelo control; esta banda, asignada generalmente a la deformación de C-O y O-H y estiramiento de enlaces C=O de grupos carboxilos, y a la tensión C-O de aril éteres y fenoles, mostró menor disminución de intensidad en los AH de los suelos tratados con compost, para ambos tipos de manejo y dosis que en los AH de los suelos tratados con RF.

La banda de absorción aproximadamente a 1040  $\text{cm}^{-1}$ , asociada generalmente a la tensión C-O de polisacáridos y vibraciones Si-O de impurezas de silicatos, era mayor en los AH de los suelos enmendados que en los AH del control. Esta banda, que refleja la presencia de compuestos lábiles de C, tales como carbohidratos provenientes de celulosa y hemicelulosa (Adani et al., 2007), característicos de los materiales compostados y de grupos amida y amino característicos de los lodos (Hafidi et al., 2005) era más intensa en los AH de los suelos tratados con RC que en los de los suelos tratados con RF.

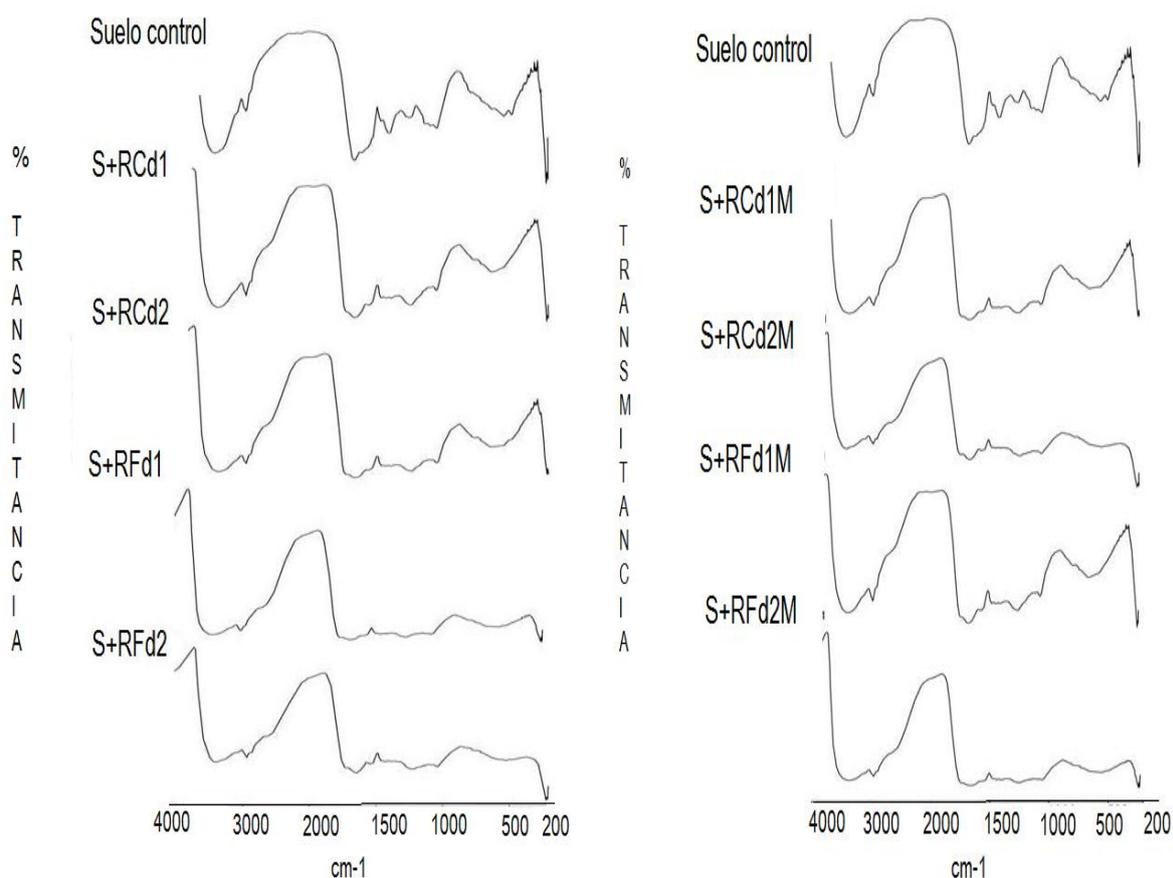


Figura 4.2.28. Espectros de infrarrojo de los ácidos húmicos de suelos enmendados y el control a los 5 años de la incorporación de la enmienda.

Como hemos podido observar, las mayores diferencias entre los AH del suelo control y de los suelos enmendados se centran fundamentalmente en un aumento de la intensidad relativa de las bandas correspondientes a amidas I ( $1630\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ ), amidas II ( $1580\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$ ) y a polisacáridos ( $1030\text{-}1040\text{ cm}^{-1}$ ). Estos efectos son, en general, más evidentes en el caso del tratamiento con compost tanto a d1 como a d2, indicando que el tipo de enmienda aplicada afecta, al menos parcialmente, a la estructura y a las propiedades funcionales de los ácidos húmicos originales del suelo. Asimismo, los AH de los suelos enmendados mostraron en relación a los AH del suelo control, una menor intensidad de las bandas atribuidas a grupos fenólicos, carboxílicos y aril éter ( $1380\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  y  $1240\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ ).

Cabe destacar que, como ya se ha observado en la composición elemental, los espectros FT-IR de los AH extraídos a los 5 años de la enmienda, han reflejado ciertas diferencias estructurales entre los AH en función del tipo de enmienda (RF o RC), existiendo también ciertas diferencias derivadas del tipo de manejo de la enmienda (incorporación a la capa arable o mulching). Otros autores han observado también que la aplicación de enmiendas orgánicas introduce cambios estructurales en los AH originales del suelo. Así, Adani et al., (2007) estudiando los espectros de IR de los AH de un suelo sin enmendar y enmendado con compost a los 4 años de la incorporación de la enmienda, encontraron, al igual que nosotros, una banda especialmente intensa a  $1665\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a altos contenidos de N. En nuestros suelos, esta banda fue más intensa en los suelos enmendados con compost, como era de esperar, ya que el estudio del análisis elemental ya confirmaba una mayor concentración de N en los suelos con las enmiendas compostadas. Brunetti et al. (2007) en un estudio de los AH extraídos de suelos enmendados con purín de cerdo, lodo de depuradora y fracción orgánica de basura doméstica, observaron también una mayor intensidad de los picos correspondientes a amidas y polisacáridos en los AH de todos los suelos enmendados.

*En conclusión, podemos indicar que 5 años después de la enmienda se observa la incorporación de estructuras de polisacáridos, y grupos conteniendo S y N, probablemente cadenas polipeptídicas, en los AH nativos del suelo, así como una disminución de los grupos carboxílicos. Aún así, los AH de los suelos tratados en mulching muestran una mayor similitud con los AH del suelo control que los de los suelos tratados con incorporación de la enmienda en la capa arable.*

### **Caracterización químico-estructural (CPMAS $^{13}\text{C}$ -NMR) de los ácidos húmicos**

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear es una poderosa herramienta analítica para la caracterización estructural de formas de materia orgánica macromolecular, ya que permite identificar los diferentes tipos de C o, lo que es igual, la proporción relativa de las diferentes unidades estructurales carbonadas, constituyentes de dichas macromoléculas.

En las últimas décadas, la RMN de  $^{13}\text{C}$  ha sido profusamente aplicada en estudios básicos y aplicados sobre el análisis químico-estructural de matrices naturales complejas, incluyendo las diferentes formas de materia orgánica de suelos, aguas y sedimentos, dando lugar a una gran abundancia de información bibliográfica (Preston, 1996; Skjemstad et al., 1997; González et al., 2003; Garcette-Lepecq et al., 2000; Knicker et al., 2003, 2006; Knicker 2010; Zhang et al., 2011; Chiu & Tian, 2011; Kholodov et al., 2011; Li et al., 2012).

Los espectros pueden dividirse en regiones correspondientes a distintos tipos de C o unidades estructurales, y las áreas de esas regiones informan sobre la proporción de estas unidades en la materia orgánica macromolecular estudiada. Si bien suelen integrarse intervalos relativamente anchos en el caso de las sustancias macromoleculares, también pueden integrarse las áreas de picos característicos de algunos tipos de C (Knicker et al., 2003, 2006).

Los espectros RMN  $^{13}\text{C}$  son divididos en regiones según los desplazamientos químicos (Tabla 4.2.14). La asignación de las regiones se ha realizado de acuerdo con los estudios existentes sobre la caracterización de la materia orgánica de suelos (Kögel-Knabner et al., 1991, 1992; Gubberberger et al., 1995; Preston, 1996; Baldock et al., 1997; Preston et al., 1998; Huang et al., 1998; Mathers et al., 2003).

Las cuatro regiones principales que suelen integrarse en los espectros de materia orgánica macromolecular corresponden a los siguientes tipos de C: alquílico (0-45 ppm), O/N- alquílico (45-110 ppm), aromático/olefínico (110-160 ppm) y C de ácidos carboxílicos y carbonílico/amídicos (160-220 ppm) (González-Vila et al., 1976; Wilson, 1981; Zhang et al., 2012). También se distinguen e integran en determinados casos las sub-regiones siguientes: C-alquílico móvil (terminal) (0-25 ppm), C-alquílico rígido (25-45 ppm), metoxilos, por ejemplo de ligninas que se solapan con C alifáticos sustituido con N (45-60 ppm), C en los alcoholes primarios y secundarios, éteres y aminas (60-90 ppm), C acetílico en carbohidratos y C cuaternario en taninos condensados (90-110 ppm), C aromático no sustituido o con sustituyentes de tipo alquílico (110-140 ppm), C aromático heterosustituido (140-160 ppm), C carbonílico en ácidos carboxílicos, ésteres y amidas (160-190 ppm) y C carbonílico en aldehídos y cetonas (190-220 ppm) (Wilson 1987; Preston, 1996). Una importante ventaja de la RMN de  $^{13}\text{C}$  es su capacidad para analizar los constituyentes del dominio alifático de los complejos macromoleculares, permitiendo diferenciar entre los grupos alquílicos y las estructuras O-alquílicas, a diferencia de la mayoría de métodos de degradación química (Almendros et al., 2000a).

**Tabla 4.2.14. Asignaciones estructurales para las principales señales en los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de materia orgánica.**

Desplazamiento químico (ppm)	Asignaciones	Regiones
220-190	Carbonos de quinonas, cetonas, aldehídos	carbonil
190-160	Carbonos de carbonilos, carboxilos, ésteres y amidas (péptidos)	
160-140	Carbonos aromáticos sustituidos por grupos funcionales con O ó N, enlaces C-ar -C sustituido a C-alifático excepto $\text{CH}_3$ , subunidades fenólicas y aril-éter de la lignina y taninos	Aromática
140-110	C-ar sustituido por grupos alquílicos y formando puentes C-H; carbonos internos de C-ar condensado, C-ar no sustituido; carbonos en C-ar-H orto a C-ar-O estructuras aromáticas (ligninas, taninos) y olefinas.	
110-90	Carbonos anoméricos de polisacáridos	O-Alquílica
90-60	Carbonos alifáticos sustituidos; C sustituidos por OH, O y N en carbohidratos y aminoácidos, éteres alifáticos distintos a grupos metoxi o etoxi	
60-45	Carbonos de los sustituyentes de la lignina, aminoácidos y aminoazúcares	
45-0	Carbonos alifáticos no sustituidos; C en $\text{CH}_2$ en hidrocarburos de cadena larga saturados; C en CH y $\text{CH}_2$ unidos a anillos aromáticos; C en $\text{CH}_2$ en grupos alicíclicos y etilo, C alifático de péptidos, C en $\text{CH}_3$ .	Alquílica

Car: Carbono aromático

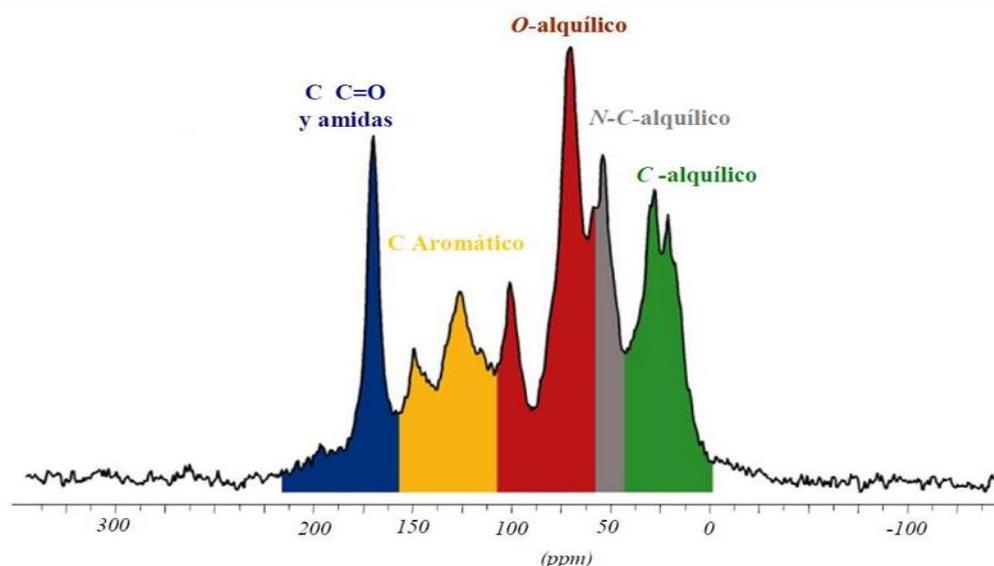


Figura 4.2.29: Espectro de CPMAS-RMN de  $^{13}\text{C}$  de un suelo (Luvisol, horizonte Ap) (modificado según Knicker y Müller, 2006).

Los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los AH de los suelos enmendados mediante incorporación de la enmienda a la capa arable del suelo y del suelo control se muestran en la Figura 4.2.30.

Los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de todos los ácidos húmicos presentaban una banda en la región de C de álcali  $\delta < 45\text{ppm}$ , siendo particularmente fuerte la señal a  $\delta \pm 30\text{ppm}$ . Esta banda puede ser atribuida a la presencia de estructuras alquílicas lineales de cadena larga, así como a estructuras ramificadas cortas tales como R-CH y R-CH<sub>2</sub> (Ricca et al., 2000, Genevini et al., 2002; Adani et al., 2007).

La intensidad de esta banda era superior para los AH de los suelos enmendados, presentando valores de área mayores que los AH del suelo control, siendo los AH de los suelos enmendados con compost a la dosis más alta los que presentaron mayores valores. El incremento en el C alquílico constituye la más importante contribución de los AH de todos los suelos enmendados frente a los AH del suelo sin enmendar. Otros autores han encontrado resultados similares en AH de suelo tratado con lodos de depuradora (Fernández et al., 2008).

Por otra parte, la región comprendida entre 45-110 ppm, correspondiente a alcoholes alifáticos y fracciones de éter tales como las presentes en las estructura de los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), cuya señal puede ser producida por elementos del lignina por presentar señal también en este rango (Kögel-Knabner, 2002) presentó para los AH de los suelos enmendados menores valores que los AH del suelo control. Esta región de C de O-alquil estaba dominada por dos señales importantes, una banda a 55 ppm y otra alrededor de 73 ppm. La señal a 55 ppm se asigna a grupos metoxilo asociados con la lignina y productos semejantes a la lignina y el pico a 73 ppm, se atribuye a anillos de carbono de carbohidratos y de cadenas laterales de lignina. Estos picos presentaban en los AH de los suelos enmendados menores intensidades que los de los AH del control, mostrando los AH de los suelos tratados con compost una intensidad de estas bandas ligeramente superior a la de los AH de los suelos tratados con RF, especialmente para los AH de los suelos tratados a la dosis más alta. Asimismo, se observaba en estos espectros una banda en la región

de 90-110 ppm atribuida a C de grupos di-O-alquil incluyendo C-anomérico de carbohidratos (Chiu & Tian, 2011), que también era mayor en los AH del suelo control que en los AH de los suelos enmendados.

Asimismo, la región entre 110 y 160 ppm era predominante para los AH del suelo control, mostraron una mayor abundancia para el C aromático (pico a 129 ppm) (Chefetz et al., 2002), indicando una disminución de la aromaticidad de los AH del suelo con la adición de las enmiendas orgánicas.

La región entre 160 y 210 ppm, atribuible a la resonancia de carboxilos, carbonilos y amidas, mostro una señal dominante a 174 ppm, presentando los AH del suelo control mayor intensidad de banda en esta región que los AH de los suelos tratados, indicando una menor oxidación y menor contenido de grupos funcionales ácidos en los AH de los suelos enmendados, lo cual coincide con el análisis elemental de estos AH.

En resumen, los ácidos húmicos extraídos de los suelos enmendados mostraron mayores valores de C alquilico (0-45 ppm) y menores valores de C de O/N alquilico (45-110 ppm), de C de aromáticos (110-160 ppm) y C de carbonil/amida y C de carboxílicos (160-220 ppm) que el suelo control.

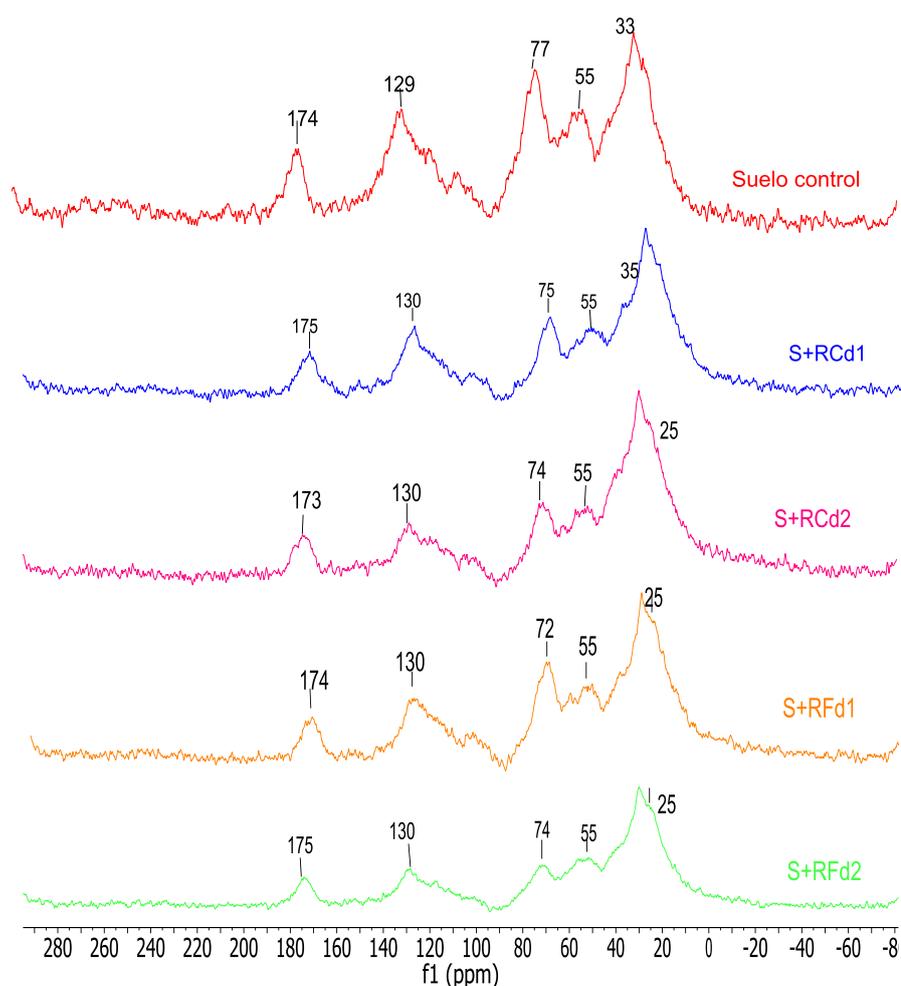


Figura 4.2.30. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de los ácidos húmicos (AH) extraídos del suelo control y de los suelos enmendados mediante incorporación en la capa arable 5 años después de la incorporación de las enmiendas (P6). S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ .

En cuanto a los suelos enmendados mediante mulching, se observó que los AH de los suelos enmendados con compost, como ya ocurriera cuando se realiza la adición de la enmienda mediante incorporación, eran los que presentaban un mayor incremento en los compuestos alifáticos en relación a los AH del control, mostrando los residuos frescos un aumento más moderado de la intensidad de la banda en esta región ( $0 < \delta \leq 45$  ppm). Asimismo, al igual que se observó en los espectros de los AH de los suelos tratados mediante incorporación, la intensidad de las bandas de los AH de los suelos enmendados en la región correspondiente al contenido de C de O/N alquílico (45-110 ppm) era inferior al de los AH del suelo control, mostrando en este caso los AH de los tratamientos con RF intensidades algo superiores a las de los AH de los tratamientos con compost (Figura 4.2.31).

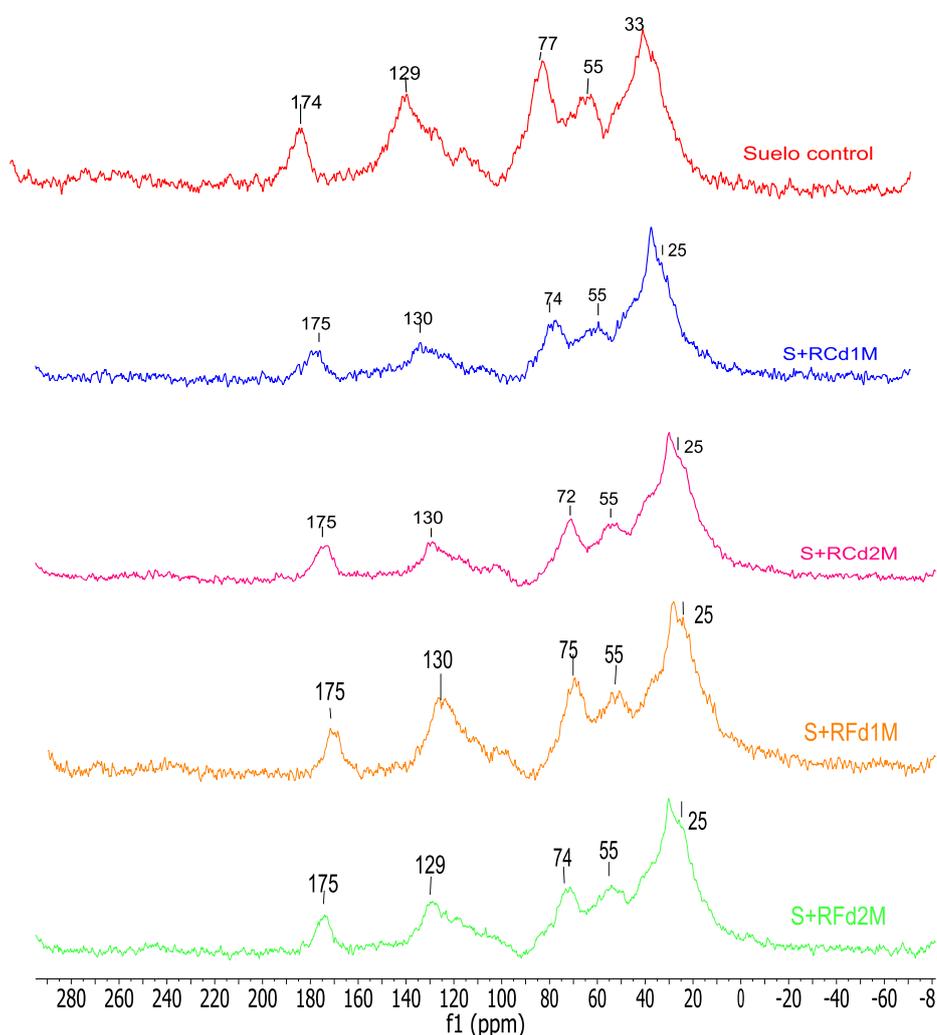


Figura 4.2.31. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de los ácidos húmicos (AH) extraídos del suelo control y de los suelos enmendados mediante mulching 5 años después de la aplicación de las enmiendas (P6). S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{\text{org}}$ ; d2: 3%  $C_{\text{org}}$ . M (mulching).

La observación de la distribución de los grupos de carbono pone de relieve que el carácter alifático de los AH de los suelos enmendados ha incrementado con respecto a los AH del suelo control (Tabla 4.2.15).

**Tabla 4.2.15. Distribución (%) de grupos de carbono obtenidos de los ácidos húmicos (AH) de los suelos enmendados y del suelo control tras 5 años de la incorporación de las enmiendas.**

	C- alifático ( $0 < \delta \leq 45$ ppm)	C- alifático- N/O ( $45 < \delta \leq 110$ ppm)	C- aromático ( $110 < \delta \leq 160$ ppm)	C- carboxílico/C- amida/C- cetonico ( $160 < \delta \leq 220$ ppm)
Suelo control	45,0	29,9	15,6	9,6
S+RCd1	61,8	26,1	6,9	5,2
S+RCd2	73,5	17,1	5,6	3,7
S+RFd1	55,5	23,2	5,8	5,5
S+RFd2	69,2	18,4	7,6	4,8

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ .

En los AH de los suelos enmendados mediante mulching se observa, al igual que en los AH de los suelos donde la enmienda fue incorporada a la capa arable, un aumento en el carácter alifático como se ve reflejado al estudiar la distribución de los grupos de carbono (Tabla 4.2.16).

**Tabla 4.2.16. Distribución (%) de grupos de carbono obtenidos de los ácidos húmicos (AH) de los suelos enmendados y del suelo control tras 5 años de la incorporación de las enmiendas.**

	C- alifático ( $0 < \delta \leq 45$ ppm)	C- alifático- N/O ( $45 < \delta \leq 110$ ppm)	C- aromático ( $110 < \delta \leq 160$ ppm)	C-carboxílico /C-amida /C-cetonico ( $160 < \delta \leq 220$ ppm)
Suelo control	45,0	29,9	15,6	9,6
S+RCd1M	67,7	20,7	6,9	4,7
S+RCd2M	70,7	17,4	5,8	6,1
S+RFd1M	60,5	25,1	6,7	7,6
S+RFd2 M	68,0	19,7	7,4	5,0

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . M ( mulching).

Esta técnica de espectroscopia de RMN nos ha permitido comprobar los cambios en la composición química y estructural de los AH de los suelos. La contribución más significativa de las enmiendas orgánicas a la composición de los AH del suelo original es la incorporación de compuestos de carácter alifático y residuos proteínicos que se incrementa en estos suelos enmendados. Este hecho ya fue anteriormente observado por Adani et al., (2005) al incorporar lodo en dosis bajas ( $1 \text{Mg}$  de materia seca  $\text{ha}^{-1}\text{año}^{-1}$ ) a los suelos durante 10 años así como por Fernández et al., (2008) al incorporar lodos a los suelos durante tres años. Vemos también que con respecto a los compuestos más estables (aromáticos, etc) 5 años después de la enmienda todos los AH de los suelos enmendados presentan una composición química similar pero presentando todos ellos menor proporción de compuestos aromáticos que los AH del suelo control.

Con respecto a la incidencia del tipo de enmienda empleado (residuo fresco o compostado), se observa que la estructura química de los ácidos húmicos de los suelos enmendados con RF y la de los AH de los suelos enmendados con compost no son tan distintas, cómo cabría esperar, lo cual puede ser debido a que en el tiempo transcurrido desde la aplicación de la enmienda el residuo fresco ha sufrido una intensa mineralización, lo que se traduce en una maduración y estabilización, al menos parcial, de la materia orgánica que aporta. En cuanto a la dosis, como ya encontraron otros investigadores (Fernández et al., 2008) no se aprecia diferencias significativas entre dosis.

Vemos así que la aplicación de enmiendas orgánicas de origen urbano a los suelos semiáridos puede incrementar la cantidad de ácidos húmicos en los suelos, contribuyendo de este modo a la fijación química de carbono en estos suelos, incrementando así su calidad; estos AH resultan enriquecidos en estructuras más alifáticas.

#### *Conclusiones parciales:*

*Los resultados obtenidos indican que la composición elemental y estructura química de los ácidos húmicos de los suelos enmendados son diferentes a las de los AH del suelo de partida. En general, los AH de los suelos enmendados presentaron mayores contenidos de H, N y S que los AH del suelo control, así como menor contenido de O y menores valores de la relación O/C. Los espectros IR-TF han mostrado una mayor intensidad de absorción en las bandas correspondientes a grupos alifáticos, grupos amida-carboxílicos y a estructuras polisacáridas, y una menor absorción para las bandas correspondientes a los grupos carbonilos y carboxílicos que los AH del suelo control. Estos resultados se han confirmado mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN ya que estos espectros mostraron un claro incremento de compuestos alifáticos en los AH de los suelos enmendados en relación a los AH del suelo control, mientras que la señal correspondiente a los grupos aromáticos era menos intensa.*

*En cuanto a la incidencia de la naturaleza, dosis o manejo de la enmienda aplicada, vemos que los resultados no se ven muy influenciados ni por la madurez de la enmienda, ni por la dosis o el tipo de manejo. Aunque autores como Senesi et al., (2007) encontraron que el factor que mayor diferencias establecía entre los AH era la procedencia de la enmienda, en nuestro caso, al tratarse de un experimento a largo plazo, la enmienda que inicialmente fue incorporada en estado fresco ha tenido tiempo suficiente para sufrir en el suelo procesos de mineralización y humificación que han transformado su naturaleza, provocando que la contribución de esta enmienda a los ácidos húmicos del suelo no sea demasiado diferente a la encontrada cuando se incorpora la enmienda compostada.*

*En conclusión, la adición de las enmiendas orgánicas al suelo incrementa el contenido de ácidos húmicos del suelo, favoreciendo que grupos alifáticos, polisacáridos y estructuras de lignina así como grupos que aportan S y N se incorporen a dichos ácidos húmicos, modificando su composición elemental y estructura química. Sin embargo, 5 años después de la incorporación de la enmienda, las diferencias entre los AH del suelo de partida y los AH de los suelos enmendados no son muy marcadas, lo que nos hace intuir una tendencia de estos “nuevos” AH a igualarse a los del suelo de origen, contribuyendo de este modo a mejorar la calidad del suelo al que se añaden y a incrementar el “pool” de carbono estable en el suelo.*

### **Incidencia de las enmiendas en la formación a largo plazo de complejos humus-enzima**

#### **Caracterización de los complejos humus-enzimas como indicadores de los cambios en la calidad del suelo**

Las poblaciones microbianas y las actividades enzimáticas de esta comunidad juegan un papel muy importante en la fertilidad y calidad de los suelos, ya que son ellos los que transforman la materia orgánica y los nutrientes convirtiéndolos en biodisponibles (Nannipieri et al. 1990). Las enzimas extracelulares que persisten en estado activo en el suelo pueden ser estabilizadas por asociaciones físicas o químicas con los coloides orgánicos e inorgánicos del mismo (Ladd & Butler, 1975).

La adsorción de enzimas y otras proteínas en arcillas ha sido estudiada desde hace muchos años (Ensminger & Gieseking, 1939; McLaren, 1954; Esterman et al., 1959). Posteriormente, los investigadores consideraron la participación de la materia orgánica en la adsorción mediante la formación de complejos humus-enzima por uniones covalentes durante la formación del polímero húmico o por uniones iónicas o de puente de hidrógeno al polímero ya formado (Ladd & Butler, 1975). En la actualidad, los complejos humus-enzimas se consideran de gran importancia en la fertilidad del suelo ya que representan el “punto de cruce” entre el mineral y las reacciones orgánicas en el suelo (Ceccanti et al., 1994b).

La ventaja de estas enzimas estabilizadas en los complejos humus-enzima en comparación con las enzimas libres radica en que presentan capacidad funcional incluso cuando las condiciones del suelo son prohibitivas para la vida microbiana, como suele ocurrir en los suelos degradados o estresados. Además, estas enzimas extracelulares inmovilizadas son más resistentes a la degradación proteolítica y/o a tensiones químico-físicas (Nannipieri et al., 1996). Por otra parte, la actividad de las enzimas inmovilizadas muestran una alteración en el comportamiento catalítico presentando una reducción de la actividad al producirse la inmovilización de la enzima, lo cual puede ser debido a un posible cambio conformacional que se presenta dentro de la estructura terciaria de la proteína después de la inmovilización. La menor actividad de estas enzimas puede deberse a que el enlace formado en los complejos humus-enzima puede involucrar grupos que son parte de los sitios activos, lo que puede limitar la penetración del sustrato dentro del sitio activo, especialmente cuando el sitio activo de la enzima se orienta hacia el soporte; en otras palabras, el sitio activo puede ser parcial o totalmente inaccesible al sustrato (Gianfreda & Bollag, 2002).

Mientras los análisis de las enzimas en el suelo pueden ser fácilmente realizados mediante medidas de su actividad, la determinación directa de las actividades extracelulares de estos complejos coloide-enzima es más difícil de medir debido a la necesidad de seleccionar un extractante adecuado y a la presencia de interferentes. El pirofosfato de sodio en condiciones neutras es el extractante preferido para extraer la materia orgánica del suelo con el fin de, estudiar las enzimas extracelulares estabilizadas en los complejos húmicos (Masciandaro & Ceccanti, 1999; Clapp & Hayes, 1999; Ceccanti & Masciandaro, 2003).

El aporte de enmiendas orgánicas, ya sean frescas o compostadas, al suelo contribuye, a diferentes niveles, a la rehabilitación de los suelos por suministrar diferentes sustratos (Brookes et al. 2008). La materia orgánica fresca aporta sustratos fácilmente biodegradables por los microorganismos del suelo, mientras que el aporte de enmiendas compostadas o maduras, aporta compuestos polimerizados más recalcitrantes, los cuales pueden ser más fácilmente incorporados dentro de las sustancias húmicas de los

suelos. Sin embargo, el uso de la materia orgánica como una fuente de enzimas inmovilizadas, para mejorar la calidad del suelo, es una línea todavía poco estudiada (Moreno, et al., 2007).

Con este estudio hemos pretendido profundizar en el papel que juegan las enmiendas orgánicas en la inmovilización de las enzimas extracelulares ya que al aportar grandes cantidades de sustratos con las mismas, que estimularán la actividad microbiana, así como de enzimas libres, incrementará la cantidad de enzimas en el suelo, las cuales tienen la posibilidad de encontrar sitios de unión y ser absorbidas e inmovilizadas en el coloide húmico del suelo. Asimismo, pretendemos establecer si una mayor dosis de enmienda lleva aparejada un incremento proporcional en la cantidad de enzima inmovilizada o por el contrario, se produce una saturación en los puntos de unión con el coloide orgánico para la formación de los complejos humus-enzima.

Los análisis específicos de enzimas hidrolasas implicadas en los ciclos del C, P y N ( $\beta$ -glucosidasas, fosfatasas y glicina aminopeptidasa, respectivamente), junto con la actividad de la enzima polifenol oxidasa (ciclo del C), se han utilizado para comparar la actividad bioquímica del complejo humus-enzimas en los suelos enmendados y el control. La enzima  $\beta$ -glucosidasa, que es activa en los últimos pasos de la degradación de la celulosa a glucosa, es fundamental en el ciclo del carbono y para el suelo en general. Busto y Pérez-Mateos (1995) demostraron que esta enzima se estabilizaba en el suelo por la asociación con los materiales húmicos.

La enzima fosfatasa hidroliza ésteres orgánicos de P, por lo que es la responsable de la producción de P inorgánico asimilable por las plantas. Con respecto a la polifenol oxidasa (PPO), esta enzima es clave para controlar la dinámica del carbono debido a su participación en las reacciones de humificación y despolimerización (Freeman, 2004), mientras que la enzima glicina aminopeptidasa cataliza la degradación de proteínas.

Las actividades enzimáticas de las enzimas inmovilizadas en las sustancias húmicas se midieron en los extractos de pirofosfato ( $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7$ , 0,1M, pH 7,1) con el fin de evaluar la intensidad de la actividad bioquímica de la fracción húmica de la materia orgánica del suelo. Según algunos autores (Masciandaro & Ceccanti, 1999; Benítez et al., 2005) la determinación de la actividad enzimática inmovilizada en suelos con diferentes contenidos en materiales orgánicos podría servir como un simple índice de calidad del suelo. También se ha estudiado el comportamiento de la actividad enzimática inmovilizada específica la cual se obtiene mediante el cociente entre la actividad enzimática inmovilizada y el carbono presente en el extracto de pirofosfato.

Debido a que el experimento trata de profundizar en el comportamiento de los complejos humus-enzimas en estos suelos, debemos comenzar comentando que como ya se mostró en la Figura 4.2.31 la adición de las enmiendas al suelo provocó un incremento tanto del contenido de SH como de AH y de la fracción soluble a pH2.

El contenido de SH en todos suelos enmendados se vio incrementado con respecto al suelo control, viéndose este aumento afectado tanto por la dosis como por el grado de estabilización de la enmienda orgánica, así, los suelos tratados con compost, material más estabilizado debido al proceso de compostaje sufrido, presentaban mayores contenidos de SH que los tratados con residuos frescos a igualdad de dosis. Asimismo, independientemente del modo de aplicación de la enmienda, se observó un incremento del

contenido de ácidos húmicos significativamente mayor en los suelos tratados con la dosis más alta de enmienda (Figura 4.2.27).

Cabe destacar que el comportamiento de esta fracción de carbono es igual al presentado al estudiar el carbono orgánico total del suelo completo (Figura 4.2.19).

Como ya se comentó anteriormente, 5 años después de la adición de la enmienda, en los suelos con incorporación de la enmienda en la capa arable se apreciaban valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa en los significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) a los del suelo control, a excepción del tratamiento S+RFd2 que presentaba valores de actividad semejantes a los del control (Figura 4.2.32), sin que se apreciaran diferencias significativas entre los suelos tratados con compost, a ambas dosis, y los suelos tratados con RFd1. En cambio, cuando la adición se había realizado mediante mulching en suelos tratados con RC la actividad  $\beta$ -glucosidasa incrementaba significativamente con la dosis, mientras que en los tratados con RF la actividad no se diferenciaba de modo significativo de la del control, siendo la actividad del tratamiento S+RFd2 inferior a la del tratamiento S+RFd1, aunque no de modo significativo, poniendo de relieve un efecto negativo del aumento de la dosis en los tratamientos con RF (Figura 4.2.32).

Sin embargo, la actividad  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada sí presentaba a los 5 años de la adición de la enmienda diferencias significativas en función de la dosis de aplicación (Figura 4.2.32) mostrando los suelos tratados a d2 mayores valores de actividad que los tratados a d1. Todos los suelos enmendados, independientemente del modo de aplicación de la enmienda (incorporación en la capa arable o mulching), mostraban valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada significativamente superiores a los del suelo control, aumentando esta actividad con el incremento de la dosis. El tratamiento con la dosis más elevada de compost (S+RCd2 y S+RCd2M) era el que daba lugar a los mayores valores de actividad, lo cual puede deberse tanto a su mayor contenido de sustancias húmicas como al hecho de que esta fracción de materia orgánica es más estructurada en estos suelos, presentando, por tanto, una mayor capacidad para unirse a la enzima (Moreno et al., 2007).

La actividad enzimática inmovilizada específica expresa la actividad enzimática inmovilizada por unidad de C de sustancia húmica; mediante la determinación de la actividad específica podremos establecer no sólo que tratamiento da lugar a una mayor inmovilización global de la enzima sino la eficiencia de las sustancias húmicas de ese suelo en la inmovilización de la enzima. Como se observa en la Figura 4.2.32, si bien los suelos enmendados mostraban una mayor cantidad de enzima  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada en relación al control, la actividad inmovilizada específica era en todos los suelos tratados significativamente inferior ( $p \leq 0,05$ ) a la del suelo control. Esto pone de manifiesto que aunque la cantidad de sustancias húmicas es mayor en los suelos tratados, y por tanto aumenta en estos suelos la cantidad total de enzima inmovilizada, la capacidad de estas SH para enlazarse con la enzima es inferior a la de las SH del suelo control, lo cual es atribuible a la mayor cantidad de lugares de enlace que presentan las SH del control al ser un humus más estructurado, con una mayor proporción de grupos carboxílicos, fenólicos y alcohol, tal como se ha puesto de manifiesto en los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los AH de estos suelos. Con respecto a los suelos enmendados se observa que las SH los suelos tratados con RC a la dosis más baja (S+RCd1 y S+RCd1M) presentaban mayores valores de actividad enzimática inmovilizada específica que el resto de los tratamientos, los cuales no presentaban diferencias significativas entre ellos (Figura 4.2.32). El hecho de que la actividad inmovilizada específica en los suelos tratados con compost sea menor a d2 que a d1,

sugiere la existencia de un umbral por encima del cual una mayor cantidad de SH no conlleva una mayor inmovilización de enzima, posiblemente debido a una limitación en la cantidad de enzima presente en el medio.

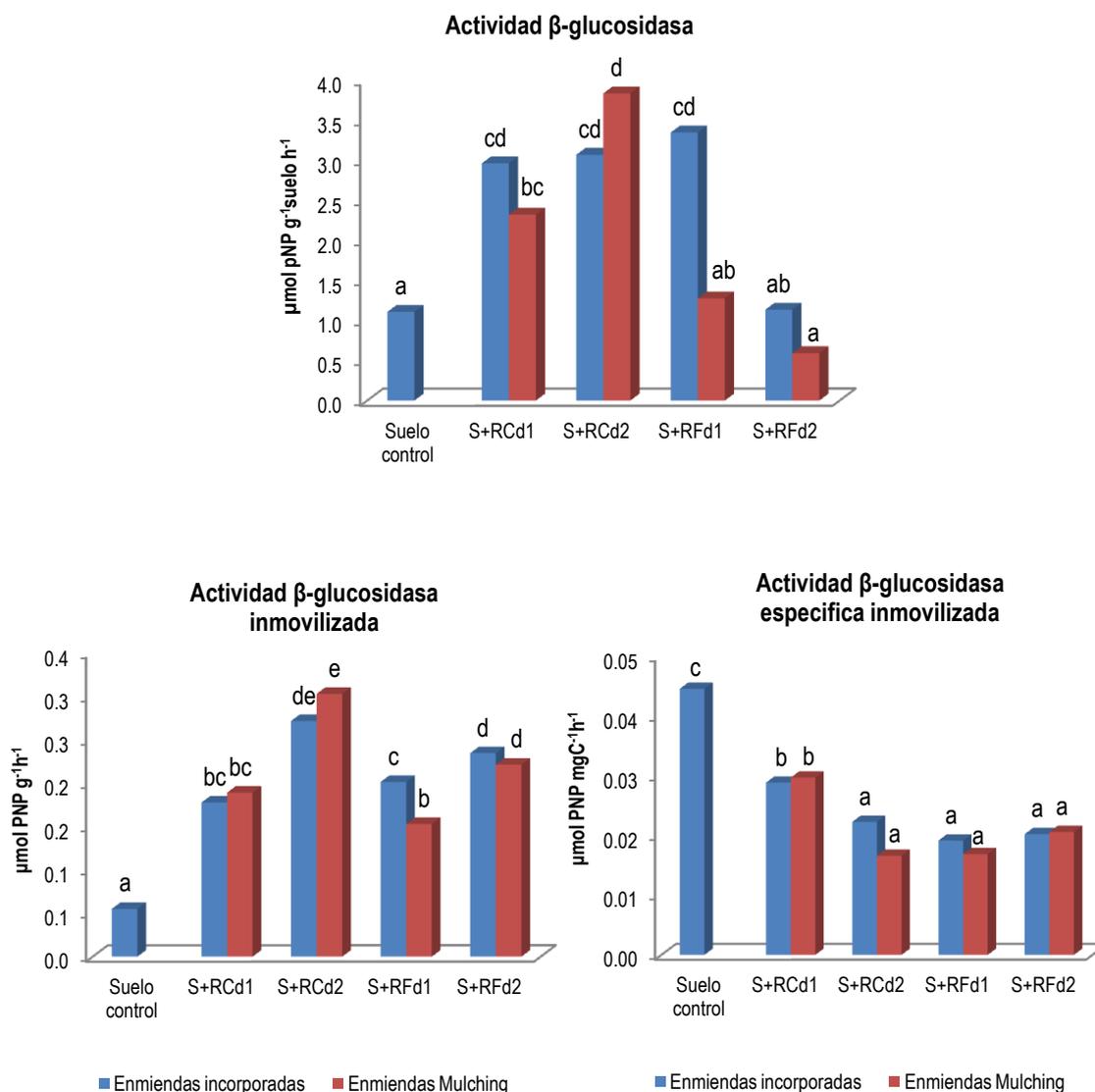


Figura 4.2.32. Actividad  $\beta$ -glucosidasa total, inmovilizada y específica inmovilizada en los suelos enmendados y el control 5 años después de la enmienda. S+ RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Con respecto a las fosfatasa, enzimas sintetizadas por los microorganismos en respuesta a sus necesidades de P inorgánico (Skujins, 1976), se observa, como ya se comentó en su momento, que los suelos tratados con la dosis más elevada de compost eran los que presentaban mayores valores de actividad de esta enzima, lo cual es atribuible a la mayor cantidad de sustratos orgánicos fosforados suministrados con esta enmienda. En relación a la actividad fosfatasa inmovilizada en el extracto de las

sustancias húmicas, se observó que, excepto S+RFd2, todos los suelos enmendados, independientemente del modo de incorporación, presentaban valores superiores al suelo control, no observándose diferencias significativas entre dosis, tipo de enmienda o tipo de manejo. Los incrementos de actividad con respecto al control eran de 97% (S+RCd1), 67% (S+RCd1M), 52% (S+RCd2) 46% (S+RCd2M), 69% (S+RFd1), 104% (S+RFd1M) y 90% (S+RFd2M) (Figura 4.2.33).

Con respecto a la actividad fosfatasa específica inmovilizada se observa un comportamiento análogo al presentado por la actividad  $\beta$ -glucosidasa, donde en los suelos enmendados los mayores valores los presentó el tratamiento S+RCd1 mientras que el resto de tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos (Figura 4.2.33).

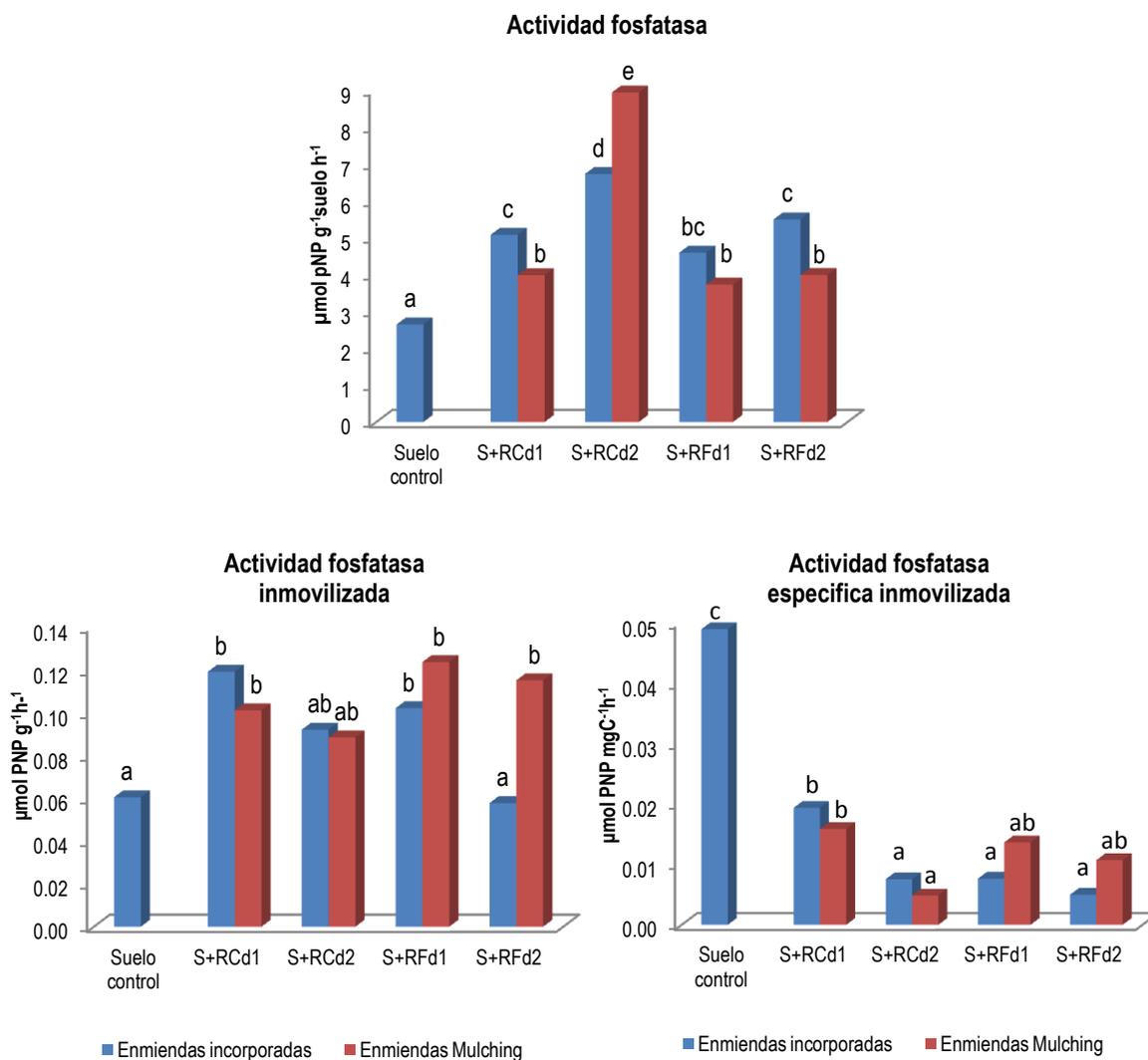


Figura 4.2.33. Actividad fosfatasa total, inmovilizada y específica inmovilizada en los suelos enmendados y el control 5 años después de la enmienda. S+ RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

En la actividad fosfatasa total se observaba un incremento de actividad en todos los suelos enmendados. Diferentes estudios han mostrado que esta enzima aumenta cuando mejora el contenido de materia orgánica del suelo (García-Gil et al., 2004b; Antolín et al., 2005) o cuando aumentan los requerimientos de P por parte del cultivo y de los microorganismos (Böhme & Böhme, 2006), mientras que disminuye si la disponibilidad de fósforo es elevada (Lalande et al., 2000; Bol et al., 2003). En nuestro caso los mayores valores de actividad fosfatasa se observaban en los suelos tratados con compost a la dosis más alta tanto cuando la enmienda había sido incorporada al suelo como cuando había sido añadida en mulching. Sin embargo, este comportamiento no se apreciaba en la actividad inmovilizada donde todos los tratamientos (excepto S+RFd2) mostraban valores semejantes de actividad. Pascual et al., (2002) observaron mayor actividad enzimática inmovilizada tras la incorporación de residuos frescos que tras la aplicación de compost en los suelos, apreciándose posteriormente un decrecimiento en el valor de esta actividad para los suelos enmendados con residuo fresco, mientras que tras 1 año, los suelos enmendados con compost no habían sufrido este decrecimiento. Pero teniendo en cuenta que en nuestro caso se trata de un experimento de campo, con continua aportación de vegetación a los suelos, podemos achacar la similitud encontrada para la actividad fosfatasa inmovilizada en los suelos tratados con RC y RF, al aporte de la vegetación espontánea. Otros autores (Bastida et al., 2008b) ya habían encontrado previamente una correlación entre la vegetación y la actividad de las enzimas inmovilizadas, incluso 17 años después de la incorporación de la enmienda.

Como ya se indicó al comentar la actividad ureasa, los suelos presentaban, tras 5 años de la incorporación de la enmienda, valores similares o ligeramente inferiores al del suelo control en todos los casos, no presentando importantes diferencias de comportamiento para los dos tipos de manejo realizados, excepto para S+RCd2, donde los suelos tratados mediante incorporación de la enmienda presentaban valores significativamente inferiores a los tratados en mulching e inferiores a los del suelo control (Figura 4.2.34). Para la actividad de la enzima ureasa inmovilizada, al igual que para la actividad ureasa específica inmovilizada, no se detectó actividad, ni en el suelo control ni en los suelos tratados con compost. Solo los suelos tratados con RF presentaron cierta actividad, siendo una actividad muy baja en comparación de la actividad de la ureasa total (2.3% para S+RFd2 y >1% para S+RFd1) (Figura 4.2.34). Un comportamiento similar presentaron las parcelas tratadas con mulching donde los valores fueron muy bajos para todos los tratamientos.

Los motivos del comportamiento mostrado por la actividad ureasa en los suelos enmendados presentando valores bajos pueden ser diversos, podría deberse a la existencia de un gran contenido de amonio por el aporte de enmiendas orgánicas, lo que haría innecesaria la síntesis de la enzima, podría también deberse a una inhibición debida a la presencia de metales pesados, o podría deberse a la no existencia de sustratos capaces de activar la síntesis de la enzima. Debido al tiempo transcurrido y al ser posible descartar una inhibición por una excesiva presencia de metales pesados en el suelo, la opción más lógica es la disminución de los sustratos específicos capaces de activar la síntesis de la enzima.

Algunos autores han observado también bajos niveles de actividad ureasa en los extractos de pirofosfato sódico atribuyéndolo a una posible inactivación de la ureasa por los compuestos fenólicos (Nannipieri et al., 1974, Moreno et al., 2007). Burns (1986) indicó que los bajos valores de actividad ureasa inmovilizada

pueden estar relacionados con el hecho de que los componentes aromáticos del humus inhiban la formación de complejos con las enzimas ureasa (Burns 1986).

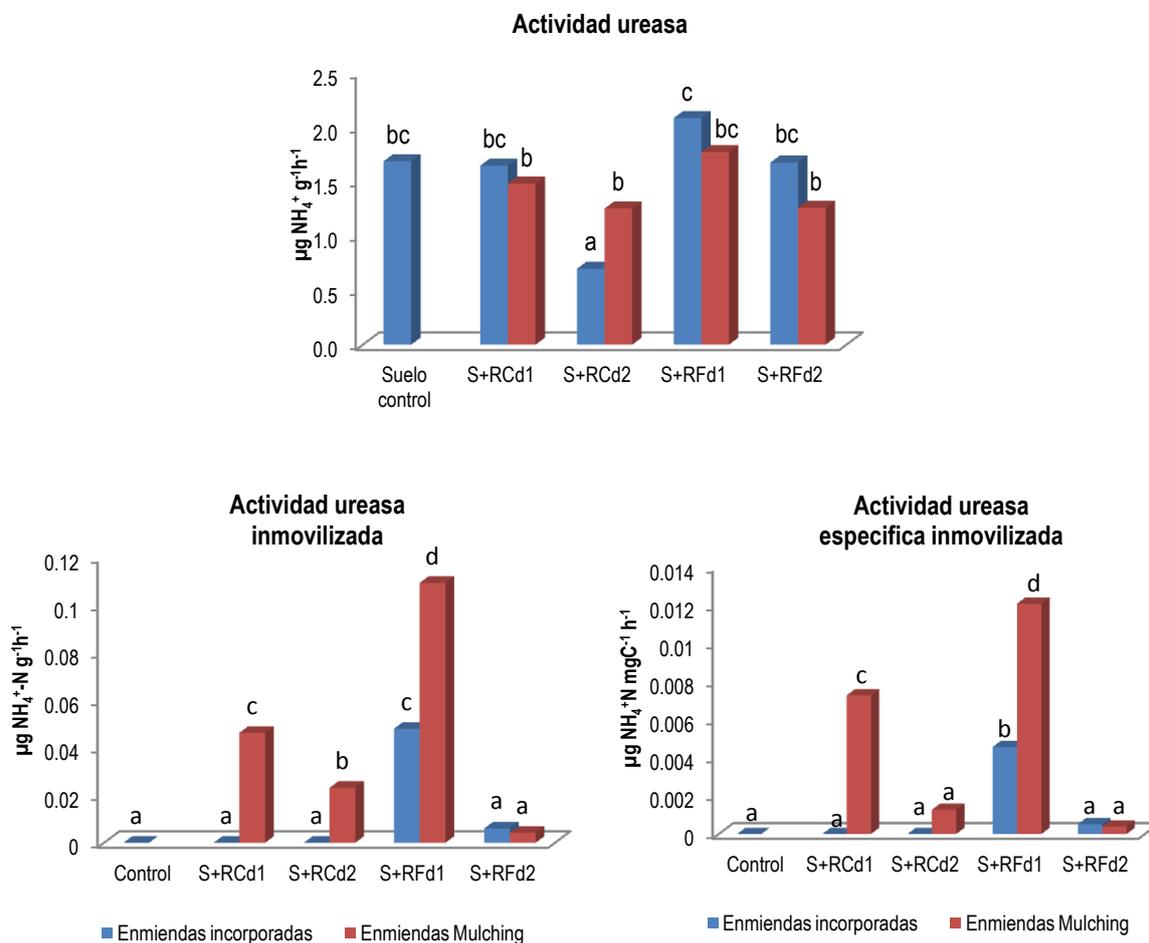


Figura 4.2.34. Actividad ureasa total, inmovilizada y específica inmovilizada en los suelos enmendados y el control 5 años después de la enmienda. S+ RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Los suelos tratados presentaban valores de actividad total de la enzima polifenoloxidasa semejantes a los del suelo control e incluso inferiores, cuando las enmiendas fueron incorporadas mediante mulching, excepto para el tratamiento S+RCd1 con incorporación de la enmienda cuya actividad polifenol oxidasa era significativamente mayor que la del suelo control (Figura 4.2.35). Por otra parte vemos que la actividad de esta enzima en los extractos de pirofosfatos presentaba mayores valores para los suelos enmendados que para el suelo control. Los valores presentados por esta actividad en ambos tipos de manejo del suelo (incorporación y mulching) fueron prácticamente iguales, presentando todos los tratamientos valores semejantes de actividad polifenol oxidasa inmovilizada, a excepción del tratamiento con compost a la dosis más alta que presentaba, para ambos tipos de manejo, los valores más bajos de actividad. Con respecto a la actividad polifenol oxidasa inmovilizada específica, se observó una tendencia similar a la observada para

la actividad  $\beta$ -glucosidasa y fosfatasa, donde el tratamiento S+RCd1 presentaba mayores valores de actividad específica que el resto de los tratamientos (Figura 4.2.35).

Estos resultados coinciden con los encontrados por Moreno et al. (2007), los cuales observaron valores semejantes de actividad polifenol-oxidasa inmovilizada en suelos enmendados con lodo y fracción orgánica de residuos de origen doméstico en sus estados fresco y compostado.

El aumento de la actividad polifenoloxidasa inmovilizada en los suelos enmendados favorecerá los procesos de humificación en estos suelos degradados.

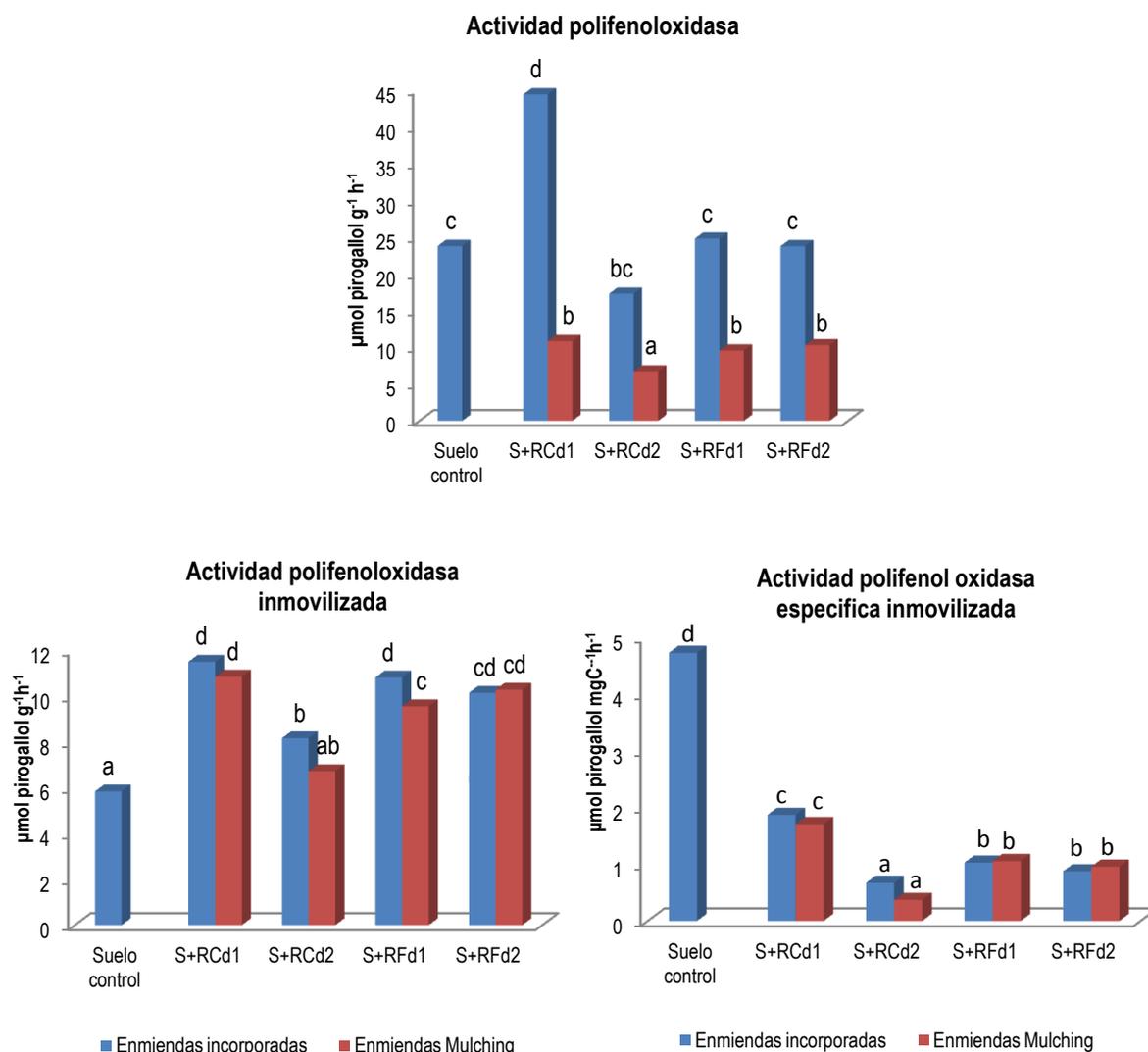


Figura 4.2.35. Actividad polifenoloxidasa total, inmovilizada y específica inmovilizada en los suelos enmendados y el control 5 años después de la enmienda. S+ RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey (P ≤ 0,05).

Con respecto a la glicina aminopeptidasa inmovilizada el comportamiento fue el opuesto al presentado por la actividad polifenol oxidasa, presentando los suelos enmendados con compost a la dosis más alta

(S+RCd2 y S+RCd2M) los valores más altos de actividad, independientemente del modo de aplicación de la enmienda (incorporación o mulching). En ambos tipos de manejo los suelos tratados con RF presentaban valores de actividad, para la misma dosis, significativamente inferiores a la de los suelos tratados con compost d1. Para la actividad glicina aminopeptidasa inmovilizada específica, los mayores valores se presentaron en los suelos enmendados con compost presentando los mayores valores los tratamiento S+RCd1M y S+RCd2 y siendo los suelos enmendados con RF los que presentaron los menores valores (Figura 4.2.36).

Vemos así que esta actividad glicina aminopeptidasa, la cual cataliza la degradación de proteínas, mostraron los mayores valores para los suelos enmendados con compost, los cuales son ricos en compuestos proteínicos (Moreno et al., 1996). La mayor presencia de estos compuestos ricos en N probablemente proporcionen una fuente de N para los microorganismos productores de glicina aminopeptidasa (Christensen, 1995; Chevallier et al, 2003; Allison & Jastrow., 2006).

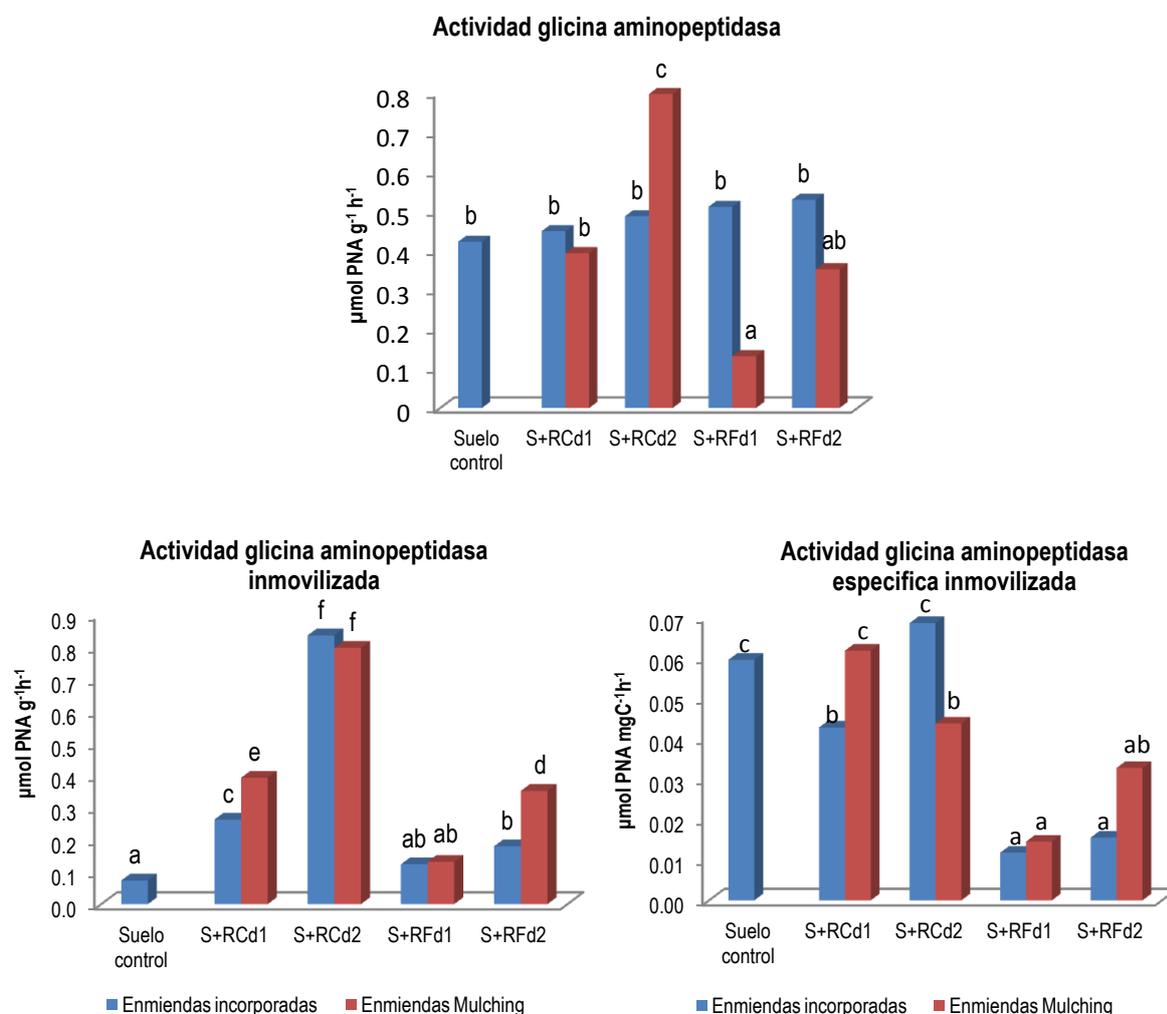


Figura 4.2.36. Actividad glicina aminopeptidasa total, inmovilizada y específica inmovilizada en los suelos enmendados y el con años después de la enmienda. S+ RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey (P≤ 0,05).

Según Burns (1982), las actividades enzimáticas determinadas en los suelos pueden ser debidas al resultado de diferentes actividades asociadas con factores bióticos y no bióticos. Las enzimas unidas a los coloides húmicos (enzimas inmovilizadas) podrían tener un importante efecto ecológico en la calidad del suelo (García et al., 1993). En nuestro experimento, se ha observado que, de forma general, las actividades de las enzimas inmovilizadas medidas han sido mayores en los suelos enmendados que en el suelo control. Este comportamiento coincide con lo observado por Bastida et al. (2008b) quienes encontraron valores superiores de actividades inmovilizadas tras 17 años de haber incorporado diferentes dosis de la fracción orgánica de residuos de origen doméstico a un suelo degradado.

Cabe destacar que tanto para la  $\beta$ -glucosidasa, como para la glicina aminopeptidasa, los mayores valores para las actividades enzimáticas inmovilizadas fueron presentados por el compost en dosis alta, mientras que para la actividad polifenoloxidasa el tratamiento con compost en dosis baja fue que el mostró mayor actividad, presentando estas actividades mayores valores en estos tratamientos, independientemente del tipo de manejo usado para su incorporación.. Cabe destacar que para la actividad ureasa, el mayor incremento se produjo en los suelos enmendados con RF en dosis baja, en contraste con lo encontrado por autores como Bastida et al. (2012), quienes encontraron tras una incubación de 1 año que los suelos enmendados con composts de lodos de depuradora y de fracción orgánica de residuos domésticos presentaban mayores valores de actividad ureasa que los suelos enmendados con estos residuos frescos.

Hay que tener en cuenta que el carácter más estable de la materia orgánica del compost ha determinado la existencia de menores pérdidas de carbono por mineralización y que los cambios sufridos por los compuestos carbonados en los suelos tratados con compost han favorecido la formación de una materia orgánica más estructurada con un mayor número de posibles puntos de unión con la enzima. En este sentido, las actividades enzimáticas específicas (actividad enzimática por unidad de carbono) en general presentaron la misma tendencia que se observó para las enzimas inmovilizadas, apuntando también hacia la importancia de la calidad de la enmienda empleada en relación a la cantidad de enzima inmovilizada.

Debemos tener en cuenta que en los 5 años transcurridos desde la incorporación de la enmienda, ha tenido lugar un importante desarrollo de vegetación en las parcelas enmendadas, actuando los exudados radiculares de estas plantas junto con los restos vegetales como sustratos enzimáticos, estimulando la síntesis de enzimas. Por tanto, los restos vegetales pueden contribuir, en una escala larga de tiempo, a aumentar el "pool" de enzimas que podrían estar enlazadas con las sustancias húmicas o a los coloides inorgánicos del suelo. En este experimento a medio plazo se ha puesto de relieve la existencia de una correlación significativamente positiva entre el contenido de C y la cobertura vegetal. Es obvio que el incremento de la cubierta vegetal en las parcelas como consecuencia de la enmienda habrá contribuido al incremento de carbono orgánico y sustancias húmicas en dichos suelos.

Bastida et al. (2006) observaron asimismo, una correlación positiva entre la actividad enzimática total y el estado de la cobertura vegetal. Posteriormente, Bastida et al., (2008b) encontraron que las diferentes actividades enzimáticas estudiadas en los extractos de pirofosfato también incrementaban en paralelo con la cobertura vegetal, con una positiva y significativa correlación entre ambos parámetros. Por otra parte, como ya hemos comentado, Bastida et al. (2012) encontraron en un experimento de incubación de un año en ausencia de planta, que la actividad  $\beta$ -glucosidasa y ureasa inmovilizada no aumentaba

significativamente con respecto al suelo control, lo que podría refrendar el importante papel jugado por la vegetación en el proceso de inmovilización de enzimas.

No se ha observado la existencia de proporcionalidad entre la cantidad de enzima inmovilizada y la dosis empleada, lo cual sugiere, la existencia de un umbral por encima del cual no se incrementa la inmovilización de enzimas en los suelos. Este umbral no puede ser achacado ni al aumento de la salinidad ni a la presencia de excesivos metales en el suelo ya que como vimos anteriormente los valores presentados no son considerados perjudiciales para los suelos (Tablas 4.2.5; 4.2.6; 4.2.8) (Figura 4.2.4), habría que pensar en una limitación de la cantidad de enzimas extracelulares presentes en el medio y/o en la limitación de los lugares de unión accesibles para las enzimas. Con respecto al tipo de manejo en la incorporación de la enmienda (incorporación a la capa arable del suelo o mediante mulching) cabe destacar que, a este respecto, no se han observado diferencias significativas destacables entre los dos tipos de manejo.

*Conclusiones parciales:*

*Podemos concluir que la adición de enmiendas orgánicas incrementa, en general, la cantidad de enzimas inmovilizadas en el coloide húmico, lo cual puede ser debido a la nueva formación de enlaces entre el nuevo humus generado en los suelos enmendados y las enzimas. El tipo de manejo para la adición de la enmienda no parece influir en la inmovilización de las enzimas en el coloide húmico. Contrariamente, los residuos compostados favorecen más que los frescos la inmovilización de las enzimas, mientras que no se ha podido establecer una relación directa entre la dosis de enmienda aplicada y la inmovilización de enzimas, si bien, se ha observado un incremento de la inmovilización de  $\beta$ -glucosidasa y glicina aminopeptidasa con el incremento de la dosis*

*Debido a que estas enzimas inmovilizadas representan un reservorio biológico en el suelo importante puesto que poseen capacidad funcional incluso cuando los suelos se encuentran en condiciones de estrés o desfavorables para la vida microbiana, un incremento en este tipo de enzimas como el presentado por nuestros suelos enmendados supone una mejora en la calidad de los mismos.*

### **Incidencia de las enmiendas en la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas del suelo**

La aplicación de enmiendas orgánicas al suelo no sólo eleva el contenido en carbono orgánico total y sus distintas fracciones, sino que además lleva asociada una serie de efectos sobre la actividad microbiana y su biomasa (Bastida et al., 2008; Tejada et al., 2006; Ros et al., 2003), por lo que generalmente es aceptado que estas enmiendas influyen en la calidad microbiana del suelo. En este sentido, los diferentes materiales orgánicos pueden tener un efecto diferencial en la microbiología del suelo en función de sus características, afectando a la utilización microbiana del carbono contenido en esos materiales (Martens et al., 2000), lo que a su vez podría determinar un desarrollo preferencial de distintos grupos microbianos con mayor adaptación a la enmienda.

Es un hecho ampliamente admitido que la adición de enmiendas orgánicas a un suelo semiárido lleva asociada un aumento en la actividad y el desarrollo microbiano de dicho suelo (Bastida et al., 2008). Sin

embargo, existe poca información sobre el efecto que la aplicación de dosis altas como las aplicadas en este estudio tiene sobre la diversidad funcional y estructural de dicha comunidad microbiana.

La composición o diversidad estructural de la comunidad microbiana viene determinada por la diversidad y abundancia de especies en dicha comunidad. Las medidas de estos parámetros se han utilizado para controlar las alteraciones producidas en la estructura de la comunidad microbiana como consecuencia de cambios ambientales, prácticas de manejo o contaminación (Ovreas, 2000).

La técnica de Ecoplacas Biolog ha sido ampliamente utilizada para el estudio de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidad microbiana (diversidad funcional) y se basa en el establecimiento de la capacidad de las comunidades microbianas del suelo para metabolizar un rango de sustratos de carbono que varían en su complejidad estructural. Otra técnica que resulta de gran interés para describir estas comunidades microbianas del suelo es el análisis del patrón de ácidos grasos de los lípidos polares (PLFA). Los ácidos grasos son derivados de la membrana celular de los microorganismos y, por consiguiente, su presencia en el suelo es un indicador de la existencia de biomasa viable y se consideran biomarcadores de gran utilidad para detectar diferentes grupos de microorganismos (Widmer et al., 2001; Diaz-Raviña & Bääth, 2001).

### **Análisis de la diversidad funcional de las comunidades microbianas del suelo mediante placas Biolog Ecoplate.**

La evaluación de la biodiversidad de las comunidades microbianas sigue siendo una tarea difícil debido a la extensa taxonómica y a dificultades metodológicas. Una alternativa para evaluar la diversidad de estas comunidades microbianas es la realización de un estudio de su diversidad funcional.

La funcionalidad de las comunidades microbianas presente en nuestros suelos puede evaluarse basándose en la habilidad de los microorganismos de la comunidad para utilizar diversas fuentes de carbono (Garland & Mills, 1991). De esta forma, el grado de utilización de diversos sustratos aplicados a una muestra ofrece información sobre las distintas capacidades fisiológicas de los microorganismos que la componen, representando así el perfil fisiológico a nivel de comunidad o CLPP (Community Level Physiological Profile) (Degens & Harris, 1997).

Actualmente existen varios tipos de sistemas comerciales que permiten determinar el CLPP de la comunidad microbiana de una muestra: Biolog y Multi-SIR. Nosotros hemos utilizado en esta tesis doctoral el procedimiento basado en el sistema de identificación "Biolog Ecoplate" para evaluar con rapidez y eficacia la diversidad funcional de las comunidades microbianas existente en los suelos en estudio.

Sin perder de vista las limitaciones que esta técnica conlleva ya que sólo refleja la actividad metabólica "in situ" de la comunidad microbiana del suelo capaz de crecer en un medio artificial, lo cual supone sólo un subconjunto de la comunidad microbiana total (Garland & Mills, 1994; Haack et al, 1995; Tate, 2000, Ros et al., 2008) que frecuentemente representa el 1% de los microorganismos del suelo, esta técnica puede ser utilizada para tener una visión global de la diversidad funcional ya que aporta información útil respecto a la potencial actividad de la comunidad bacteriana que es capaz de crecer sobre el sustrato proporcionado (Braun et al., 2010) y ha sido reconocida como una buena herramienta para la comparación de las comunidades bacterianas de los suelos (Smalla et al., 1998; Ros et al., 2006). No obstante, debido a sus

limitaciones es aconsejable que los datos obtenidos con el estudio del Biolog Ecoplate sean interpretados con cautela y usar siempre acompañados de técnicas complementarias (Ros et al., 2008).

El sistema automatizado para la identificación rápida de microorganismos, Biolog Ecoplate, desarrollado en la década de los 90 consiste en un sistema de microplacas de 96 pocillos, en el que cada uno contiene una fuente única de carbono, nutrientes básicos y un indicador colorimétrico (Garland & Mills, 1991) (Tabla 4.2.17). El indicador colorimétrico que utiliza este sistema es una sal de tetrazolium, la cual es un excelente agente oxidante de NADH. Cuando un organismo responde positivamente a una fuente de carbono presente en el pocillo, este organismo genera NADH como intermediario metabólico que será oxidado por el tetrazolium, el cual pasará al estado reducido. Mientras que la sal de tetrazolium en su forma oxidada es incolora, en su forma reducida es, sin embargo, de coloración rosada. A mayor oxidación de una fuente de carbono, mayor producción de NADH y por lo tanto mayor reducción de tetrazolium y mayor coloración. Respuestas positivas en la microplaca son fácilmente observadas y pueden ser cuantificadas mediante el uso de un espectrofotómetro, por lo que el desarrollo de color dentro de las placas Biolog Ecoplate refleja la potencial actividad de la comunidad bacteriana que es capaz de crecer sobre el sustrato proporcionado (Braun et al., 2010).

Este tipo de placa incluye tres repeticiones de cada sustrato, aumentando la probabilidad de que los perfiles de la comunidad bacteriana a nivel fisiológico generados sean representativos de la muestra de suelo evaluada y sugiere que el número y la diversidad de sustratos en las placas son suficientes para discriminar las comunidades microbianas que se encuentran presentes en muestras medioambientales (Ros et al., 2008).

El procedimiento para esta técnica ha sido explicado previamente en el capítulo de métodos (Determinación de la diversidad microbiana funcional. Biolog Ecoplate).

El tratamiento que se realiza con los datos obtenidos también han sido comentados previamente en el apartado de métodos pero cabe recordar que a partir de las densidades ópticas obtenidas por el lector de placas se realizaron los siguientes cálculos:

Datos transformados (DT)=  $DO_{Tx}-DO_{T0}$ , siendo

T0= lecturas de densidad óptica obtenidas en el momento inicial y que se sustraen de la lectura obtenida para la muestra para eliminar el background generado por el color de los sustratos y suspensión bacteriana.

Tx= lecturas de las densidades para cada uno de los tiempos.

De esta forma se transforman los datos con el fin de evitar resultados negativos.

Datos Normalizados (DN)=  $DT/AWCD$  siendo

DT= Dato transformado.

AWCD (Average Well Colour Development)=  $\Sigma$  densidad óptica de los datos transformados para cada una de las réplicas por tiempo/ 31 ( $n^\circ$  sustratos diferentes de carbono).

**Tabla 4.2.17. Formas de carbón contenidas en las placas Biolog Ecoplate. Fuente: Garland & Mills (1991)**

Agua	beta-metil-D-glucósido	Ác.D-galactónico - gama-lactona	L-Arginina
ácido pirúvico metil éster	D-xilosa	Ácido D-galacturónico	L-Asparagina
Tween 40	I-Eritrol	Ácido 2 hidroxibenzoico	L-Fenilalanina
Tween 80	D-Manitol	Ácido 4 hidroxibenzoico	L-Serina
alfa-ciclodextrina	N-Acetil-D-glucosamina	Ácido gama-hidroxibutírico	L-Treonina
Glucógeno	Ácido-D- glucosamínico	Ácido itacónico	Ácido L-glicil-glutámico
D- celobiosa	Glucosa - 1-fosfato	Ácido alfa- cetoglutámico	Feniletlenamina
alfa-D- lactosa	D,L - alfa - glicerolfosfato	Ácido D-málico	Putrescina

El desarrollo de color medio (AWCD) es la medida de la respuesta media de la comunidad metabólica y se calculó según Garland & Mills (1991). Este valor se utiliza para normalizar los datos y conocer el comportamiento global en la actividad degradativa de los sustratos que componen el Biolog Ecoplate. Además, con ello se consigue minimizar el efecto del inóculo inicial, ya que los parámetros cinéticos no son independientes de las densidades del inóculo y por ello necesitan ser normalizados antes de realizar el análisis estadístico.

Tal como Hackett (1997) observó existe una relación sigmoideal entre las lecturas de densidad óptica a 595nm y el tiempo. Con los datos normalizados (DN) se construye una curva de crecimiento sigmoideal AWCD (para  $\lambda=595$  nm) vs tiempo (hrs). Con las diferentes muestras sometidas a estudio enfrentadas en dicha curva, se pretende encontrar un punto de crecimiento comparable entre ellas. Para ello se escogen valores de AWCD que pueden oscilar entre 0,2-0,6. En nuestro caso el valor de AWCD elegido fue 0,4.

Como se observa en la Figura 4.2.37, los valores de AWCD fueron mayores para los suelos enmendados que para el suelo control, lo que indica una mayor tasa de utilización de sustrato (potencial catabólico) por la comunidad microbiana y una mayor diversidad funcional de estos suelos enmendados respecto al suelo control, presentando los mayores valores el tratamiento S+RCd2 para ambos manejos de incorporación de la enmienda al suelo (incorporación de la enmienda y mulching).

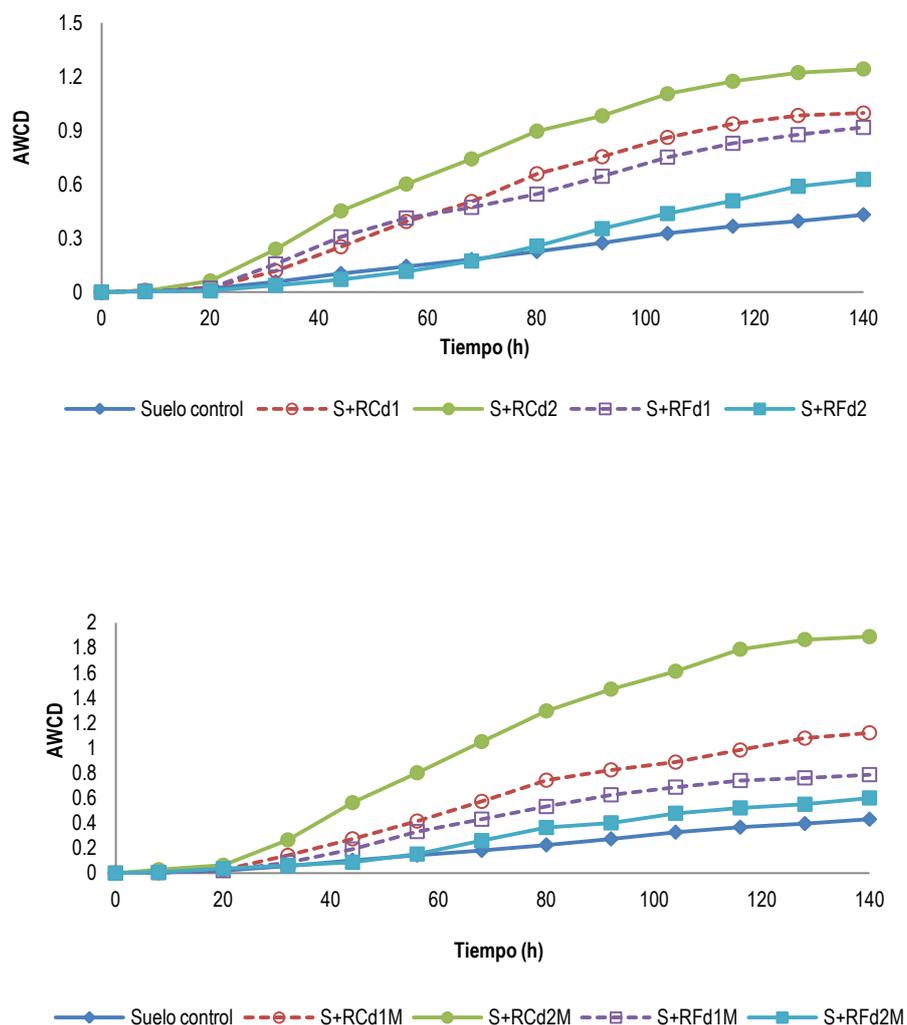


Figura 4.2.37. Representación de la AWCD (Average Well Colour Development) con respecto al tiempo para el suelo control y los suelos enmendados tras 5 años de la incorporación de la enmienda. S+ RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; M: mulching; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3%.

De acuerdo con Weber y Legge (2009) los sustratos situados sobre las placas del Biolog Ecoplate se dividieron en seis grupos principales: ácidos carboxílicos, polímeros, carbohidratos, aminoácidos, compuestos fenólicos y aminas.

Sabemos que las diferencias en la utilización de sustratos carbonados para los diferentes tratamientos muestran las diversas capacidades metabólicas de las comunidades microbianas del suelo (Chakraborty et al., 2011). Comparando la utilización de los diferentes grupos de sustratos carbonados en los suelos enmendados y en el suelo control podremos conocer las preferencias en el consumo de fuentes de carbono por parte de las poblaciones microbianas existentes.

**Tabla 4.2.18. Grupos de sustratos de carbono en las placas Biolog Ecoplate.**

Pocillo	No. ID	Fuente C	Grupo
Pocillo 1	C0	Water (blank)	
Pocillo 2	C1	Pyruvic acid methyl ester	Carbohidratos
Pocillo 3	C2	Tween 40	Polimeros
Pocillo 4	C3	Tween 80	Polimeros
Pocillo 5	C4	Alpha-cyclodextrin	Polimeros
Pocillo 6	C5	Glycogen	Polimeros
Pocillo 7	C6	D-cellobiose	Carbohidratos
Pocillo 8	C7	Alpha-D-lactose	Carbohidratos
Pocillo 9	C8	Beta-methyl-D-glucoside	Carbohidratos
Pocillo 10	C9	D-xylose	Carbohidratos
Pocillo 11	C10	i-erythritol	Carbohidratos
Pocillo 12	C11	D-mannitol	Carbohidratos
Pocillo 13	C12	N-acetyl-D-glucosamine	Carbohidratos
Pocillo 14	C13	D-glucosaminic	ácidos carboxílicos
Pocillo 15	C14	Glucose-1-phosphate	Carbohidratos
Pocillo 16	C15	D,L-alpha-glycerol phosphate	Carbohidratos
Pocillo 17	C16	D-galactonic	ácidos carboxílicos
Pocillo 18	C17	D-galacturonic	ácidos carboxílicos
Pocillo 19	C18	2-Hydroxy benzoic	Compuestos fenólicos
Pocillo 20	C19	4-Hydroxy benzoic	Compuestos fenólicos
Pocillo 21	C20	Gamma-hydroxybutyric	ácidos carboxílicos
Pocillo 22	C21	Itaconic	ácidos carboxílicos
Pocillo 23	C22	Alpha-ketobutyric	ácidos carboxílicos
Pocillo 24	C23	D-malic	ácidos carboxílicos
Pocillo 25	C24	L-arginine	Aminoácidos
Pocillo 26	C25	L-asparagine	Aminoácidos
Pocillo 27	C26	L-phenylalanine	Aminoácidos
Pocillo 28	C27	L-serine	Aminoácidos
Pocillo 29	C28	L-threonine	Aminoácidos
Pocillo 30	C29	Glycyl-L-glutamic acid	Aminoácidos
Pocillo 31	C30	Phenylethylamine	Aminas
Pocillo 32	C31	Putrescine	Aminas

La Figura 4.2.38 representa la utilización de las diferentes fuentes de carbono para cada uno de los seis grupos por parte del suelo control y de los suelos enmendados. Como puede observarse, existen diferencias significativas en relación al consumo de los diferentes sustratos, entre el suelo control y los suelos enmendados, lo que pone de relieve la sensibilidad de las comunidades microbianas a los tratamientos aplicados al suelo.

Así, se observó un mayor consumo de ácidos carboxílicos, carbohidratos y compuestos fenólicos en el suelo control, mientras que la adición de enmienda estimuló, en general, el consumo de polímeros, aminoácidos y aminas, especialmente en el caso de los suelos tratados con compost (Figura 4.2.38).

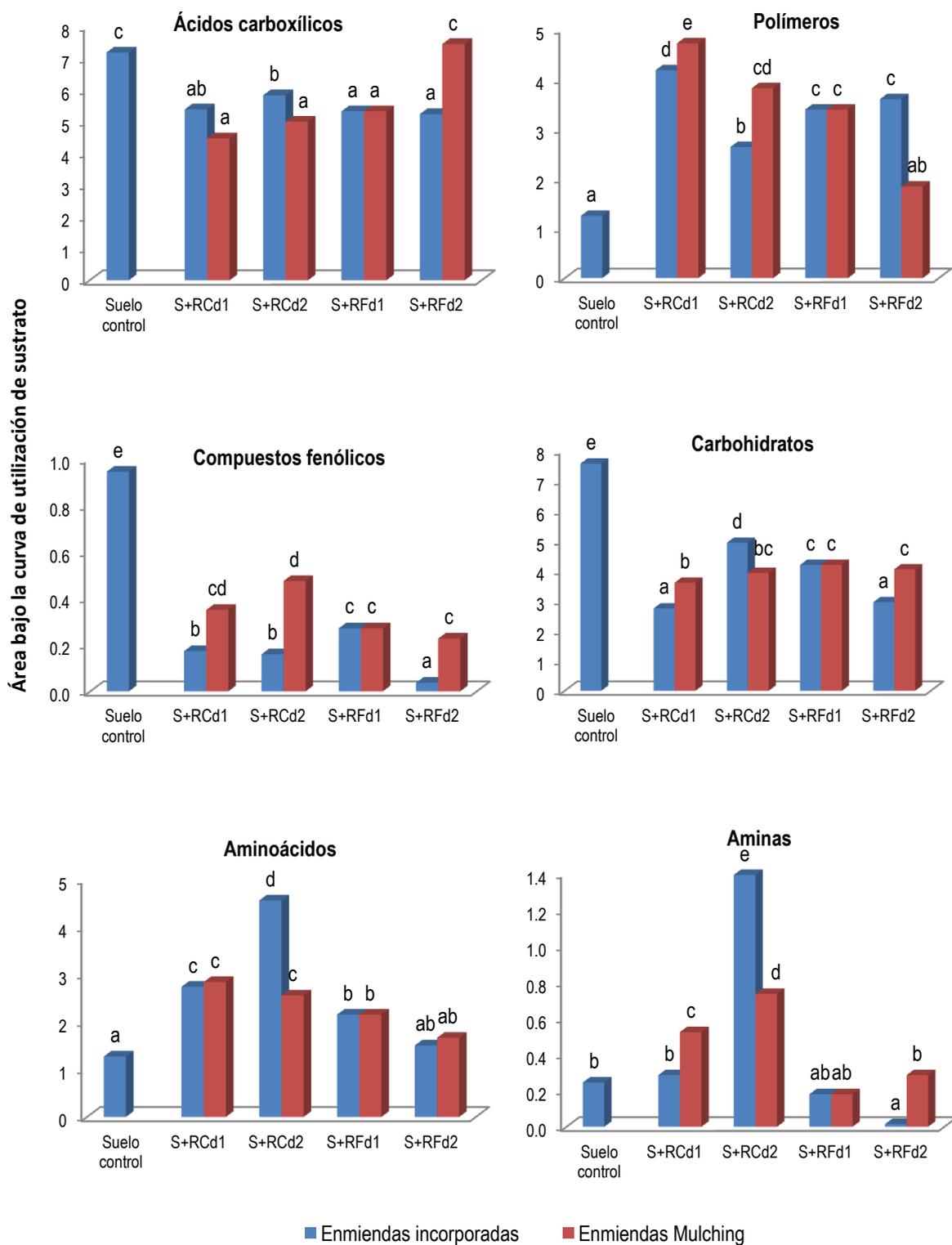


Figura 4.2.38. Cambios en la utilización de los sustratos de Carbono por parte de las bacterias en el suelo control y los suelos enmendados tras 5 años de la incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . Para cada sustrato, la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Anteriormente autores como Nair et al., (2012) encontraron diversidad en el comportamiento en el estudio de la utilización de los sustratos de carbono por parte de los microorganismos del suelo tras incorporar enmiendas a los suelos, presentando distinto comportamiento en cada año de estudio. Así, mientras que Chakraborty et al., (2011) encontraron que el análisis de Biolog presentaba un incremento en la utilización de carbohidratos en los suelos enmendados mientras que polímeros, ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos, aminoácidos y aminas presentaron valores similares o menores que el suelo control, autores como Rashedul et al., (2011) encontraron que carbohidratos, ácidos carboxílicos, aminas y aminoácidos eran más usados que los polímeros en suelos que habían sido enmendados con compost orgánico. Por tanto, vemos que la aplicación de enmiendas en los suelos afecta a la utilización de las diferentes fuentes de carbono por parte de los microorganismos del suelo pero en general, los patrones de comportamiento no han sido del todo clarificantes indicando la complejidad de las comunidades microbianas de los suelos.

Otro indicador que nos aporta información sobre la diversidad funcional de la comunidad microbiana de estos suelos viene dado por el número de diferentes sustratos que son utilizados por la comunidad microbiana. Para ello se calculó el índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ), el cual se emplea para conocer la diversidad en comunidades biológicas. Es un valor que tiene en consideración tanto el número de especies diferentes como el número de individuos que forman las poblaciones de las diferentes especies, dando valores altos cuando la biodiversidad es elevada. Su fórmula tiene la siguiente estructura:

$$H' = -\sum p_i (\ln p_i)$$

Donde  $p_i$  = cociente del valor de absorbancia corregida de cada una de las celdas vs suma de la absorbancia de todas las celdas (este cálculo se realiza con los datos transformados, no con los normalizados).

Su valor nos indica el grado de incertidumbre que existe para predecir la especie a la cual pertenece un individuo extraído aleatoriamente de la comunidad. La elección de este índice es debido a la sensibilidad que presenta frente a los cambios de la abundancia de las especies.

En este caso, se ha utilizado como descriptor de la diversidad metabólica de la comunidad; sustituyendo las especies "biológicas", por las especies químicas (formas de carbono a degradar), y la densidad de individuos por la intensidad de la degradación. Así, índices mayores indicarían la capacidad de degradar muchos sustratos diferentes con mucha eficiencia, y un índice bajo, justo lo contrario. Es decir, mediante el índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ) podemos conocer la cantidad de sustrato consumido por los microorganismos y la equidad de la actividad de todos los sustratos utilizados (Magurran, 1988; Zak et al, 1994).

Como se puede apreciar en la Figura 4.2.39 la enmienda orgánica tuvo un efecto significativo sobre la diversidad funcional, mostrando todos los suelos enmendados mayor índice de diversidad metabólica ( $H'$ ) que el suelo control, excepto S+RFd2 y S+RFd2M, siendo el suelo enmendado con RCd2 el que presentó mayor diversidad funcional para ambos manejos de incorporación de la enmienda.

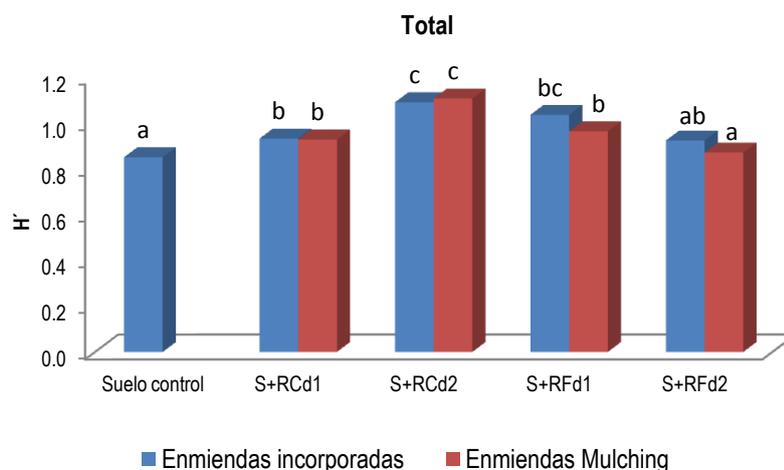


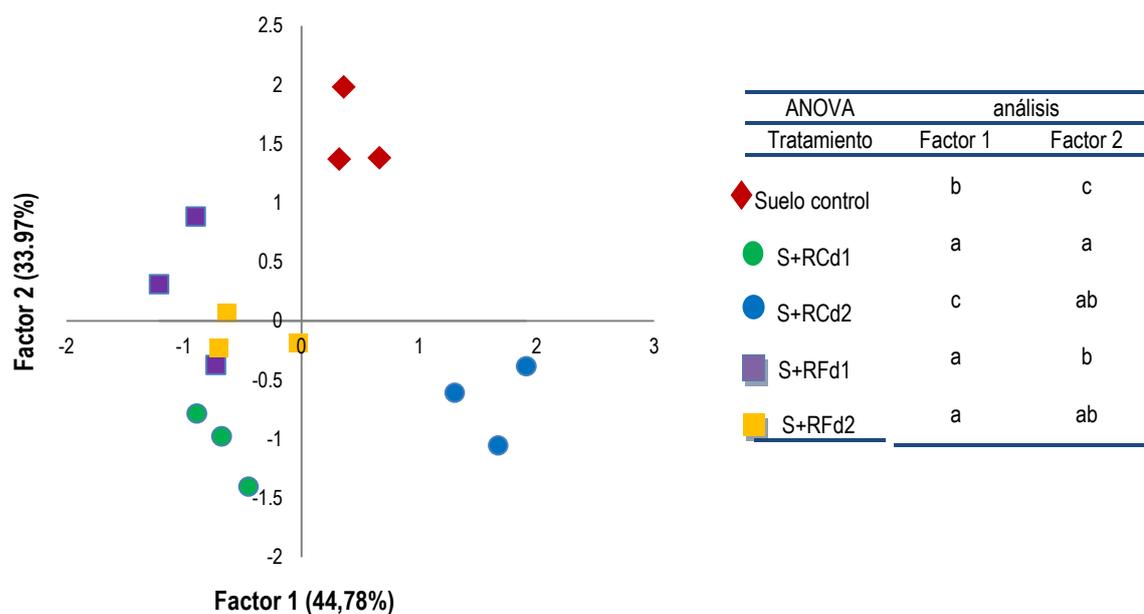
Figura 4.2.39. Índice de la diversidad de Shannon para el suelo control y los suelos enmendados tras 5 años de incorporación de las enmiendas. S+ RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3%. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Vemos así que la diversidad funcional total presentada por los suelos enmendados ha sido superior a la presentada por el suelo control incluso 5 años después de la incorporación de la enmienda. Ros et al., (2006) observaron esta misma tendencia 12 años después de la incorporación de compost a un suelo.

Con el fin de determinar el grado de diferenciación de los tratamientos aplicados a las parcelas se realizó un análisis de factores tanto cuando las enmiendas habían sido incorporadas a la capa arable del suelo como cuando la incorporación se había realizado mediante mulching.

El análisis de factores de los suelos enmendados mediante incorporación en la capa arable del suelo proporcionó dos factores: el factor 1 explicaba el 45% de la varianza observada en los resultados y el factor 2 que explicaba el 34% (Figura 4.2.40). Para el factor 1 el análisis de la varianza (ANOVA) de las coordenadas de ese factor permitió establecer diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre el suelo control y los suelos enmendados. Con el factor 2 el test ANOVA indicó, asimismo, diferencias significativas entre el suelo control y los suelos enmendados pero se encontraron menores diferencias entre los suelos enmendados.

Como se observa en la Figura 4.2.40, el análisis de componentes principales (PCA) discrimina en función al factor 1 entre el suelo control y los suelos enmendados, de forma que permite diferenciar de modo significativo tres grupos de tratamientos, un grupo que abarca únicamente al suelo control, un segundo grupo que incluye los tratamientos S+RFd1, S+RFd2 y S+RCd1, y un tercer grupo con el tratamiento S+RCd2; a su vez, el factor 2 discrimina entre los suelos enmendados y el control. Esto indica que existen diferencias con respecto a la diversidad funcional entre los suelos enmendados con RCd2 y el resto de suelos enmendados, así como entre el control y todos los suelos enmendados. Vemos por tanto que la diversidad funcional microbiana parece verse afectada por la dosis sólo cuando la enmienda es compost, no observándose esta diferencia entre dosis en los tratamientos con RF.



**Matriz de componentes**

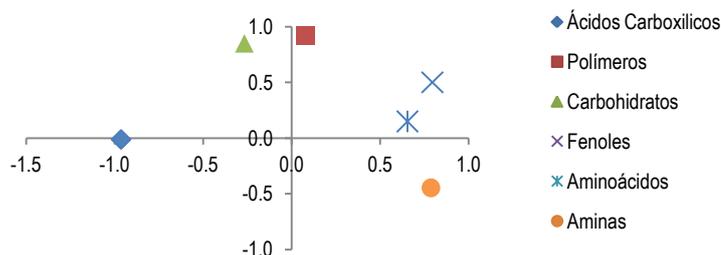
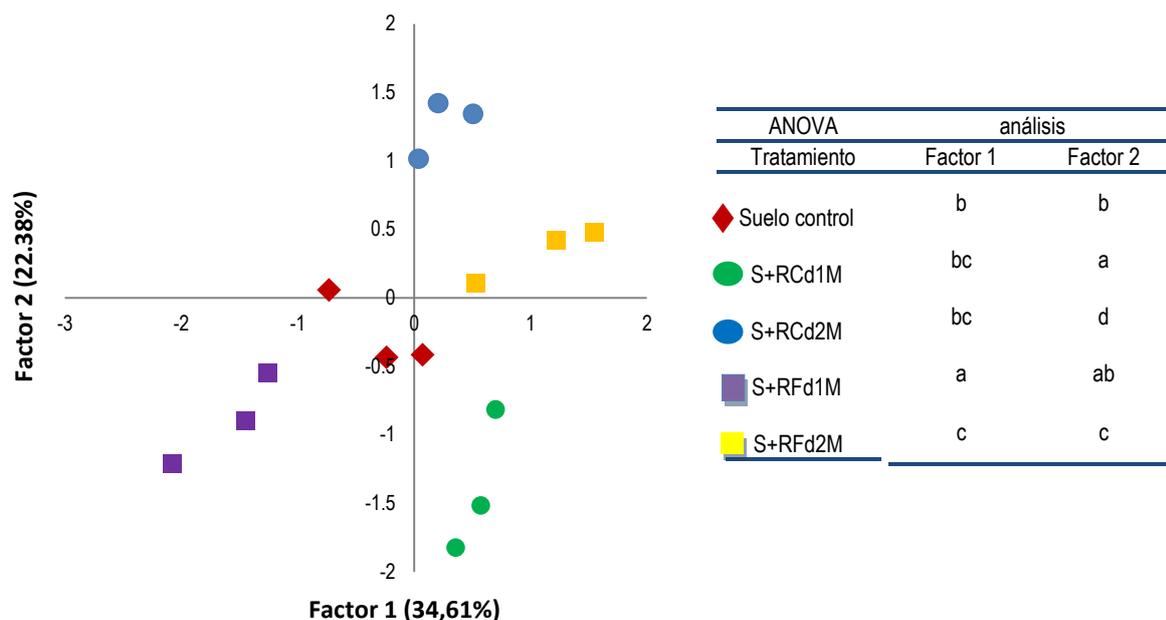


Figura 4.2.40. Análisis de componentes principales del perfil fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) del suelo control y de los suelos enmendados tras 5 años desde la incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada Factor, la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a p≤0,05.

El análisis de componentes principales (PCA) del Biolog Ecoplate del suelo control y de los suelos enmendados donde la enmienda ha sido aplicada en mulching se muestran en la Figura 4.2.41. El factor 1 y 2 explican el 35 y 22% de la varianza, respectivamente. A diferencia de lo presentado por los suelos donde la enmienda había sido incorporada a la capa arable, vemos que para el factor 1, el análisis de la varianza (ANOVA) solo indicó diferencias significativas entre el control y los suelos tratados con RF (S+RFd1M y S+RFd2M), no presentando el resto de muestras grandes diferencias con el control respecto a su diversidad funcional microbiana. Con el factor 2 el test ANOVA indicó diferencias significativas entre el suelo control y los suelos enmendados pero se encuentra menores diferencias entre los suelos enmendados a igualdad de dosis, apreciándose diferencias significativas entre dosis altas y dosis medias.



#### Matriz de componentes

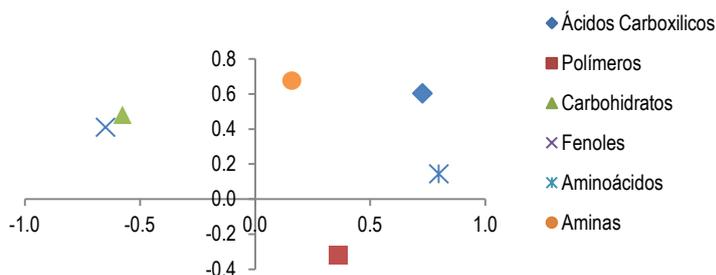


Figura 4.2.41. Análisis de componentes principales del perfil fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) del suelo control y de los suelos enmendados tras 5 años desde la incorporación de la enmienda. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1%  $C_{org}$ ; d2: 3%  $C_{org}$ . M: mulching. Para cada Factor, la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Es ampliamente conocido que el C es el factor clave que gobierna el crecimiento microbiano (Grayston et al. 1998, Hu et al., 2011) y que la adición de enmiendas orgánicas a los suelos es esencial para mejorar el contenido de C en los mismos, lo cual conduce a grandes cambios en la utilización de los sustratos de carbono por parte de los microorganismos (Zhong et al. 2010), favoreciendo la diversidad y actividad de éstos y mejorando la estructura del suelo así como su C orgánico (Albiach et al. 2000). Así, Campbell et al., (2003) indicaron que una baja habilidad de la comunidad microbiana para oxidar diversos sustratos de C es indicativo de una limitada diversidad funcional.

En nuestro estudio hemos visto un incremento en la diversidad funcional de los microorganismos, lo cual puede ser explicado por el incremento y mayor disponibilidad de C en los suelos como consecuencia de la incorporación de enmiendas orgánicas, a su vez esto está en consonancia con lo previamente observado en el aumento de las actividades enzimáticas, las cuales apuntaban a una funcionalidad bioquímica mayor.

Este efecto ha sido anteriormente documentado por otros autores (Gomez et al. 2006, Hueso et al.,2012). También Frac et al (2012) investigaron el efecto en suelos con adición de lodos indicando que la aplicación de estas enmiendas a los suelos promueven la diversidad funcional de la población microbiana del mismo apuntando además a que esta aplicación en el suelo puede ser una oportunidad para su reciclaje en el suelo.

A este incremento de la diversidad funcional habrá contribuido tanto la mayor presencia de compuestos de C aportados por las enmiendas empleadas, como la mayor presencia de exudados radiculares y restos vegetales que presentaron las parcelas enmendadas como consecuencia de la cubierta vegetal desarrollada de modo espontáneo sobre las mismas (Hu et al., 2011). Bending et al. (2000) encontraron que tras adicionar materia orgánica al suelo en un experimento de 16 meses mediante la rotación de cultivos, se produjo un aumento en la disponibilidad de C orgánico soluble, el cual al tratarse de un C fácilmente disponible para la comunidad microbiana producía cambios en los patrones de utilización de los sustratos de C por parte de la comunidad microbiana del suelo. De igual forma, Lupwayi et al. (1998) también encontraron que la rotación de cultivos incrementaba la diversidad microbiana frente al uso continuo de un mismo cultivo, lo cual nos indica que tanto una mayor cubierta vegetal como una mayor diversidad de especies vegetales favorecen una mayor diversidad funcional de la comunidades microbianas de los suelos. Se ha demostrado que la alta diversidad de cultivos puede tener una influencia importante sobre las comunidades microbianas mediante sus diferentes rizosferas. Este fenómeno puede ser debido a la cualitativa y cuantitativa variación de los compuestos de carbono que se incorporan en el suelo (Garland et al., 1996).

Podemos resumir que en nuestro caso los datos indicaron cambios en la diversidad general de los suelos al incorporar enmiendas orgánicas. Autores como (Chakraborty et al., 2011) también encontraron que la aplicación de suplementos orgánicos e inorgánicos a largo plazo ayudaron a la acumulación de materia orgánica en los suelos, lo cual, a su vez tuvo considerables efectos sobre las comunidades microbianas incrementando la biomasa microbiana y la actividad de los suelos.

*Vemos pues, que a largo plazo, la adición inicial de enmienda daba lugar a un aumento de la diversidad funcional de las poblaciones microbianas del suelo. Este incremento de la diversidad funcional se vio influenciado tanto por el tipo de enmienda empleado como por la dosis, observándose el mayor incremento de diversidad funcional cuando se adicionaba compost al suelo a la dosis más elevada, mientras que la aplicación de RF a la dosis más alta ejercía un menor efecto sobre la diversidad microbiana que aplicada a la dosis más baja. En cuanto al tipo de manejo en la incorporación de la enmienda, vemos que cuando el enmendante es compost, no se aprecian diferencias importantes entre ambos tipos de manejo, pero cuando el enmendante es RF, la diversidad funcional de los suelos es mayor cuando se añade la enmienda mediante incorporación a la capa arable del suelo.*

### **Análisis de la estructura de la comunidad microbiana mediante PLFAs**

El suelo es un hábitat complejo, habitado por un gran número de organismos diferentes. Entre éstos, las bacterias y los hongos son los más importantes, ya que son responsables de la gran mayoría de los procesos de descomposición y también constituyen la mayor parte de la biomasa microbiana del suelo

(Schimel, 2001). Muchas de las transformaciones esenciales en los ciclos del nitrógeno, azufre, fósforo y otros elementos están producidas por los microorganismos.

Las bacterias son el grupo de microorganismos más abundante en el suelo y pueden alcanzar concentraciones de más de  $10^8$  células por gramo de suelo (Sylvia et al., 1998), o  $10^{11}$  por gramo de materia orgánica, (Bååth, 1998). La reserva de carbono es generalmente considerada el factor limitante para el crecimiento de la comunidad bacteriana, incluso en suelos con alto contenido de materia orgánica. Sin embargo, también hay estudios que sugieren que el nitrógeno y el fósforo pueden ser limitantes en algunos suelos (Christensen et al, 1996; Duah-Yentumi et al, 1998; Schimel & Weintraub, 2003).

El uso de los ácidos grasos de membrana (PLFA) como una manera de adquirir una visión de la comunidad microbiana en su medio natural ha ido incrementando en popularidad desde sus inicios con los trabajos pioneros de White (1988), y la metodología ha sido adaptada para poder ser utilizada en diferentes hábitats como pueden ser el agua, sedimentos, biofilms, rizosfera y suelo.

Estudios previos han mostrado que ciertos PLFAs son más o menos únicos para cierta taxonomía de grupos (Bååth, 2003). Una de las mayores diferencias entre la composición de los PLFA para los diferentes grupos orgánicos se produce entre las eucariotas y las eubacterias. Es conocido que los PLFA 18:2 $\omega$ 6,9 y 18:1 $\omega$ 9 son comunes en organismos eucariotas tales como los hongos, pero raros en bacterias (Harwood et al., 1984). Por ello, los PLFA 18:2 $\omega$ 6,9 ha sido usado como un indicador de la biomasa fúngica del suelo (Frostegård et al., 1996). Otros PLFA son predominantemente de origen bacteriano, como por ejemplo los ácidos cy17:0 y cy19:0 y varios ácidos grasos ramificados (Zelles, 1999). Sin embargo, algunos PLFAs se ha encontrado que son tan comunes en bacterias como en eucariotas, dependiendo del medioambiente en el que se realice el estudio. El PLFA 16:1 $\omega$ 5 ha sido propuesto como un indicador de biomasa micorrízica (Gormsen et al., 2004) mientras que los PLFAs 15:0 y 17:0 son comúnmente usados como indicadores de bacterias (Frostegård et al., 1996). Hay que tener presente que incluso PLFAs que se asumen como indicadores de un grupo de organismos puede ser encontrado en pequeñas cantidades en grupos completamente diferentes, como por ejemplo con 18:2 $\omega$ 6,9, el cual es encontrado en bacterias en el medioambiente marino (Johns et al., 1977) además de en hongos. Vemos que el hecho de que un importante número de PLFAs participen en la composición de los diferentes organismos hace que la interpretación no sea fácil.

El análisis de PLFA realizado 5 años después de la adición de la enmienda en los suelos en que la enmienda se había aplicado mediante incorporación en la capa arable del suelo, indicó que las enmiendas orgánicas estimulaban la proliferación bacteriana y fúngica (Marschner et al., 2003). Así, en general, se observó, en todos los suelos tratados, un aumento en relación al control de los diferentes ácidos grasos identificados, indicativo de la mencionada proliferación microbiana, siendo en muchos casos las diferencias con el control estadísticamente significativas (Tabla 4.2.19). Hay que destacar que el suelo enmendado con compost a la dosis más alta presentaba, de forma general, los mayores valores para los diferentes PLFAs, siendo las diferencias entre S+RCd2 y S+RFd2 significativas en la mayoría de los casos. Sin embargo, en los suelos enmendados a la dosis más baja (d1), las diferencias entre los dos tipos de enmiendas empleadas eran poco acusadas, no presentando para la mayoría de los ácidos grasos diferencias significativas. El suelo enmendado con la dosis más alta de RF mostró, en contraste con S+RCd2, contenidos de ácidos grasos inferiores en muchos casos a los del suelo enmendado con la dosis más baja

(d1) siendo las diferencias entre dosis incluso estadísticamente significativas en alguno de los casos (Tabla 4.2.19).

Una de las fracciones fúngicas más importantes en la biología del suelo, y sobre todo en relación al desarrollo vegetal, es la correspondiente a los hongos micorrícicos. Los contenidos del ácido graso 16:1 $\omega$ 5, que ha sido propuesto como un indicador de biomasa micorrícica (Olsson, 1999; Gormsen et al., 2004), eran mayores a los del control en todos los suelos enmendados, excepto en los enmendados con RFd2, lo cual coincide con la menor presencia de cobertura vegetal en las parcelas sometidas a este tratamiento. Estos resultados sugieren que el aporte de materiales orgánicos ha estimulado la proliferación de una comunidad más micorrícica y simbiótica con las plantas.

**Tabla 4.2.19. Abundancia de PLFAs individuales en los suelos enmendados y el suelo control tras 5 años de la incorporación de la enmienda.**

PLFA (nmol g <sup>-1</sup> )	Suelo control	S+RCd1	S+RCd2	S+FRd1	S+FRd2
i14	0,59a	1,52b	2,83c	1,42b	1,20ab
14:00	1,47a	2,77ab	5,04c	3,39b	2,80b
i15	7,12a	14,94b	23,91c	16,19b	10,61ab
a15	4,47a	8,40b	13,99c	8,89b	6,53ab
15	1,02a	3,68a	3,20a	2,06a	2,52a
br16	0,25ab	1,64c	0,05a	1,00bc	1,07bc
i16:0	5,66a	10,84b	18,03c	9,54b	10,59b
16:1 $\omega$ 9	1,41a	3,16ab	4,82b	3,61b	1,61a
16:1 $\omega$ 7c	9,21a	13,26a	17,72a	15,27a	7,66a
16:1 $\omega$ 5	3,53a	5,10ab	8,07b	5,59ab	3,11a
16:00	17,53a	29,26ab	47,66c	42,87bc	35,11bc
10Me16a	4,84a	7,58ab	10,94c	9,34bc	5,74a
i17	2,23a	5,34b	10,11c	4,61b	5,05b
a17	2,64a	4,45b	7,03c	4,63b	5,09b
cy17	2,15a	4,41b	8,08c	5,55b	4,08ab
17:0	1,50a	1,61a	2,74b	1,80a	1,63a
br18	0,05a	1,36c	0,41b	1,12c	0,58b
10Me17	0,78a	1,30ab	1,49b	1,40b	1,38b
18:2 $\omega$ 6	5,13ab	6,06ab	9,06b	8,41b	3,59a
18:1 $\omega$ 9	10,10a	19,21ab	30,30c	29,05bc	19,58ab
18:1 $\omega$ 7	1,15a	14,55b	25,34c	15,13b	7,97ab
18:00	2,58a	5,13b	8,58c	7,52c	7,27bc
10Me18	2,34a	3,06abc	3,96c	3,66bc	2,72ab
cy19	1,83a	3,39a	6,90b	7,84b	7,28b
20:00	0,40a	0,56ab	0,85b	0,88b	0,62ab

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada PLFA valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a p $\leq$ 0,05.

Con respecto a las parcelas tratadas en mulching, se apreciaron ciertas diferencias de comportamiento con respecto a las parcelas donde se adicionó la enmienda mediante incorporación en la capa arable. Así, prácticamente no se observaban diferencias significativas, en función de la dosis, entre los contenidos de los diferentes ácidos grasos de los suelos tratados con compost y solo para algunos de estos ácidos los contenidos observados para la dosis más alta de compost (S+RCd2M) eran superiores a los encontrados en los suelos tratados a la dosis más baja (Tabla 4.2.20), siendo las diferencias entre estos tratamientos y el control menos acentuadas que las observadas en los suelos en los que la enmienda se adicionó mediante incorporación. Por otra parte, en los suelos enmendados con RF se observaba una cierta

inhibición del crecimiento microbiano, particularmente en el tratamiento S+RFd2M observándose para los contenidos de PLFA de algunos de los ácidos grasos identificados valores significativamente inferiores a los del suelo control (Tabla 4.2.20). Así, en estos suelos con RF (S+RFd1M y S+RFd2M) el contenido de ácido 16:1 $\omega$ 5 era significativamente inferior al del suelo control y al de los suelos tratados con ambas dosis de compost, poniéndose de manifiesto el inferior desarrollo de una comunidad micorrícica en estos suelos.

**Tabla 4.2.20. Abundancia de PLFAs individuales en los suelos enmendados en mulching y el control 5 años después de la enmienda.**

PLFA (nmol g <sup>-1</sup> )	Suelo control	S+RCd1M	S+RCd2M	S+RFd1M	S+RFd2M
i14	0,59a	0,89bc	1,11c	0,67ab	0,65ab
14:0	1,47a	1,48a	1,87a	1,80a	1,83a
i15	7,12ab	7,06ab	8,51b	6,70ab	5,76a
a15	4,47a	4,26a	4,79a	4,06a	3,83a
15:0	1,02a	1,65a	1,65a	4,66a	2,02a
br16	0,25a	0,79a	0,41a	0,35a	0,80a
i16:0	5,66ab	5,26ab	6,02b	4,61a	5,35ab
16:1 $\omega$ 9	1,41b	1,32ab	1,57b	1,30ab	0,92a
16:1 $\omega$ 7c	9,21c	8,47bc	7,64bc	6,58ab	4,59a
16:1 $\omega$ 5	3,53b	4,19c	3,96bc	2,17a	1,85a
16:0	17,53ab	15,90a	15,87a	18,09ab	21,10b
10Me16a	4,84a	4,05a	3,51a	4,67a	4,44a
i17	2,23a	2,47a	3,24b	2,19a	2,53a
a17	2,64a	2,18a	2,24a	2,26a	2,61a
cy17	2,15a	2,33a	2,63a	2,37a	2,30a
17:0	1,50b	0,83a	0,87a	0,86a	0,88a
br18	0,05a	0,68b	0,18a	0,31ab	0,49ab
10Me17	0,78b	0,59a	0,47a	0,80b	0,76b
18:2 $\omega$ 6	5,13b	4,07b	7,55c	2,77a	2,24a
18:1 $\omega$ 9	10,10ab	10,00ab	9,33a	11,10ab	13,91b
18:1 $\omega$ 7	1,15a	10,13d	9,87d	5,71c	4,37b
18:0	2,58a	2,82ab	2,78ab	3,50b	4,28c
10Me18	2,34c	1,57ab	1,20a	1,84b	1,60ab
cy19	1,83a	2,23a	2,55ab	3,46b	5,32c
20:0	0,40a	0,78a	0,29a	0,37a	0,40a

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. M: mulching. Para cada PLFA, valores seguidos de la misma letra indica no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a p $\leq$ 0,05.

Los suelos enmendados presentaban, en general, contenidos de PLFA de poblaciones bacterianas totales, bacterias Gram+ y Gram-, así como de ácidos grasos saturados y monoinsaturados significativamente superiores a los del suelo control cuando la enmienda había sido incorporada al suelo, mientras que para los suelos de las parcelas enmendadas mediante mulching este incremento solo se apreciaba en el suelo tratado con compost a d2, el cual mostraba también contenidos de PLFA de poblaciones fúngicas significativamente superiores al control (Tabla 4.2.21).

Vemos por tanto que pese al aporte de metales pesados que supuso la adición de enmiendas orgánicas, se produjo un incremento de la población bacteriana en todos los suelos enmendados. Algunos autores han indicado que las bacterias Gram- son más resistentes que las bacterias Gram+ frente a altas concentraciones de metales pesados, particularmente cobre (Wakelin et al., 2012) y cadmio (Abbaye et al.,

2005). Asimismo, Gomes et al., (2012) observaron, en un experimento a largo plazo en parcelas experimentales con adición de compost, que los hongos también presentan una alta tolerancia a los metales pesados. En nuestro estudio, dado que el incremento de metales pesados se produjo en todos los suelos enmendados siendo el efecto de las enmiendas en las comunidades bacterianas y fúngicas diferente, podemos pensar que este hecho no ha sido determinante para explicar el efecto inhibitorio presentado en la comunidad fúngica en los suelos enmendados con RF.

En los suelos con incorporación de la enmienda en la capa arable el suelo control presentaba valores de PLFA fúngicos significativamente inferiores a los de los tratamientos S+RCd2 y S+RFd1, no observándose estas diferencias para los tratamientos S+RCd1 y S+RFd2 (Tabla 4.2.21). Es de destacar que el suelo tratado con RFd2 mostraba un contenido de PLFA de poblaciones fúngicas (3,59 nmol g<sup>-1</sup>) inferior al del control (5,13 nmol g<sup>-1</sup>), si bien la diferencia no llegaba a ser estadísticamente significativa, mientras que la adición de RF en mulching si bien incrementaba ligeramente, aunque no de modo significativo, los valores de PLFA bacterianos, en particular las bacterias Gram-, producía un fuerte decrecimiento en las poblaciones fúngicas a las dos dosis ensayadas (Tabla 4.2.21).

Estos menores valores de la comunidad fúngica en estos suelos podría deberse a la competencia entre bacterias y hongos. De hecho, la producción de compuestos antifúngicos por parte de las bacterias es un fenómeno bien documentado (De Boer et al., 2003; Zou et al., 2007).

Bastida et al. (2008b) relacionan la mayor abundancia de microorganismos en el suelo con la mayor cobertura vegetal. Este hecho explicaría la menor presencia fúngica para los suelos tratados con RF en dosis alta, por presentar una menor cubierta vegetal, pero esta explicación no sería tan evidente para S+RFd1M, ya que se observa con este tratamiento una inhibición de las poblaciones fúngicas que no se observa con el tratamiento S+RCd1M y sin embargo las parcelas de estos dos tratamientos presentaban una densidad de cobertura vegetal similar. Posiblemente esta disminución de la población fúngica no sea debida a la intervención de un solo factor sino a una conjunción de varios de ellos.

**Tabla 4.2.21. Abundancia de bacterias, hongos, Gram+, Gram-, concentración de PLFAs saturados y monoinsaturados en los suelos enmendados y control 5 años después de la enmienda.**

PLFA (nmol g <sup>-1</sup> )	Suelo control	S+RCd1	S+RCd2	S+RFd1	S+RFd2
Bacterias	37,55 a	73,39 b	123,23 c	93,71 bc	72,69 b
Bacterias Gram+	21,79 a	43,61 b	73,11 c	45,01 b	37,39 ab
Bacterias Gram-	15,76 a	29,78 ab	50,11 c	48,69 c	35,29 bc
Hongos	5,13ab	6,06ab	9,06b	8,41b	3,59a
PLFA saturados total	57,29 a	106,29 b	175,98 c	134,49 bc	114,54 b
PLFA monoins. total	37,32 a	74,12 abc	113,65 c	95,31 bc	56,78 ab

PLFA (nmol g <sup>-1</sup> )	Suelo control	S+RCd1M	S+RCd2M	S+RFd1M	S+RFd2M
Bacterias	37,55 a	49,37a	107,92b	39,07a	42,97a
Bacterias Gram+	21,79 a	28,87a	65,61b	19,90a	22,64a
Bacterias Gram-	15,76 a	20,50a	42,30b	19,17a	23,20a
Hongos	5,13b	4,07b	7,55c	2,77a	2,24a
PLFA saturados total	57,29 a	73,78a	158,39b	63,08a	65,03a
PLFA monoins. total	37,32 a	58,00a	106,54b	38,71a	35,21a

S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. M: mulching. Para cada parámetro valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a p≤0,05.

En cuanto al comportamiento de los hongos micorrícicos, hay que indicar que aun cuando la gran mayoría de microorganismos del suelo se encuentran limitados por la disponibilidad de carbono, los hongos micorrícicos no experimentan esa limitación, a no ser que la planta hospedadora disminuya la movilización de carbono hacia las raíces a consecuencia de algún estrés (baja intensidad de luz, defoliación, etc) (Smith & Read, 1997) ya que cuando la movilización de carbono a la raíz es escasa se ve afectada la viabilidad de las micorrizas (Högberg et al, 2003 & 2006). En nuestro caso, vemos que se ha producido una inhibición de la comunidad de hongos micorrícicos (16:1ω5) y en la biomasa fúngica en general (18:2ω6) en las parcelas enmendadas con altas dosis de RF tanto cuando la enmienda se ha aplicado en mulching como cuando se ha añadido al suelo mediante incorporación en la capa arable.

Con respecto a las bacterias Gram<sup>+</sup> el mayor incremento lo presentaban las parcelas enmendadas con compost a la dosis más alta para ambos tipos de manejo (incorporación y mulching). Algunos autores (Rethemeyer et al., 2005; Kramer y Gleixner 2008., Börjesson et al., 2012) han indicado que las bacterias Gram<sup>+</sup> tienen preferencia por usar el carbono más viejo, mientras que las bacterias Gram<sup>-</sup> prefieren usar el material fresco de las plantas. Así, en nuestro caso, el tratamiento S+RFd1 mostró mayor abundancia de bacterias Gram<sup>-</sup> que los suelos enmendados con RCd1, no existiendo diferencias significativas entre los valores de PLFA de bacterias Gram<sup>-</sup> de los tratamientos S+RCd2 y S+RFd1. Por otra parte, las parcelas tratadas mediante mulching mostraron un comportamiento diferente, presentando el compost en dosis alta los mayores valores de PLFA de bacterias Gram<sup>-</sup> no observándose diferencias significativas entre el resto de tratamientos y el suelo control (Tabla 4.2.21). El hecho de que los tratamientos S´RFd2, S+RFd1M y S+RFd2M presenten menor abundancia de bacterias Gram<sup>-</sup> que los suelos enmendados con RFd1 puede deberse a que, a pesar del mayor aporte de materia orgánica fresca realizado con este tratamiento inicialmente, estas parcelas presentan 5 años después de la enmienda una menor cubierta vegetal que el resto de los tratamientos, lo que supone una menor aportación de restos vegetales y exudados radiculares en estos suelos. La mayor abundancia de bacterias Gram<sup>-</sup> en los suelos tratados con RF en relación a los tratados con RC se ve reflejada en la relación G<sup>+</sup>/G<sup>-</sup>, presentando los suelos enmendados con RF menores valores de esta relación que los enmendados con compost (Figura 4.2.42).

Vemos así que los valores de la relación Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> para los suelos tratados con compost apuntan hacia una preferencia en el desarrollo de las bacterias Gram<sup>+</sup>. El mayor desarrollo de las bacterias Gram<sup>+</sup> en los suelos tratados con compost, independientemente del método de aplicación de la enmienda utilizado, puede ser interpretado como un cambio desde las comunidades microbianas quimiolitotróficas (bacterias que obtienen sus nutrientes, y por ende, energía química a partir de sustancias inorgánicas (CO<sub>2</sub>)), muchas de ellas Gram<sup>-</sup>, hacia una comunidad más heterotrófica debido al incremento de carbono (Tscherko et al., 2004). Las bacterias Gram<sup>-</sup> son capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono y son capaces de adaptarse rápidamente a condiciones adversas (Hinojosa et al., 2005, Carrasco et al., 2009), lo cual explicaría su mayor desarrollo cuando el enmendante es más inmaduro.

Si consideramos los PLFA totales de los suelos donde se había incorporado las enmiendas a la capa arable del suelo vemos que el tratamiento S+RCd2 mostraba valores significativamente superiores a los del resto de tratamientos y el control, seguido por el tratamiento S+RFd1 que presentaba valores de PLFAs totales superiores a los de S+RCd1 (Figura 4.2.42) y a diferencia de lo observado en los suelos en los que la enmienda se había incorporado a la capa arable, en los suelos tratados en mulching sólo la adición de

compost daba lugar a valores de PLFA totales superiores significativamente a los del control, mostrando los suelos tratados con RF, a ambas dosis valores similares a los del control (Figura 4.2.42).

Con respecto a la relación bacterias/hongos el mayor incremento de esta relación se observó en el tratamiento S+RFd2 para ambos tipos de manejo de la enmienda debido al aumento que experimenta la población bacteriana sin que se produzca ese incremento en la población fúngica, produciéndose incluso una disminución de esta población en los suelos tratados en mulching. En el resto de tratamientos no se observaron diferencias significativas entre tratamientos debido a que se comportan de modo similar en relación al incremento que producen en los PLFAs de bacterias o de hongos; sin embargo, todos estos tratamientos mostraban valores de esta relación superiores a los del control debido a que el incremento que experimentan los contenidos de PLFAs bacterianos con estos tratamientos era superior al incremento que experimentaban los PLFAs fúngicos (Figura 4.2.42).

Los valores de la relación PLFA saturados/PLFA monoinsaturados se mantenían en todos los casos similares al valor del control debido a que ambos parámetros incrementaban de modo similar, excepto para los tratamientos S+RFd2 y S+RFd2M donde debido a que los PLFA monoinsaturados incrementaban en menor proporción que los PLFA saturados el valor de esta relación era superior a los del resto de tratamientos y el control (Figura 4.2.42).

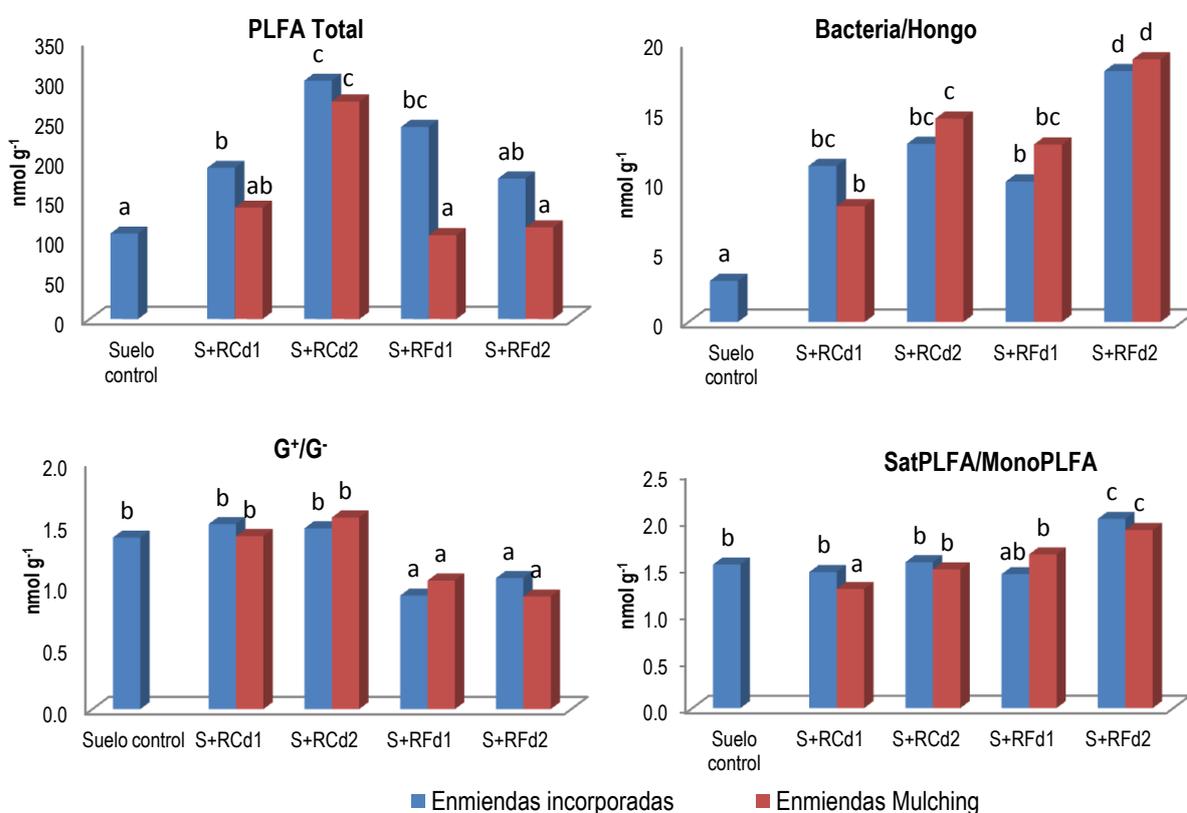


Figura 4.2.42. PLFA totales y relaciones bacterias/hongos, Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup>, y PLFAsaturados/PLFAMonoinsaturados en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de la incorporación de las enmiendas. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey a p≤0,05.

El análisis de componentes principales (PCA) efectuado con las concentraciones relativas de cada uno de los 25 ácidos grasos analizados, nos permite ampliar los resultados obtenidos anteriormente contribuyendo a un mejor entendimiento de las variaciones producidas por los diferentes tratamientos en la estructura de las comunidades microbianas del suelo.

La aplicación de este análisis de factores a las parcelas en las que la enmienda había sido aplicada mediante incorporación en la capa arable del suelo proporcionó dos factores: el factor 1, que explicaba casi el 88% de la varianza observada en los resultados y el factor 2, que explicaba el 6%. El peso de cada ácido graso en cada factor se muestra en la Figura 4.2.43. Para el factor 1 el análisis de la varianza (ANOVA) de las coordenadas de ese factor permitió establecer diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el suelo control y los suelos enmendados con compost a la dosis más alta (S+RCd2) y con RF a la dosis más baja ensayada (S+RFd1), no llegando estas diferencias a ser significativas para los tratamientos S+RCd1 y S+RFd2. Con el factor 2 el test ANOVA no indicó diferencias significativas entre el suelo control y los suelos enmendados con compost pero si indicó diferencias significativas con respecto a los suelos tratados con RF.

Como se observa en la Figura 4.2.43, el análisis de componentes principales (PCA) discrimina en función al factor 1 entre el suelo control y los suelos enmendados, de forma que se aprecia una separación entre el suelo control por una parte, los tratamientos S+RFd1, S+RFd2 y S+RCd1 por otra parte y de forma también separada del resto el suelo enmendado con compost a d2; a su vez, el factor 2 discrimina los suelos enmendados con RF de los enmendados con compost y el control.

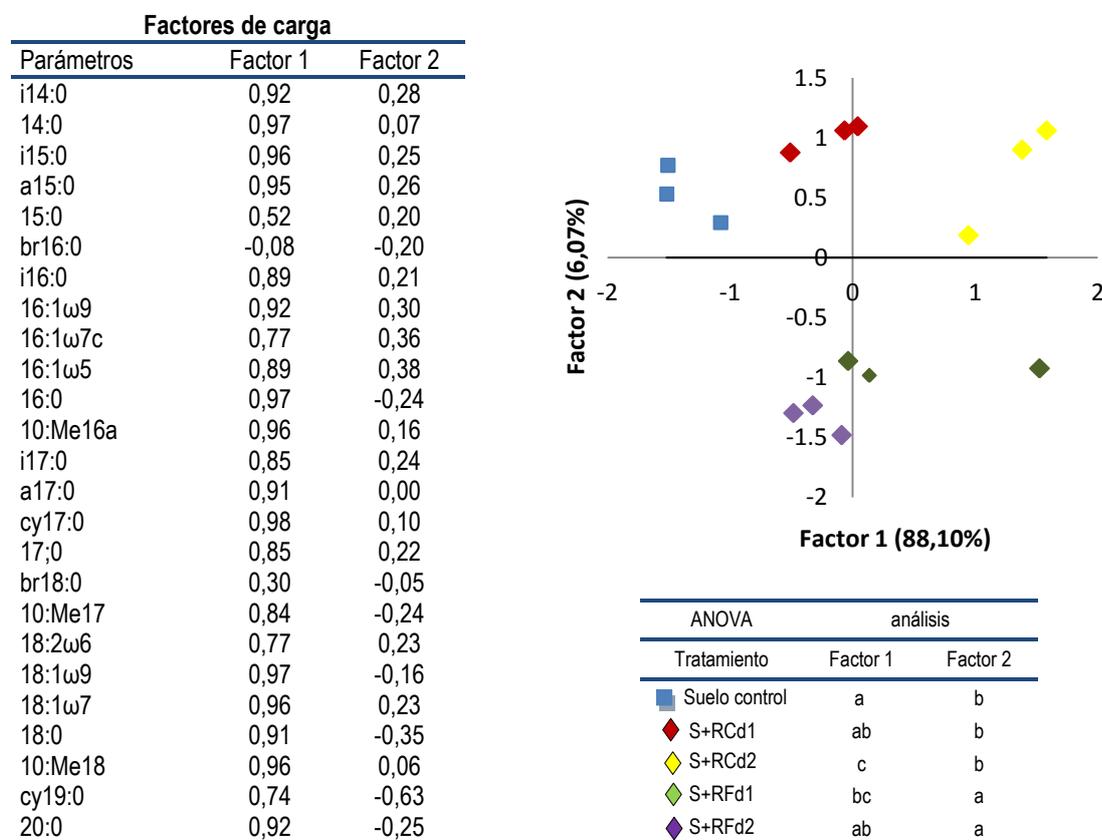
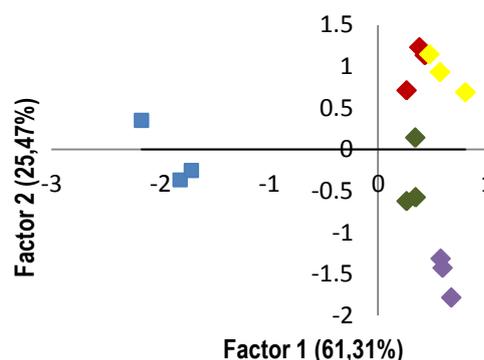


Figura 4.2.43. Análisis de factores con los PLFAs analizados en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada Factor, la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

En las parcelas cuyas enmiendas fueron aplicadas en mulching, el PCA proporcionó también dos factores: el factor 1 que explicaba casi el 61% de la varianza de los datos obtenidos y el factor 2 que explicaba el 25%. El peso de cada ácido graso en cada factor se muestra en la Figura 4.2.44. La aplicación del análisis de varianza (ANOVA) a las coordenadas del factor 1 estableció diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el suelo control y los suelos enmendados, sin encontrarse diferencias significativas entre los diferentes tipos de enmienda o la dosis empleada. La aplicación del test ANOVA al factor 2 estableció diferencias significativas entre los suelos tratados con compost y los tratados con RFd2.

La representación gráfica del análisis de componentes principales agrupa separadamente, en función del factor 1, al suelo control por una parte, y a todos los suelos enmendados por otra, mientras que el factor 2 nos muestra un diferente comportamiento de los suelos en función del enmendante del que se trate. Así, en base al factor 2 los suelos enmendados con compost a d1 y d2 se agrupan conjuntamente separándose de los suelos enmendados con RF y del control, mientras que en los suelos enmendados con RF se establece una diferenciación entre los suelos enmendados a d1, que se agrupan junto con los suelos controles, y los enmendados a d2 (Figura 4.2.44).

Factores de carga		
Parámetros	Factor 1	Factor 2
i14:0	0,61	0,53
14:0	0,62	0,00
i15:0	0,25	0,86
a15:0	0,02	0,69
15:0	0,25	0,23
br16:0	0,16	0,14
i16:0	0,17	0,09
16:1ω9	0,04	0,90
16:1ω7c	-0,74	0,43
16:1ω5	-0,71	0,62
16:0	0,29	-0,94
10:Me16a	-0,78	0,33
i17:0	0,52	0,26
a17:0	-0,01	-0,48
cy17:0	0,73	0,31
17:0	-0,80	-0,13
br18:0	0,49	0,13
10:Me17	-0,34	-0,49
18:2ω6	-0,98	0,08
18:1ω9	0,54	-0,43
18:1ω7	0,82	0,55
18:0	0,58	-0,77
10:Me18	-0,91	-0,15
cy19:0	0,51	-0,78
20:0	-0,51	-0,67



ANOVA	análisis	
	Factor 1	Factor 2
■ Suelo control	a	ab
◆ S+RCd1M	b	b
◆ S+RCd2M	b	b
◆ S+RFd1M	b	ab
◆ S+RFd2M	b	a

Figura 4.2.44. Análisis de factores con los PLFAs analizados en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% Corg; d2: 3% Corg. Para cada tratamiento la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Se observa por tanto, que la incorporación de enmiendas orgánicas al suelo produce cambios en la estructura de su comunidad bacteriana y fúngica estando estos cambios influenciados por la naturaleza de la enmienda. Marschner et al. (2003) observaron cambios en la estructura de las comunidades microbianas al introducir bajas pero regulares entradas de materia orgánica de los suelos. También Bastida et al. (2008) indicaron un aumento en la biomasa bacteriana al introducir enmendantes orgánicos y Ros et al. (2006) encontraron cambios en la diversidad de la comunidad bacteriana de los suelos al introducir compost en los mismos, sin encontrar diferencias entre los diferentes tipos de compost empleados.

De manera similar a la abundancia, podemos abordar el estudio de la actividad microbiana desde diversos frentes. La estimación de la actividad del grueso de la población heterótrofa del suelo ya ha sido estudiada mediante parámetros como la respiración, ATP o actividad deshidrogenasa. Sin embargo, la determinación de la participación de cada grupo microbiano (hongos y bacterias) en esta actividad ha sido más problemática.

En este trabajo, con el fin de contrastar con el empleo de otras técnicas los datos de abundancia bacteriana y fúngica obtenidos mediante la determinación de PLFA, se realizaron medidas de actividad bacteriana y fúngica mediante técnicas basadas en la incorporación de sustratos radiactivos, técnicas que nos permiten ampliar los conocimientos de la abundancia de estas poblaciones teniendo una visión del crecimiento que se produce en estas comunidades.

La técnica que hemos utilizado para estimar el crecimiento bacteriano es el empleo de incorporación de leucina radiomarcada ( $^3\text{H}$ -leucina) durante la síntesis proteica. La posterior tasa de síntesis de proteínas por parte de las bacterias se utiliza entonces como indicador de la actividad bacteriana (Bäåth, 2001) ya que representa un crecimiento real, mostrando la población activa del suelo. Este parámetro puede ser usado como un indicador de los cambios en la comunidad bacteriana del suelo como respuesta a cambios medioambientales (Díaz-Raviña et al., 1994, Bäåth, 2001).

La técnica empleada para estimar el crecimiento fúngico ha sido la técnica basada en la adición de  $^{14}\text{C}$ -acetato a una suspensión de suelo y tras la posterior absorción y la incorporación del acetato marcado en el ergosterol de los hongos, se procede a la extracción de este acetato marcado mediante KOH disuelto en metanol. Tras esto, el ergosterol se analiza mediante HPLC (cromatografía líquida) y el pico de ergosterol es cuantificado y su contenido recogido para su posterior traslado a un vial para proceder a la lectura de centelleos provocados por el acetato marcado.

Paralelamente también se realizó la determinación del contenido total de ergosterol en el suelo, molécula la cual es fundamental en el crecimiento de los hongos (Lees et al., 1995) ya que suministra información sobre el contenido de hongos en el suelo y puede permitir monitorizar un proceso de bioestimulación, debido al hecho de que este esteroide solo se presenta en células vivas y, por tanto, activas. La cuantificación de la concentración de ergosterol en el suelo suele emplearse como *bioindicador* de la biomasa fúngica viva (Grant & West, 1986; Frostegard & Baath, 1996). La presencia de nutrientes aportados como bioestimulantes microbianos influye sobre el crecimiento de los hongos que emplean estos materiales para su propio crecimiento y desarrollo. Un incremento o, incluso, una disminución del contenido de ergosterol en un suelo bioestimulado es un indicador de la actividad metabólica del suelo.

La abundancia bacteriana estimada a través de la incorporación de leucina presentó para los suelos enmendados mediante incorporación de la enmienda, valores significativamente superiores al suelo control cuando las enmiendas fueron incorporadas a la capa arable del suelo, siendo este incremento proporcional a las dosis, no observándose diferencias entre los tratamientos. Estos resultados de abundancia bacteriana coinciden con los detectados mediante PLFAs si bien la depresión en la abundancia de bacterias en el tratamiento RFd2 en relación al tratamiento RFd1 no se ha detectado mediante la incorporación de leucina. La abundancia bacteriana detectada en los suelos enmendados mediante mulching mediante la técnica de la leucina mostró un comportamiento análogo a lo observado con el estudio de los PLFAs, no presentando los suelos valores muy diferentes a los del suelo control, excepto para el tratamiento de S+RCd2M donde con ambas técnicas se detectaron valores significativamente superiores al suelo control (Figura 4.2.45).

Para ambos tipos de manejo de la enmienda (incorporación en la capa arable o mulching), el contenido en PLFA indicador de hongos (18:2w6) mostró un comportamiento parecido al mostrado por el ergosterol y por  $^{14}\text{C}$ -acetato (Tablas 4.2.19 y 4.2.20) (Figura 4.2.45). En aquellas parcelas donde las enmiendas fueron incorporadas al suelo se observó que el tratamiento que presentó menores valores de crecimiento fúngico fue S+RFd2, mostrando valores que no diferían significativamente de los del suelo control, mientras que para los suelos enmendados mediante mulching, estos menores valores de crecimiento fúngico se apreciaron en los tratamientos con RF a las dos dosis ensayadas, presentando valores similares a los del suelo control.

Como se ha comentado anteriormente los bajos valores de actividad fúngica observados en algunos tratamientos podría deberse a la competencia que se produce entre las comunidades fúngicas y bacterianas. De hecho, la producción de compuestos antifúngicos por parte de las bacterias es un fenómeno bien documentado (De Boer et al., 2003, Zou et al., 2007). Meidute et al., 2008 también encontraron indicios del efecto antagonista provocado por un elevado crecimiento bacteriano sobre el crecimiento fúngico tras la adición de una fuente de carbono fácilmente asimilable. En concordancia con ello, en un estudio sobre la respuesta del crecimiento de hongos y bacterias a la inhibición selectiva en suelos, Rousk et al., (2008) encontraron que el crecimiento de los hongos incremento en respuesta a la disminución del crecimiento bacteriano resultante de la aplicación de un bactericida, demostrando el efecto antagonista de las bacterias sobre los hongos. Así, el incremento en la concentración de Cextraíble (incrementando la disponibilidad de C) y el elevado pH del suelo podrían haber favorecido un incremento de la actividad bacteriana, dando como resultado un incremento de la competencia y afectando negativamente la recuperación de los hongos, pero dado que esta inhibición no se produce en los suelos enmendados con compost, debemos pensar que esta inhibición está provocada por otro hecho.

Otros autores (Bastida et al., 2008b) han relacionado la mayor abundancia de microorganismos en el suelo con la mayor cobertura vegetal, hecho que explicaría la menor presencia fúngica para los suelos tratados con RF en dosis alta para los suelos con incorporación de la enmienda y cuando la enmienda es aplicada en mulching, pero vemos que los suelos enmendados con RFd1 en mulching presentan una cobertura vegetal comparable con los suelos enmendados con compost pero su comunidad fúngica es menor. Pero por otra parte, estas parcelas de RFd1M presentan menores valores de carbono que el resto de parcelas enmendadas, lo que explicaría los valores más bajos de leucina y acetato ya que la biomasa microbiana está fuertemente condicionada por el contenido y la calidad del carbono orgánico del suelo (Schnürer et al., 1985; Wardle, 1992; Zak et al., 1994).

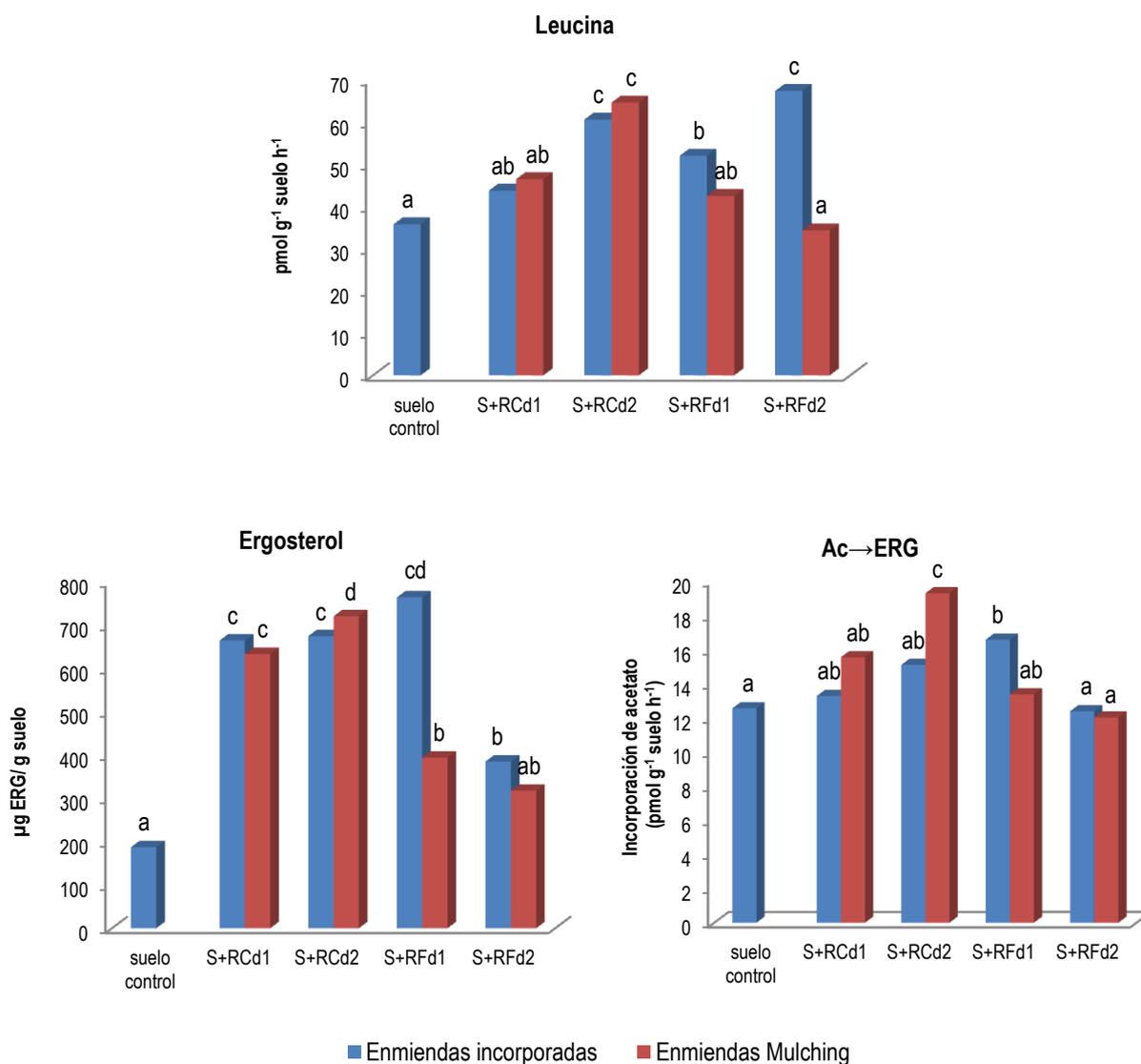


Figura 4.2.45. Contenido de incorporación de <sup>3</sup>H-Leucina, Ergosterol e incorporación de <sup>14</sup>C-Acetato, en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de la incorporación de las enmiendas. S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. M: mulching. Para cada parámetro, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a p ≤ 0,05).

#### Conclusiones parciales:

De forma general se puede afirmar que 5 años después de la enmienda, hay un aumento generalizado de la biomasa bacteriana y fúngica en los suelos tratados con compost y con la dosis más baja de RF cuando las enmiendas han sido incorporadas a la capa arable del suelo, y en los suelos enmendados con compost cuando la enmienda había sido añadida en superficie, reflejando el efecto bioestimulante que los tratamientos han provocado en las poblaciones microbianas del suelo. Estos resultados sugieren que el desarrollo en los suelos degradados de las poblaciones fúngica y bacteriana, no es fruto sólo de una mejora inicial pasajera al aplicar la enmienda sino que esta mejora permanece con el tiempo, generando una adecuada funcionalidad de estos suelos.

### **Análisis de correlaciones**

La Tabla 4.2.22. muestra la matriz de correlación (coeficientes de correlación de Pearson) obtenida con los diferentes parámetros determinados en estos suelos 5 años después de la adición de la enmienda: parámetros físico-químicos, las fracciones de materia orgánica, las propiedades microbiológicas y las actividades enzimáticas. Esta matriz de correlación nos permite conocer hasta qué punto existe una clara interconexión entre el conjunto de parámetros estudiados.

Se ha puesto de manifiesto la existencia de una correlación positiva y significativa entre el carbono orgánico total y diferentes parámetros físicos (densidad real y estabilidad de agregados), indicando que el contenido en materia orgánica (y por tanto, de carbono orgánico y de sus diferentes fracciones) del suelo es fundamental para promover una buena estructura en el mismo (Caravaca et al., 2002a),.

Asimismo, se observó que la estabilidad de agregados y la capacidad de retención hídrica se encuentran positivamente correlacionadas con la cobertura vegetal, lo que resulta lógico puesto que estos parámetros, como hemos visto, determinan una buena estructura del suelo e influyen en las relaciones suelo-agua, lo cual es fundamental para el desarrollo vegetal. Precisamente, la cobertura vegetal se encuentra positivamente correlacionada con el carbono de la biomasa, el cual es un indicador del tamaño de las poblaciones microbianas, y con actividades enzimáticas específicas ( $\beta$ -glucosidasa y fosfatasa), sugiriendo que los restos vegetales y exudados contienen sustratos que promueven la actividad y el desarrollo de la comunidad microbiana. En definitiva, esta interconexión estadística nos sugiere que el funcionamiento y la calidad del suelo dependen, en gran medida, de propiedades de diversa índole.

Se ha puesto de manifiesto una correlación significativa y positiva entre las hidrolasas estudiadas ( $\beta$ -glucosidasa y fosfatasa), la cobertura vegetal, y diferentes fracciones de carbono (carbono de biomasa microbiana, carbono de sustancias húmicas, carbono hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles). Este hecho pone de manifiesto que es en estas fracciones carbonadas donde se pueden encontrar gran parte de los sustratos que estimulan la actividad microbiana y la síntesis de las enzimas.

Cabe destacar que se ha observado en este experimento de campo a largo plazo, un aumento en la actividad enzimática después de la aplicación de las enmiendas en los suelos. Inicialmente el incremento puede ser debido a la biodegradación de la materia orgánica presente en estos materiales, la cual contiene sustratos para la actividad enzimática (Benítez et al., 2005) hecho que favorece el crecimiento vegetal, a partir del cual, los exudados radiculares y los restos de esta vegetación actúan como sustrato para la actividad enzimática (Pascual et al., 1999). Además, resulta importante destacar que estos restos vegetales pueden contribuir al aumento del conjunto de diferentes fracciones de carbono (carbono de biomasa microbiana, carbono de sustancias húmicas, carbono hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles) en los suelos.

Tabla 4.2.22. Matriz de correlación entre parámetros estudiados en el suelo control y en los suelos enmendados tras 5 años de la incorporación de la enmienda.

Parámetros <sup>1</sup>	DH	AU	FOSF	GLUC	CBM	RESP	ATP	C <sub>org</sub>	CH	CbH	CHUM	bPLFA	fPLFA	G+	G-	H <sub>BIOLOG</sub>	Vcob	CRH	EA	DR
AU	-0.541																			
FOSF	0.236	-0.634																		
GLUC	0.468	-0.151	0.484																	
CBM	0.205	-0.077	0.768	0.768																
RESP	0.206	-0.486	0.814	0.814	0.709															
ATP	-0.102	-0.268	0.799	0.799	0.677	0.373														
C <sub>org</sub>	0.116	-0.689	0.965**	0.965**	0.608	0.692	0.842													
CH	0.35	-0.83	0.956*	0.956*	0.568	0.743	0.698	0.964**												
CbH	0.226	-0.589	0.993**	0.993**	0.788	0.751	0.857	0.964**	0.938*											
CHUM	0.173	-0.79	0.993**	0.921*	0.475	0.626	0.779	0.984**	0.971**	0.916*										
bPLFA	0.222	-0.571	0.879*	0.879*	0.708	0.991	0.462	0.781	0.827	0.822	0.727									
fPLFA	0.387	-0.532	0.879*	0.396	0.382	0.827	-0.201	0.225	0.384	0.299	0.194	0.766								
G+	0.421	-0.738	0.891*	0.891*	0.639	0.939*	0.439	0.806	0.899*	0.836	0.787	0.968**	0.746							
G-	-0.059	-0.299	0.777	0.777	0.728	0.961**	0.446	0.673	0.652	0.723	0.578	0.944*	0.717	0.832						
H <sub>BIOLOG</sub>	0.508	0.105	0.529	0.529	0.829	0.737	0.181	0.289	0.383	0.505	0.184	0.685	0.73	0.656	0.657					
Vcob	0.397	-0.273	0.869*	0.829*	0.919*	0.877	0.439	0.575	0.628	0.746	0.871	0.857	0.705	0.819	0.824	0.945*				
CRH	0.317	-0.853	0.924*	0.924*	0.505	0.813	0.58	0.925*	0.980**	0.883*	0.938*	0.883*	0.515	0.941	0.720	0.389	0.881*			
EA	0.463	-0.723	0.958*	0.958*	0.737	0.867	0.615	0.881*	0.948*	0.932*	0.854	0.917*	0.581	0.966**	0.763	0.656	0.835*	0.939*		
DR	-0.443	-0.723	-0.969**	-0.969**	-0.767	-0.733	-0.768	-0.917**	-0.947*	-0.974**	-0.888*	-0.804	-0.357	-0.865	-0.645	-0.574	-0.771	-0.888*	-0.965**	
DA	-0.184	0.64	-0.998**	-0.998**	-0.735	-0.803	-0.81	-0.979**	0.959**	-0.990**	-0.939*	-0.871	-0.369	-0.879*	-0.776	-0.475	-0.73	-0.930*	-0.942*	0.954*

\*, \*\*, Significativo a  $P \leq 0.05$  y  $P \leq 0.01$ , respectivamente. DH (actividad deshidrogenasa), AU (actividad ureasa), FOSF (actividad fosfatasa), GLUC (actividad  $\beta$ -glucosidasa), CBM (C de la biomasa microbiana), RESP (respiración basal), C<sub>org</sub> (C orgánico total), CH (C hidrosoluble), CbH (carbohidratos hidrosolubles), CHUM (C de sustancias húmicas), bPLFA (PLFAs bacterianas), fPLFA (PLFA fúngico), G+ (PLFAs de Gram +), G- (PLFA de Gram -), H<sub>biolog</sub> (Índice de Shannon para Biolog), Vcob (cobertura vegetal), CRH (Capacidad de retención hídrica), EA (Estabilidad de agregados), DR (Densidad real), DA (densidad aparente).

## **CAPÍTULO 4.3**

---

**NUEVA PRESPECTIVA: IMPORTANCIA DE LA ENMIENDA  
ORGÁNICA EN EL SECUESTRO DE C.  
ENSAYO DE INCUBACIÓN**

---



## 4.3 NUEVA PERSPECTIVA: IMPORTANCIA DE LA ENMIENDA ORGÁNICA EN EL SECUESTRO DE C. ENSAYO DE INCUBACIÓN

### INTRODUCCIÓN

En los últimos años la preocupación por el incremento de las emisiones a la atmósfera de CO<sub>2</sub> y metano ha incrementado el interés sobre el potencial papel de los suelos como sumideros de carbono y el estudio de la dinámica de la materia orgánica en relación a la fijación del carbono en el mismo. Incrementar la capacidad del suelo para secuestrar carbono constituye un medio de contrarrestar, a medio plazo, la creciente emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, y contribuir asimismo, a aliviar los impactos ambientales derivados el efecto invernadero (Swift, 2001).

Dado que un factor clave en la degradación de los suelos de extensas zonas del sureste español y del sur de Europa es su bajo contenido en materia orgánica, la cual es vital para la sostenibilidad de estos suelos, es obvia la necesidad de realizar aportes externos de materia orgánica para la recuperación de los mismos, así como el interés de conocer los mecanismos de distribución, conservación y mejora de esta materia orgánica en el suelo. Es importante desarrollar estudios que aporten conocimiento sobre los mecanismos de protección de la materia orgánica exógena y el papel de dichas enmiendas en el incremento de carbono de estos suelos degradados en ambientes semiáridos.

Las estrategias de recuperación de suelos degradados representan una oportunidad de unir el secuestro de carbono con la utilización de residuos orgánicos para mejorar la calidad del suelo, tales como biosólidos y otros residuos orgánicos de origen humano y animal. En este sentido, en el informe elaborado sobre materia orgánica y biodiversidad dentro de la estrategia europea del suelo (Van Camp, 2004) se señala que la materia orgánica exógena constituye una fuente inestimable de materia orgánica para el suelo, y contribuye además a fijar C en dicho suelo, y por tanto, a disminuir, en parte, el efecto invernadero derivado de la emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. La recuperación de suelos y ecosistemas degradados tiene, por tanto, un alto potencial para el secuestro de carbono en el suelo. Si bien la mayoría de los suelos degradados han perdido gran parte de su carbono original, éste puede ser recuperado mediante adecuadas estrategias de rehabilitación de los mismos y su adecuado uso posterior.

Entre los mecanismos de estabilización de la materia orgánica que se producen en el suelo encontramos dos procesos principales: la estabilización química y la protección físico-química. Los mecanismos de estabilización química producen cambios químicos en las moléculas orgánicas que les confieren una mayor resistencia frente al ataque microbiano. Este proceso es conocido como humificación, denominándose los productos resultantes sustancias húmicas. En cambio, la protección físico-química impide el ataque bioquímico de la materia orgánica mediante interacciones de ésta con las partículas minerales. Estos mecanismos incluyen diferentes procesos tales como la adsorción de la materia orgánica en superficies minerales, la formación de complejos, la oclusión de la materia orgánica en agregados o su deposición en poros inaccesibles para los microorganismos y fuera del alcance del ataque de las enzimas. Vemos así la

especial importancia del estudio de la distribución de la materia orgánica (MO) del suelo en fracciones de diferente tamaño de partícula, por ser un proceso clave en la dinámica del carbono orgánico.

En suelos semiáridos, Caravaca et al. (2001 & 2004) indicaron que la aplicación de la basura doméstica aumentaba la concentración de  $C_{org}$  en las partículas finas del suelo (limo y arcilla), siendo mayor esta concentración de carbono orgánico en la fracción de limo que en la fracción de arcilla. En contraste, Steffens et al. (2009) estudiaron la distribución de materia orgánica del suelo en una estepa semiárida, observando que una mayor entrada de materia orgánica en suelos de pastoreo no afectaba a la concentración de carbono orgánico en la fracción fina después de 25 años. Además, Steffens et al. (2009, 2011) indicaron que existe una limitación a la asociación del carbono orgánico con las fracciones de partículas de tamaño de limo y arcilla en esos ecosistemas, debido a la saturación de los sitios de intercambio para las asociaciones órgano-minerales. Otros investigadores (Hassink, 1997; Stewart et al, 2009) también han señalado la existencia de la saturación de las fracciones de tamaño fino. Sin embargo, es escasa la información sobre la capacidad de suelos semiáridos para preservar  $C_{org}$  asociado con las partículas del suelo después de la enmienda orgánica.

Este capítulo tiene por tanto, como objetivo contribuir al conocimiento de la distribución de la materia orgánica en el suelo tras la aplicación de enmiendas orgánicas de diferente grado de estabilización a un suelo semiárido degradado, estableciendo la protección y estabilización de dicha materia orgánica en las fracciones de diferente tamaño de partícula del suelo. Se evalúa, en este capítulo, la influencia de la dosis y de la estabilidad de las enmiendas orgánicas en estos procesos. También se incide en el estudio de la posible saturación en la asociación del carbono orgánico con las fracciones de diferente tamaño de partícula en este tipo de suelos al añadir dosis elevadas de enmienda, así como en los cambios provocados por estas enmiendas en la diversidad microbiana del suelo.

Las técnicas utilizadas en el desarrollo de este estudio han incluido procedimientos físicos de fraccionamiento del suelo según el tamaño de partículas; métodos biológicos y bioquímicos como la medida de la actividad microbiana, la caracterización estructural de las comunidades microbianas mediante la extracción de fosfolípidos de membrana y la caracterización de la diversidad funcional mediante BILOG.

Para este propósito un suelo degradado semiárido enmendado con dos dosis diferentes de dos enmiendas orgánicas, que diferían en el nivel de estabilización de su materia orgánica, fue sometido a un periodo de incubación de nueve meses a temperatura ambiente, evaluando la evolución de la materia orgánica y la actividad microbiológica del suelo durante este periodo, así como su compartimentación en las diferentes fracciones de tamaño de partícula del suelo y los cambios producidos en la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas al final de dicha incubación.

## DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES UTILIZADOS

### Suelo

Según los datos del análisis granulométrico, el suelo de la zona de estudio puede ser considerado como un suelo de textura Franca (Soil Survey U.S.D.A.). Se trata de un suelo calizo formado sobre un substrato

litológico de margas, clasificado como un Xeric Torriorthen (Soil Survey Staff, 1997), cuyas características analíticas se mostraron en la Tabla 4.1.1 del Capítulo 4.1 de esta Memoria.

Como dato más significativo en el suelo podemos indicar que el contenido de materia orgánica es sumamente bajo. Esto confirma que en nuestra zona, suelos con una escasa fertilidad poseen contenidos que podríamos considerar “poco aceptables” de materia orgánica. Ello hace alentar todavía más la iniciativa de introducir enmiendas orgánicas sobre el suelo, si queremos recuperarlo e impedir que los procesos de degradación sigan actuando sobre el mismo hasta llegar a un límite en el que se considere irrecuperable.

Al igual que sucede con la materia orgánica, los contenidos en macronutrientes también ponen de manifiesto la pobreza de dicho suelo (Tabla 4.1.1 del Capítulo 4.1).

### **Enmendantes orgánicos**

Los materiales utilizados como enmiendas orgánicas en este experimento fueron los mismos que previamente habíamos utilizados en el experimento de Microcosmos y en el experimento de campo (Tabla 4.1.2 del Capítulo 4.1 de esta Memoria): la fracción orgánica de las basuras domésticas (RF) obtenida en la planta de tratamiento de residuos domésticos de Ingeniería Urbana, y el compost producido en dicha planta a base de lodo de depuradora de aguas residuales y dicha fracción orgánica de basuras domésticas en una proporción 1:2 (lodo:RF) (RC). El proceso seguido para la obtención del compost así como las características de estas enmiendas orgánicas ya se indicaron en la Tabla 4.1.2 del Capítulo 4.1 de esta Memoria.

### **DISEÑO EXPERIMENTAL**

En base al ensayo realizado previamente, descrito en el del Capítulo 4.1 de esta Memoria, se establecieron dos dosis diferentes para la aplicación de la enmienda, una dosis que, aunque alta, puede ser considerada como “normal-media” para recuperación de suelos (150 t/ha), equivalente a 1% de  $C_{org}$ , y otra dosis “alta-muy alta” (450 t/ha), equivalente a 3% de  $C_{org}$  (García et al. 1994; Ros, 2000). Estas dosis son las mismas utilizadas en el experimento de campo descrito en el apartado 4.2 de esta Memoria de Tesis Doctoral. Los tratamientos se igualaron en contenido de carbono, por lo que para el establecimiento de las cantidades a añadir se partió como base de las dosis antes indicadas, calculando el carbono incorporado en cada dosis con la enmienda menos rica en carbono, y aportando la cantidad necesaria del otro enmendante para añadir con esta enmienda la misma cantidad de carbono que con la enmienda anterior. En concreto, a 500g de suelo tamizado a 2 mm colocado en contenedores apropiados, se le adicionaron 20 g de residuo orgánico fresco (RF) y 23 g de compost (RC) (peso húmedo) para la dosis de 1% de  $C_{org}$  (d1) y 60 g de RF y 69 g de compost para adicionar 3% de  $C_{org}$  (d2). Los diferentes tratamientos y nomenclatura asignada a ellos se muestran en la Tabla 4.3.1.

Los suelos se incubaron a temperatura ambiente durante 9 meses, manteniendo la humedad del suelo entre el 40-60 % de su capacidad de retención hídrica, controlando ésta por pesada y reponiendo el agua perdida cuando era necesario. Los suelos fueron analizados 7 días después de la enmienda (se dejaron 7 días para que el sistema se estabilizase) T7, y a los 90 (T90), 180 (T180) y 270 días (T270) de la

incorporación de la enmienda. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado estableciendo tantas series de tratamientos como puntos de muestreo; triplicados de suelo sin enmienda orgánica se utilizaron como control.

**Tabla 4.3.1. Nomenclatura de los diferentes tratamientos ensayados**

Tratamientos	Nomenclatura
Suelo control degradado	Suelo control
Suelo con compost maduro a dosis equivalente a 1% de C orgánico	S+ RCd1
Suelo con compost maduro a dosis equivalente a 3% de C orgánico	S+ RCd2
Suelo con residuo fresco a dosis equivalente a 1% de C orgánico	S+ RFd1
Suelo con residuo fresco a dosis equivalente a 3% de C orgánico	S+ RFd2

En las muestras de suelo de todos los puntos de muestreo se determinó el contenido de diferentes fracciones de C, N total y diversos parámetros microbiológicos, mientras que el fraccionamiento del suelo por tamaño de partícula y el estudio de la fijación de C y N y la actividad microbiana asociada a las diferentes fracciones obtenidas se llevó a cabo en las muestras del inicio y final de la incubación (T7 y T270); asimismo, el estudio de la diversidad microbiana se realizó al final de dicha incubación (T270).

## DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO PARA EL FRACCIONAMIENTO FÍSICO DEL SUELO

El fraccionamiento físico del suelo se realizó mediante la metodología propuesta por Stemmer et al., (1998) en la que las fracciones de tamaño de partículas entre 2000-250  $\mu\text{m}$  (arena gruesa), 250-63  $\mu\text{m}$  (arena fina), 63-2  $\mu\text{m}$  (limo) y 2-0.1  $\mu\text{m}$  son obtenidas por sonicación de baja energía de suelo: suspensión del suelo en agua, seguido por una combinación de tamizado en húmedo y centrifugación.

Se utilizaron 30g de suelo húmedo a los que se adicionaron 100 ml de agua destilada y esta disolución era sonicada a 50  $\text{Js}^{-1}$  durante 120s. La arena gruesa (2000-250  $\mu\text{m}$ ) y arena fina (250-63  $\mu\text{m}$ ) fueron separadas por tamizado en húmedo. Las fracciones de tamaño limo (63-2  $\mu\text{m}$ ) fueron separados de la fracción de arcilla (2-0,1  $\mu\text{m}$ ) por centrifugación a 150 g durante 2 minutos. Los sobrenadantes se centrifugaron a 3900 g durante 30 minutos para producir partículas de tamaño arcilla (2-0.1) micras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fijación y compartimentación del carbono y nitrógeno en el suelo y sus fracciones de diferente tamaño de partícula

Uno de los objetivos principales en la aplicación de residuos orgánicos en agrosistemas con baja capacidad productiva, es la recuperación de su fertilidad natural a través de incrementar sus contenidos en materia orgánica. Con la incorporación al suelo de la materia orgánica exógena se están introduciendo fracciones

de carbono con distintos grados de estabilización que van a seguir procesos de mineralización o humificación en el sistema, influyendo en su dinámica las características y el manejo que reciba cada suelo, además de factores químicos, biológicos y ambientales (Batjes, 1998). Para conseguir la recuperación de los suelos degradados, es necesario desarrollar estrategias que promuevan el incremento de su contenido de materia orgánica favoreciendo su fijación de forma estable en el suelo (secuestro de carbono) (Sodhi et al., 2009). Diferentes autores han indicado que la utilización del compost en los suelos es una forma eficaz de retener carbono en los suelos (Senesi et al., 2007; Sodhi et al., 2009; Adani et al., 2009; Bastida et al. 2007b; Tejada et al., 2009 ).

### **Evolución del carbono y sus fracciones y del nitrógeno en el suelo completo**

Como puede observarse en la Figura 4.3.1, todos los suelos enmendados mantuvieron a lo largo de todo el periodo experimental contenidos de carbono orgánico total ( $C_{org}$ ) significativamente superiores a los del suelo control, siendo los valores de  $C_{org}$  de los suelos tratados con dosis alta (d2) significativamente superiores a los de los suelos tratados a dosis más baja (d1) y aunque el  $C_{org}$  en los suelos decrece con el tiempo, a través de la mineralización de la materia orgánica (MO), todos los suelos enmendados mostraban contenidos considerablemente mayores que los suelos sin enmendar al final del periodo de incubación (Tabla III.1 del Anexo). El enriquecimiento de los suelos en  $C_{org}$  9 meses después de la enmienda era significativamente mayor en los suelos tratados con dosis alta (d2) para todas las enmiendas. Sin embargo, se observó un diferente comportamiento entre dosis con respecto a la dinámica de mineralización de la MO, la cual depende de la dosis aplicada. Así, mientras que en el suelo control y en los suelos enmendados a d1 (S+RCd1 y S+RFd1) la mineralización de la MO se produce de una manera gradual, en los suelos enmendados con la dosis alta (S+RCd2 y S+RFd2) la mineralización de la MO fue intensa durante los tres primeros meses, mostrando a continuación una mineralización menor y más gradual (Figura 4.3.1.).

De igual forma, mientras las diferencias en el contenido de  $C_{org}$  de los suelos enmendados con la dosis más baja (d1) no eran estadísticamente significativas al final del periodo de incubación, el contenido de  $C_{org}$  de los suelos enmendados con la dosis alta era significativamente superior ( $p \leq 0.05$ ) en los suelos tratados con compost (S+RCd2) que en los enmendados con RF.

El almacenamiento de carbono orgánico ( $C_{org}$ ) en los suelos será el resultado del equilibrio entre los aportes de materia orgánica al suelo y las pérdidas a través de la descomposición de materia orgánica (Amundson, 2001). Como hemos observado, nueve meses después de la aportación de las enmiendas, el contenido de  $C_{org}$  permanecía más alto en todos los suelos enmendados que en el suelo control, siendo particularmente más altos los valores encontrados en los suelos tratados con la dosis más alta. Otros investigadores ya encontraron que la aplicación de materiales con un alto contenido de materia orgánica favorecía el aumento a corto plazo de diferentes fracciones de carbono en suelos semiáridos (Pascual et al., 1997; Ros et al., 2003). Esto pone de relieve el importante papel de las enmiendas orgánicas para compensar las pérdidas de materia orgánica en suelos degradados, contribuyendo así a restaurar el funcionamiento del suelo y su fertilidad.

La intensa mineralización observada en los suelos enmendados a dosis alta en los primeros tres meses es atribuible a la mayor biomasa y actividad microbiana desarrollada en estos suelos como consecuencia de la gran cantidad de sustratos y microorganismos aportados con las enmiendas orgánicas (Kütük et al., 2003;

Liang et al., 2005). La perturbación causada en el sistema también pudo haber contribuido a estas altas tasas de mineralización. Una vez que desaparecen estos compuestos fácilmente biodegradables, el  $C_{org}$  se mineraliza de forma más gradual. Independientemente de la dosis de aplicación, la mayor mineralización del  $C_{org}$  observada en los suelos enmendados con RF en comparación con los suelos enmendados con compost (23% y 13% mayor para d1 y d2, respectivamente), puede explicarse por el carácter más estable de la MO del compost. Esto indica que los residuos compostados son más adecuados que los residuos frescos para aumentar la reserva de  $C_{org}$  estable en los suelos.

Al final del período experimental, el contenido de  $C_{org}$  en los suelos enmendados a la dosis d2 fue 1,6 y 1,5 veces mayor, respectivamente, para RC y RF con respecto a los suelos enmendados con dosis d1 (Figura 4.3.1). Sin embargo, de acuerdo con los hallazgos de Stewart et al., (2007), la eficiencia de la enmienda en lo que respecta a la fijación de  $C_{org}$  fue mayor cuando se añadió a la dosis d1 que a la dosis d2, por la excesiva mineralización del  $C_{org}$  presentada por las enmiendas cuando se aplicaban a dosis alta. Así, el porcentaje de  $C_{org}$  mineralizado en los suelos enmendados con d2, después de nueve meses de incubación fue aproximadamente el doble que el mineralizado en los suelos enmendados con las dosis d1. El porcentaje de pérdida de  $C_{org}$  por mineralización seguía el siguiente orden: S+RFd2 (44%)> S+RCd2 (39%)>S+RFd1 (25%)>S+RCd1 (21%).

Vemos así que las enmiendas orgánicas mejoran a corto plazo la cantidad de carbono en el suelo, contribuyendo así a que se genere una acumulación de este elemento, hecho muy positivo si se consigue fijar dicho carbono en el suelo dentro de fracciones poco atacables por los microorganismos, y por tanto, poco susceptibles a mineralizarse. Además, cuando la enmienda está estabilizada (en nuestro caso mediante un proceso de compostaje), se consigue mejorar más el contenido de carbono en el suelo ya que hay menor pérdida por procesos de mineralización. De esta manera, se pone de manifiesto que no sólo la cantidad de enmienda es importante, sino también la “calidad” en lo que respecta a su materia orgánica.

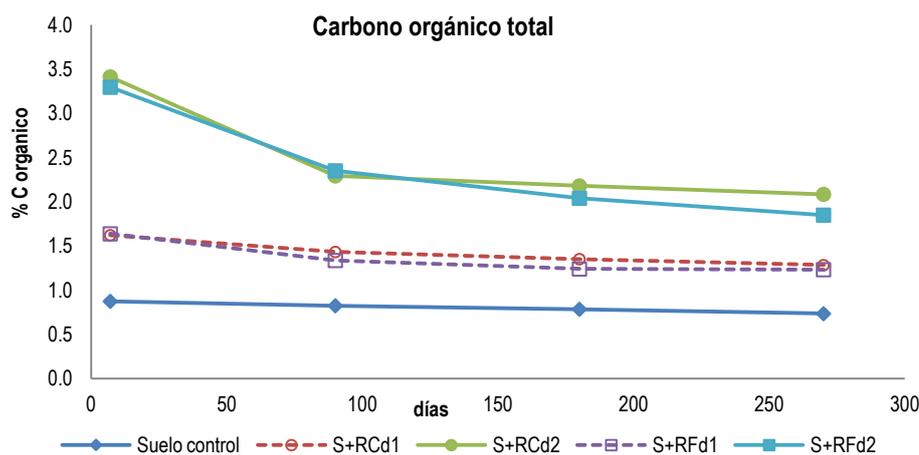


Figura 4.3.1. Evolución con el tiempo del contenido de carbono orgánico en los suelos enmendados y en el control. S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. T7:7 días, T90: 90 días, T180: 180 días, T270: 270 días.

La adición de las enmiendas orgánicas también incrementó el contenido de carbono hidrosoluble (fracción potencialmente atacable por los microorganismos, constitutiva de energía). Se observa que, en igualdad de dosis, los valores de los suelos enmendados con compost son significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) a los de los suelos enmendados con RF (Figura 4.3.2; Tabla III.2 del Anexo). Esta fracción de C presentó un comportamiento similar al presentado por el  $C_{org}$  a lo largo del periodo de incubación.

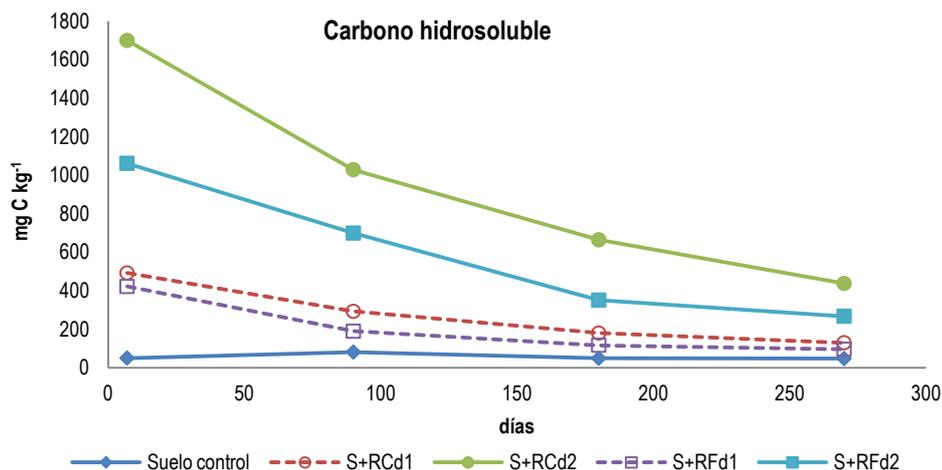


Figura 4.3.2. Evolución del contenido de C hidrosoluble en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3 % de C orgánico, respectivamente. T7: 7 días, T90: 90 días, T180: 180 días, T270: 270 días.

En cuanto a los carbohidratos hidrosolubles, fracción aún más lábil que la anterior, los suelos enmendados mostraron valores mayores que el suelo control, siguiendo la misma tendencia que el carbono orgánico y el carbono hidrosoluble. Se aprecia claramente que el mayor valor de carbohidratos hidrosolubles al final del experimento corresponde al tratamiento S+RCd2 (Figura 4.3.3). Siendo destacable que no se aprecien diferencias significativas entre suelo control y S+RCd1 y entre S+RFd1 y S+RFd2 (Tabla III.3 del Anexo).

Este tipo de fracciones de carbono (solubles en agua) son muy lábiles, y serán atacables por los microorganismos en un grado elevado, siendo por tanto, fáciles de degradar y desaparecer. Pero al mismo tiempo, el ataque a moléculas carbonadas complejas conllevará también la aparición de fracciones lábiles de carbono. Este hecho hace que tanto el carbono soluble en agua como los carbohidratos hidrosolubles sufran continuas neoformaciones y degradaciones.

Por otra parte, el mayor contenido de carbohidratos hidrosolubles en agua en los suelos enmendados, en particular en el tratamiento S+RCd2, es de interés para la restauración de la estructura del suelo, ya que, como indicaron Haynes y Swift (1991), es probable que el proceso de la formación de agregados del suelo se inicie por esta fracción activa de la MO del suelo; asimismo, también se ha observado que los carbohidratos fortalecen los agregados del suelo (Park et al., 2007).

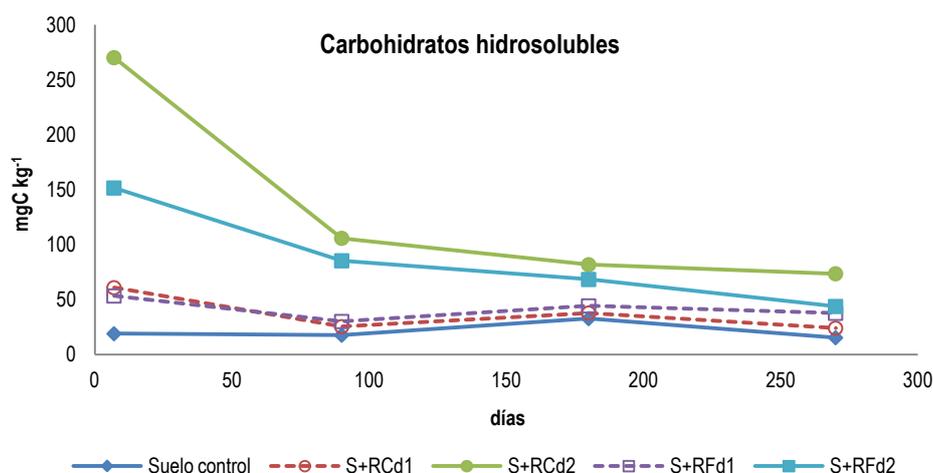


Figura 4.3.3. Evolución del contenido de carbohidratos hidrosolubles en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. T7: 7 días, T90: 90 días, T180: 180 días, T270: 270 días.

Una fracción de carbono más resistente en el suelo, pero a la vez activa y de gran interés, es el carbono de sustancias húmicas (SH). El contenido de carbono de las sustancias húmicas (SH) también era significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) en los suelos enmendados que en el suelo de control (Figura 4.3.4). Inicialmente el contenido de SH del suelo aumentó con las dos dosis de aplicación y, a pesar de que dicho contenido experimentaba una disminución con el tiempo, todos los suelos enmendados mostraban al final de la incubación un contenido de SH significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) que el del suelo control.

En este sentido, los contenidos de SH en los suelos enmendados a la dosis más alta (d2) eran dos veces superiores a los presentados por los suelos enmendados a d1. Por otra parte, los suelos enmendados con compost mostraban, a igualdad de dosis, un mayor contenido de SH que los enmendados con RF, siendo el suelo enmendado con la dosis más alta de compost el que presentaba los mayores contenidos de SH (Figura 4.3.4).

Los mayores descensos en el contenido de carbono de SH se produjeron durante los tres primeros meses, para posteriormente producirse un descenso más gradual.

Las enmiendas orgánicas también aumentaban el contenido del carbono de los ácidos húmicos (HA), particularmente cuando las enmiendas se aplicaban a la dosis más alta. A pesar de que el contenido de AH disminuía con el tiempo, los suelos enmendados presentaban valores significativamente mayores ( $p \leq 0,05$ ) a los del suelo control al final del periodo de incubación. Al igual que se observó para las SH, los suelos enmendados con compost presentaban valores de carbono de AH significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superiores a los de los suelos enmendados con RF, siendo especialmente acusadas estas diferencias para la dosis más alta (Tabla III.4 del Anexo).

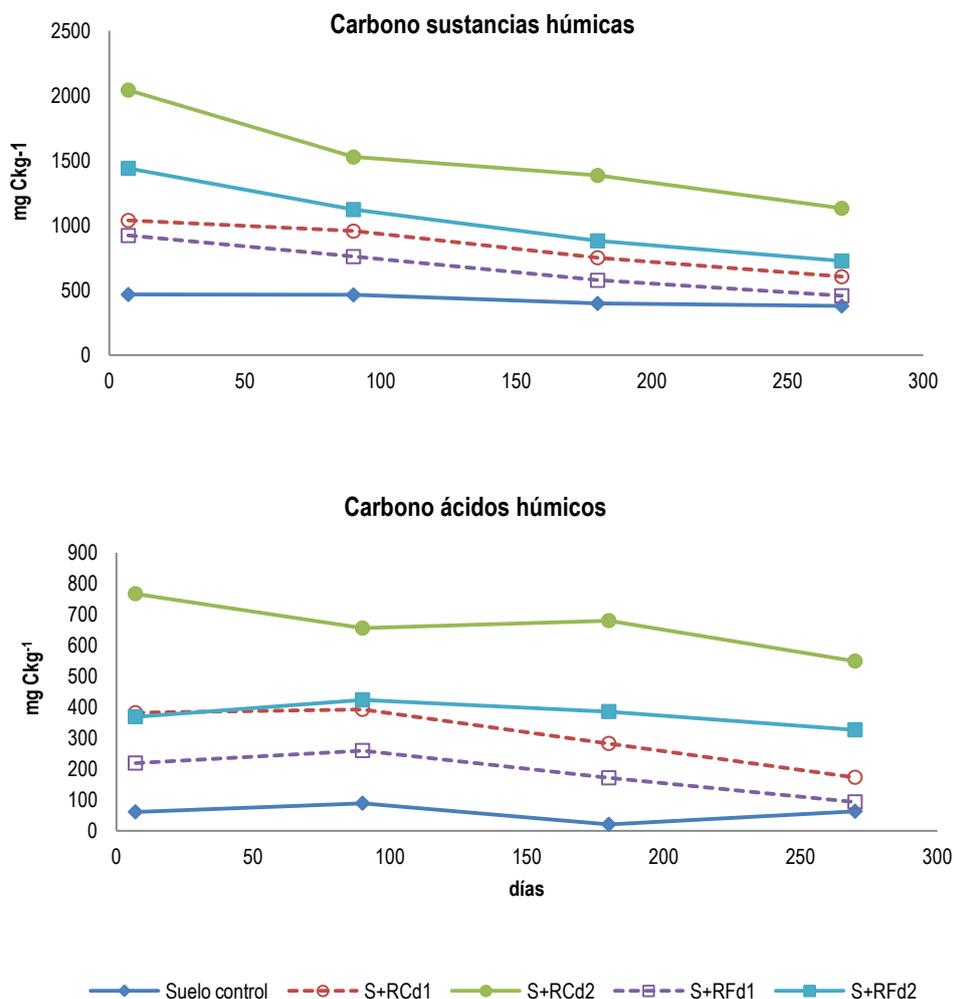


Figura 4.3.4. Evolución del contenido de carbono de sustancias húmicas y de ácidos húmicos en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. T7:7 días, T90: 90 días, T180: 180 días, T270: 270 días.

Las SH son la fracción más reactiva de la MO del suelo y juega un papel clave en la calidad del mismo y en el crecimiento de las plantas. Se consideran como moléculas con una considerable resistencia a la biodegradación debido, en parte, a su composición química (Swift, 2001). La presencia de mayores cantidades de SH y de AH en los suelos enmendados que en el control después de nueve meses, pone de relieve la contribución de la MO añadida a esta fracción estable de C del suelo. El mayor contenido se observó en los suelos enmendados a d2, los cuales presentaban contenidos de AH cuatro veces superiores a los presentados por los suelos enmendados a d1, siendo el tratamiento S+RCd2 el que mostraba un mayor valor, lo cual pone de relieve la influencia del grado de estabilización de la enmienda orgánica empleada y la dosis en la fijación del  $C_{org}$  en forma estable en el suelo.

Las enmiendas orgánicas del suelo aumentaron inicialmente el contenido de N, siendo las diferencias entre los suelos control y los suelos enmendados significativas ( $p \leq 0,05$ ) (Tabla 4.3.2). Dado que la mayor parte del nitrógeno total en estos residuos es nitrógeno orgánico (Ayuso, 1995), en los suelos enmendados con residuos orgánicos, las variaciones de nitrógeno total se deben achacar principalmente a los cambios que experimenta dicho nitrógeno orgánico.

**Tabla 4.3.2: Evolución con el tiempo del contenido de nitrógeno total en los suelos enmendados y el control (media  $\pm$  error estándar, n=3).**

	Nitrógeno Total (g/100g)			
	T7	T90	T180	T270
Suelo control	0,12 (0,03)	0,13 (0,01)	0,13 (0,02)	0,14 (0,03)
S+RCd1	0,17 (0,01)	0,13 (0,03)	0,15 (0,01)	0,21 (0,01)
S+RCd2	0,25 (0,02)	0,32 (0,04)	0,24 (0,01)	0,29 (0,04)
S+RFd1	0,20 (0,06)	0,17 (0,01)	0,16 (0,01)	0,07 (0,01)
S+RFd2	0,24 (0,03)	0,24 (0,03)	0,17 (0,03)	0,24 (0,01)

*S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1,1% y 3,3 % de C orgánico, respectivamente. T7:7 días, T90: 90 días, T180: 180 días, T270: 270 días.*

El aumento de N en suelos enmendados está estrechamente relacionado con la acumulación de materia orgánica en el suelo y puede ser atribuida a los mismos efectos que el aumento de  $C_{org}$ . Efectos similares fueron observados por Mantovi et al. (2005). Ya que la incubación se ha llevado a cabo en sistemas cerrados, no hay pérdidas de nitrógeno por lixiviación siendo las pérdidas de amonio por volatilización las únicas esperables. Sin embargo, el contenido de N se mantuvo constante durante todo el periodo experimental, lo cual es indicativo de que estas pérdidas no se han producido.

### **Fijación del carbono y el nitrógeno en las fracciones de diferente tamaño de partícula del suelo**

En el suelo control, la mayor concentración de  $C_{org}$  se encontraba en la fracción de tamaño de partícula de arcilla (2-0,1  $\mu\text{m}$ ), seguida por la fracción limo (63-2  $\mu\text{m}$ ); esto pone de relieve la estabilidad de la MO de este suelo ya que el  $C_{org}$  asociado con estas fracciones está protegido contra el ataque microbiano (Figura 4.3.5).

Siete días después de la adición de la enmienda, el  $C_{org}$  añadido se mantenía retenido principalmente en la fracción de arena gruesa del suelo (200-2000  $\mu\text{m}$ ), aunque todas las fracciones presentaban contenidos de  $C_{org}$  significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) en los suelos enmendados que en el suelo control, particularmente en los suelos enmendados a la dosis más alta (d2) (Tabla III.5 del Anexo).

La cantidad de  $C_{org}$  asociada con la fracción de arena gruesa disminuía considerablemente con el tiempo, siendo las diferencias entre los contenidos de  $C_{org}$  al comienzo y al final del periodo de incubación estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ), mientras que en el resto de fracciones el contenido de  $C_{org}$  se mantuvo constante o con sólo leves aumentos o disminuciones a lo largo de la incubación (Figura 4.3.5). Al

final del período de incubación, los suelos enmendados con RC tenían, en general, mayores contenidos de  $C_{org}$  que los suelos enmendados con RF en todas las fracciones de diferente tamaño de partícula, aunque las diferencias entre los dos tipos de enmienda sólo eran significativas ( $p \leq 0,05$ ) para d2 (Tabla III.5 del Anexo). Vemos así que el tratamiento S+RCd2 presentaba los mayores valores de  $C_{org}$  en todas las fracciones de tamaño de partícula.

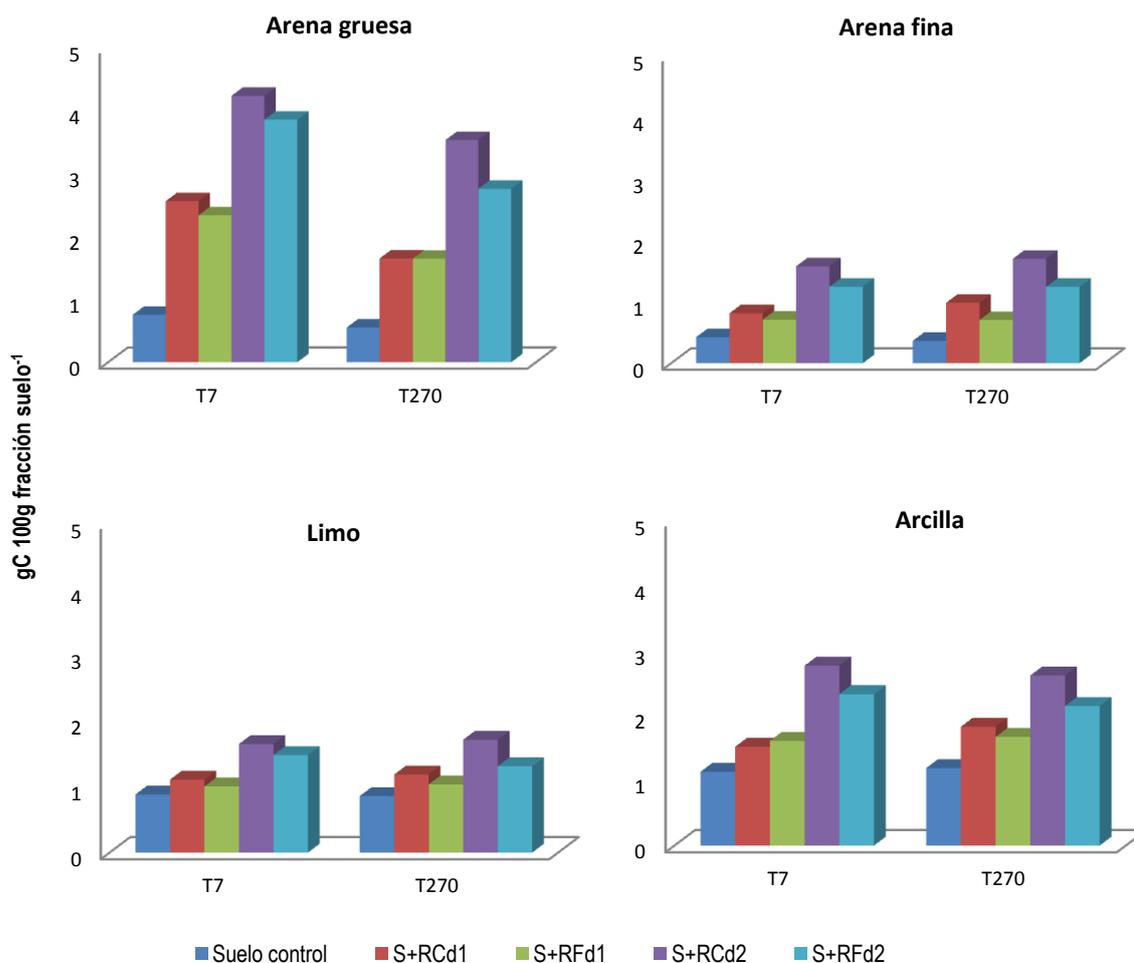


Figura 4.3.5. Cambios con el tiempo del contenido de C orgánico ( $C_{org}$ ) en las diferentes fracciones del suelo. S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. 7 (T7) y 270 (T270) días después de la enmienda.

La realización de un balance de  $C_{org}$  considerando no la concentración sino el contenido absoluto de  $C_{org}$  en cada fracción de tamaño de partícula (concentración de C en la fracción multiplicada por el peso de fracción obtenida) mostró que, nueve meses después de la aportación de materia orgánica exógena a los suelos, una parte sustancial del  $C_{org}$  del suelo estaba asociado a la fracción de limo (45% y 35% para los suelos tratados a d1 y d2, respectivamente) (Tabla 4.3.3).

Al final del periodo de incubación, todas las fracciones de suelo tenían mayores contenidos de  $C_{org}$  en los tratamientos con dosis d2 que en los de dosis d1, a excepción de la fracción de arcilla donde se observaba lo contrario. Todos los suelos enmendados tenían mayores cantidades de  $C_{org}$  asociado al conjunto de las fracciones finas del suelo (<63 $\mu$ m, limo y arcilla) que el suelo control. Los incrementos en  $C_{org}$  con respecto al control seguían el siguiente orden: S+RCd2 (88%)> S+RCd1 (58%)> S+RFd2 (54%)> S+RFd1 (42%).

Como ya se ha indicado anteriormente, la adsorción sobre los minerales del suelo es un importante mecanismo para la estabilización del carbono y la protección de la MO del ataque microbiano, incrementando, por tanto, el tiempo medio de residencia del C estabilizado en las partículas minerales del suelo. Muchos estudios han indicado que el  $C_{org}$  contenido en las fracciones de limo y arcilla del suelo es más antiguo o permanece durante más tiempo en el suelo que el  $C_{org}$  presente en las fracciones del suelo de mayor tamaño (Kalbitz et al., 2005). Del mismo modo, estudios realizados con la utilización de isótopos de  $^{13}C$  han establecido que el C en las fracciones de mayor tamaño tiene mayores tasas de degradación (Bird et al., 2002).

En el suelo control, las mayores concentraciones de  $C_{org}$  se encontraron en las fracciones de partículas finas del suelo (limo, 2-63  $\mu$ m, y arcilla, 0,1-2  $\mu$ m) y el C ligado a estas fracciones cambió sólo ligeramente durante el periodo de incubación, lo que indica la presencia de  $C_{org}$  estable protegido, el cual es difícil de degradar.

El  $C_{org}$  retenido en la fracción de arena gruesa es el C del suelo menos protegido y por consiguiente es la fracción más mineralizada durante la incubación, en todos los suelos. Con el progreso del proceso de descomposición, la MO puede ser transferida a las fracciones más finas del suelo.

Cabe señalar que en S+RCd2 el porcentaje de  $C_{org}$  retenido en la arena gruesa disminuía un 16% durante la incubación, mientras que en los otros tratamientos, incluyendo S+RFd2, esta reducción oscilaba entre el 27 al 36%, lo que sugiere que es necesario más tiempo para que se produzca la degradación de la mayor cantidad de sustratos estables adicionados con el compost.

El hecho de que, al final del periodo de incubación, el suelo enmendado con RC a la dosis d2 tenga mayores concentraciones de  $C_{org}$  que los suelos enmendados con RF, en todas las fracciones de partícula de los suelos, destaca la importancia del grado de estabilización de la MO añadida para la fijación del  $C_{org}$  en el suelo y sugiere que el compost maduro es más adecuado como enmendante que los residuos orgánicos frescos. Por otra parte, al final del periodo de incubación, la cantidad de  $C_{org}$  asociado con la fracción de arcilla fue menor en suelos con d2 que en aquellos con d1, lo que sugiere que el aporte de altas dosis de C estimula la mineralización de los compuestos orgánicos 'estabilizados' en superficies minerales.

Liao et al. (2006) han sugerido que la capacidad del suelo para proteger a la MO es finita y depende de la cantidad máxima de  $C_{org}$  que puede estar asociada con las partículas de limo y arcilla, lo que implica que el grado de saturación de los sitios de protección afecta a la protección potencial del nuevo C añadido. Por consiguiente, debería haber un mayor potencial para la preservación de este nuevo  $C_{org}$  añadido en los suelos áridos, donde la MO es más escasa.

El hecho de que la cantidad de  $C_{org}$  asociado con fracciones finas del suelo (limo y arcilla) se incrementase con el tiempo, sobre todo en d2 y en suelos enmendados con RC, destaca el potencial de los suelos semiáridos para la fijación de  $C_{org}$  y confirma la idoneidad de utilizar materiales orgánicos estables y la utilización de altas dosis de enmiendas (350-400 t ha<sup>-1</sup>) para la promoción de la fijación de C.

**Tabla 4.3.3. Contenido (g) del carbono orgánico total en cada fracción de partícula de tamaño en 100g de suelo al inicio (T7) y final (T270) del periodo de incubación ( $\pm$  error estándar. n=3).**

	Arena gruesa > 250 $\mu$ m		Arena fina 250-63 $\mu$ m		Limo 63-2 $\mu$ m		Arcilla 2-0.1 $\mu$ m	
	T7	T270	T7	T270	T7	T270	T7	T270
Suelo control	0,20 (0,02)	0,11 (0,02)	0,11 (0,01)	0,09 (0,01)	0,34 (0,04)	0,37 (0,02)	0,08 (0,01)	0,12 (0,01)
S+RCd1	0,48 (0,04)	0,25 (0,02)	0,21 (0,02)	0,23 (0,02)	0,50 (0,01)	0,56 (0,07)	0,13 (0,01)	0,21 (0,02)
S+RCd2	1,05 (0,06)	0,80 (0,07)	0,41 (0,01)	0,41 (0,01)	0,65 (0,04)	0,74 (0,01)	0,20 (0,01)	0,18 (0,01)
S+RFd1	0,46 (0,01)	0,26 (0,03)	0,17 (0,02)	0,15 (0,01)	0,48 (0,01)	0,51 (0,02)	0,13 (0,01)	0,19 (0,01)
S+RFd2	0,99 (0,11)	0,63 (0,03)	0,30 (0,01)	0,29 (0,01)	0,62 (0,02)	0,59 (0,03)	0,16 (0,01)	0,17 (0,01)

*S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. T7: 7 días, T90: 90 días, T180: 180 días, T270: 270 días. Error estándar entre paréntesis.*

Al igual que se ha observado para el  $C_{org}$ , en el suelo control las concentraciones más altas de N se encontraron en las fracciones finas del suelo (limo, 2-63 $\mu$ m, y arcilla, 0.1-2  $\mu$ m), y solo se observaron pequeños cambios en el N ligado a estas fracciones con el tiempo de incubación (Figura 4.3.6; Tabla III.6 del Anexo), lo que confirma una vez más el carácter estable y la protección de la materia orgánica presente en suelo control. En los suelos enmendados el N mostró una distribución bimodal, donde las fracciones de tamaño arena gruesa y arcilla, mostraban las concentraciones más altas de N. El contenido de nitrógeno en la arena gruesa y en la arcilla tendía a disminuir con el tiempo en todos los suelos, mientras que el N asociados a la arena fina y limo se mantenía casi constante a lo largo del periodo de incubación. En concordancia con estos resultados Stemmer et al. (1998) observaron un incremento en los contenidos de C y N con la disminución del tamaño de partícula.

El importante incremento que se produce en todos los suelos enmendados con respecto al suelo control desde el comienzo del experimento puede ser debido a la incorporación de compuestos nitrogenados proteínicos. Varios autores (Kleber et al., 2007, Nannipieri & Eldor, 2009) han puesto de manifiesto la capacidad de la fracción arcilla para acumular proteínas y péptidos a través de la adsorción

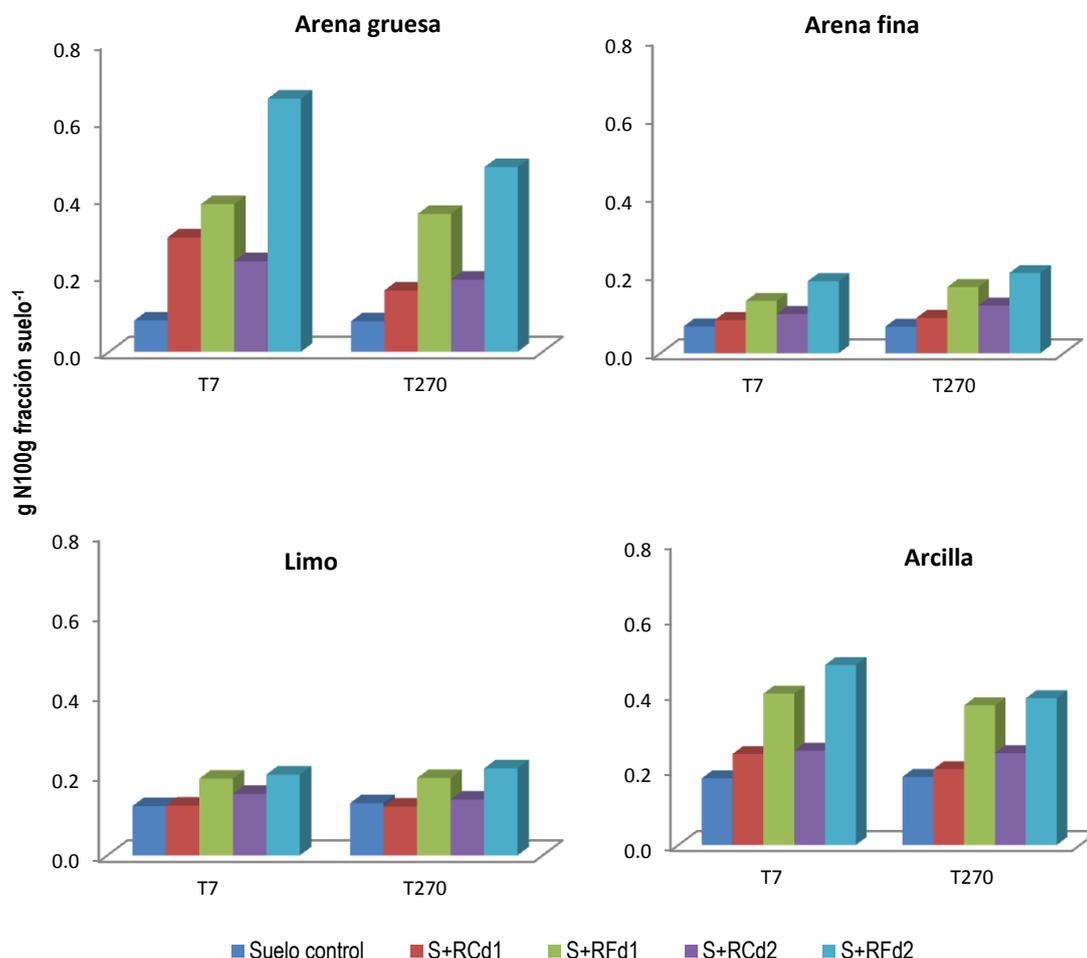


Figura 4.3.6. Cambios con el tiempo del contenido de N en las diferentes fracciones del suelo. S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. 7 (T7) y 270 (T270) días después de la enmienda.

Los menores valores de la relación C/N se encontraron en la fracción arcilla, en contraposición a la fracción de arena gruesa que presentó los valores más altos de esta relación (Tabla 4.3.4). La disminución en la relación C/N observada, en general, de las fracciones de tamaño más gruesas a las fracciones más finas, es un reflejo del estado de mineralización y humificación de la MO, y sugiere el enriquecimiento de las fracciones más finas en material microbiano (Lagomarsino et al., 2009).

La menor relación C/N encontrada en las fracciones finas es debida a la adición de materia orgánica exógena. Esta materia orgánica exógena, al estar poco protegida es descompuesta fácilmente por los microorganismos conduciendo a un incremento de los contenidos de N orgánico e inorgánico en las fracciones de menor tamaño y por consiguiente, a reducir la relación C/N con la disminución de tamaño de partículas (Stemmer et al, 1998).

**Tabla 4.3.4. Relación C/N en el suelo control y en los suelos enmendados ( $\pm$  error estándar. n=3)**

	Relación C/N							
	> 250 $\mu$ m		250-63 $\mu$ m		63-2 $\mu$ m		2-0,1 $\mu$ m	
	T7	T270	T7	T270	T7	T270	T7	T270
Control	9,32(0,62)	6,99(0,39)	6,17(0,41)	5,37(0,72)	7,19(0,75)	6,59(0,35)	6,42(0,44)	6,61(0,55)
S+RCd1	8,65(0,44)	10,40(1,51)	9,60(1,02)	10,91(0,95)	8,92(0,62)	9,74(0,85)	6,30(0,54)	9,10(0,45)
S+RCd2	18,07(1,25)	18,94(0,96)	15,68(1,24)	13,96(1,58)	10,76(1,12)	12,34(0,98)	11,07(0,69)	10,73(0,93)
S+RFd1	6,11(0,35)	4,61(0,16)	5,32(0,33)	4,16(0,27)	5,25(0,20)	5,37(0,24)	4,01(0,11)	4,51(0,21)
S+RFd2	5,89(0,48)	5,77(0,74)	6,77(0,65)	6,07(0,38)	7,35(0,51)	6,05(0,33)	4,88(0,26)	5,51(0,33)

S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. T7: 7 días, T90: 90 días, T180: 180 días, T270: 270 días.

#### Conclusiones parciales:

Podemos concluir que los residuos orgánicos compostados son más adecuados para estimular la fijación de  $C_{org}$  en las fracciones finas (limo y arcilla) de los suelos, donde queda protegido frente al ataque microbiano creando así una reserva de  $C_{org}$  estable en el suelo. La adición al suelo de estas enmiendas orgánicas favorece la formación de sustancias húmicas y ácidos húmicos en el mismo, contribuyendo de este modo a incrementar el pool de  $C_{org}$  del suelo, particularmente cuando se añaden a dosis alta (3%  $C_{org}$ ). De nuevo es el residuo compostado el que se ha mostrado más eficiente para favorecer este proceso de estabilización química del  $C_{org}$  aportado al suelo.

Con respecto a las dosis aplicadas, los suelos enmendados a la dosis más alta de residuo orgánico (3%  $C_{org}$ ) presentaron un mayor nivel de fijación de  $C_{org}$  en todos los tamaños de partícula de los suelos que los suelos enmendados a la dosis más baja (1%  $C_{org}$ ). Sin embargo, la eficacia de esta fijación de  $C_{org}$  ha sido inferior para la dosis alta debido a la mayor pérdida de  $C_{org}$  que se produce a esta dosis como consecuencia de la mayor mineralización que se produce a esta dosis en relación a la dosis más baja (1% de  $C_{org}$ ).

### **Actividad microbiana en el suelo completo y en sus fracciones de diferente tamaño de partícula**

#### **Actividad de las poblaciones microbianas en el suelo completo**

Cuando un suelo está expuesto a procesos de degradación, su estado biológico es el primero en ser afectado por producirse una disminución en su capacidad productiva. La fracción biótica de la materia orgánica, que se compone de los organismos vivos, desempeña un papel fundamental en el suelo, puesto que es, en última instancia, la responsable del estado de la materia orgánica y, en términos generales, del desarrollo y el funcionamiento del ecosistema del suelo (Smith & Papendick, 1993). Por lo tanto, los microorganismos del suelo son esenciales para el medio ambiente debido a su papel en muchas reacciones, como la formación de la estructura del suelo, el ciclo de nutrientes, la descomposición de la materia orgánica, la promoción/supresión del crecimiento de las plantas y varios procesos biológicos y físico-químicos del suelo (Sowerby et al., 2005; Hu et al, 2011).

Sin embargo, la actividad biológica se ve influida por muchos factores que, a la larga, dependen de la estructura del suelo, tales como el contenido de humedad, temperatura y el contenido de arcilla. Una estimación del estado biológico de un suelo puede ser útil para la detección de posibles procesos de degradación. Sin embargo, no siempre es fácil estudiar los microorganismos y sus reacciones a nivel microhábitat.

A lo largo del tiempo se han utilizado una amplia variedad de parámetros para estudiar los procesos biológicos, empleándose tanto métodos directos, que hacen posible estimar la biomasa microbiana por técnicas microscópicas, como métodos indirectos, basados en un análisis de los constituyentes microbianos, básicamente de C y N. También se han utilizados índices específicos de la actividad microbiana en los suelos, estos incluyen la respiración del suelo, las mediciones del contenido de adenosin-tri-fosfato (ATP) en extractos de suelo, y la medición de las actividades de enzimas hidrolasas y oxidorreductasas (Anderson & Domsch, 1993). Como ya se ha indicado repetidamente a lo largo de esta Memoria, debido a la compleja dinámica del sistema suelo, es difícil elegir un solo parámetro para reflejar con precisión su actividad microbiológica, y es aconsejable utilizar varios parámetros y analizar conjuntamente la información que proporcionan.

Aunque el experimento de campo realizado nos permite evaluar en condiciones reales de campo el efecto sobre las poblaciones microbianas de la adición a un suelo degradado de dosis elevadas de enmiendas orgánicas, hemos considerado de interés el establecer, en condiciones controladas de laboratorio (incubación) y en ausencia de vegetación, el efecto de estas enmiendas en la distribución de la actividad microbiana en las fracciones de diferente tamaño de partícula del suelo, así como en su diversidad funcional y estructural.

### **Carbono de la biomasa microbiana, respiración basal y actividad deshidrogenasa**

El contenido de carbono de biomasa microbiana ( $C_{mic}$ ), al igual que se observó en el experimento de campo, incrementó significativamente con la adición de las enmiendas orgánicas, en particular cuando éstas se añadían al suelo en la dosis más alta (d2) (Tabla 4.3.5), lo que sugiere una activación del crecimiento de la población microbiana del suelo por la adición de las enmiendas.

Aunque el  $C_{mic}$  disminuía con el tiempo, todos los suelos enmendados mostraban valores de  $C_{mic}$  significativamente más altos ( $p \leq 0,05$ ) que los del suelo control en todos los tiempos. Por otro lado, nueve meses después de la enmienda los suelos enmendados con RF mostraban, para una misma dosis, valores de  $C_{mic}$  significativamente mayores que los de los suelos enmendados con RC.

El incremento en los valores del carbono de la biomasa observado en los suelos enmendados es debido principalmente a la adición de sustratos carbonados que estimulan el crecimiento de la biomasa autóctona del sistema y, posiblemente, a la incorporación de nuevos microorganismos que forman parte de los residuos orgánicos aplicados. Otros autores han encontrado la misma influencia sobre la biota de suelos enmendados con residuos orgánicos (Perucci, 1992; Díaz et al., 1994; García et al., 1998; Kandeler et al. 1999b; Polo et al., 2001).

Parámetros indicadores de la actividad microbiana global, como la respiración basal del suelo (RB) y la actividad de la deshidrogenasa (ADH), también mostraron valores más altos en los suelos enmendados que en el suelo control (Tabla 4.3.5). La incorporación de las enmiendas orgánicas, produjo inicialmente un gran aumento de la respiración microbiana, siendo los valores de RB en los suelos tratados a d2 el doble de los de los suelos tratados a d1. Los valores de RB disminuían drásticamente durante los primeros 3 meses de incubación, siguiendo disminuyendo posteriormente pero de una manera más gradual. A pesar de esto, al final del periodo de incubación, los valores de RB en los suelos enmendados a d1 eran dos veces superiores a los del suelo control, y a su vez, los valores de RB en los suelos enmendados a d2 eran el doble de los valores observados en los suelos enmendados a d1 (Tabla 4.3.5).

La ADH depende del estado metabólico de los microorganismos del suelo y, aunque su uso como un indicador de la actividad microbiana del suelo ha sido criticado porque la enzima se ve afectada por numerosos factores (tipo de suelo, pH, etc) (Nannipieri et al., 1990), según García et al. (1997b) la actividad deshidrogenasa se puede utilizar como un indicador de la actividad microbiana en suelos semiáridos.

En nuestro experimento los valores de ADH aumentaban considerablemente después de la incorporación de las enmiendas en el suelo, siendo este incremento dependiente de la dosis de aplicación. La ADH disminuía drásticamente durante los primeros 3 meses para posteriormente seguir decreciendo de una forma menos acusada. Al final del periodo experimental todos los suelos tratados mostraban valores de ADH significativamente más altos que los del suelo control. Los valores de ADH eran 59-61% y 83-104% más altos que los del control en los suelos tratados con RC y RF a d1 y d2, respectivamente (Tabla 4.3.5).

**Tabla 4.3.5. Evolución con el tiempo del carbono de biomasa, respiración basal y actividad deshidrogenasa en los suelos enmendados y el control.**

	T7	T90	T180	T270
<b>Biomasa microbiana (mg C<sub>mic</sub> kg<sup>-1</sup>)</b>				
Suelo control	145,40aB	84,49aA	89,53aAB	46,83aA
S+RCd1	466,98bB	484,12cB	235,17bA	220,44bA
S+RCd2	1655,79dC	621,42dB	457,68cA	430,63dA
S+RFd1	419,50bB	316,45bA	316,52bA	320,49cA
S+RFd2	1228,12cB	456,59cA	584,41dA	515,78eA
<b>Respiración Basal (mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>)</b>				
Suelo control	5,19aAB	5,77aB	4,24aA	5,32aAB
S+RCd1	49,90bB	20,29abA	13,43bA	11,58bA
S+RCd2	130,37cC	56,11cB	37,55dAB	23,01cA
S+RFd1	60,56bC	26,61bB	14,71bA	10,76bA
S+RFd2	115,88cC	49,45cB	27,13cA	21,47cA
<b>Actividad deshidrogenasa (µg INTF g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>				
Suelo control	3,13aA	3,98aB	2,53aA	2,81aA
S+RCd1	14,77bC	7,58bB	4,19bA	4,52bA
S+RCd2	23,90dD	11,43dC	8,12eB	5,13bcA
S+RFd1	12,90bC	9,50cB	5,06cA	4,46bA
S+RFd2	20,03cC	11,24dB	6,12dA	5,75cA

S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. T7: 7 días, T90: 90 días, T180: 180 días, T270: 270 días. Para los tratamientos de un mismo tiempo de muestreo (letra minúscula) y los diferentes tiempos de muestreo de un mismo tratamiento (letra mayúscula), la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey  $p \leq 0,05$ .

Los mayores valores observados en los suelos enmendados para estos indicadores de la actividad metabólica global de los microorganismos del suelo es el resultado de la incorporación con las enmiendas orgánicas de compuestos capaces de actuar como sustratos inmediatos para los microorganismos, los cuales estimularán la actividad de las poblaciones microbianas autóctonas del suelo (Pascual et al., 1998; Saviozzi et al., 2002). De acuerdo con esto, los mayores valores de estos parámetros ( $C_{mic}$ , RB, ADH) se observaron en los suelos enmendados a la dosis más alta, lo cual, pone de relieve que no se produce efecto negativo alguno sobre el crecimiento y la actividad de las poblaciones microbianas como consecuencia de la adición al suelo de esta cantidad tan elevada de enmienda orgánica.

El hecho de introducir en los suelos degradados enmiendas más o menos estabilizadas, no parece ser un factor clave en este sentido, sino que parece ser más incidente el hecho de introducir una fuente de materia orgánica, compostada o no, lo cual concuerda con lo ya observado en el experimento de campo.

### **Actividad metabólica específica en el suelo completo: Actividades enzimáticas**

Las actividades enzimáticas de origen extracelular estudiadas son hidrolasas que aportan información sobre el buen funcionamiento de los ciclos del C y del N (García et al., 2002) en el suelo y están implicadas en la fertilidad de éste, poniendo a disposición de las plantas y de los propios microorganismos nutrientes para su desarrollo. Así, se estudió la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, enzima que interviene en el eslabón final de la degradación de la celulosa, la actividad de la polifenol oxidasa, la cual es una enzima clave que controla la dinámica del carbono debido a su participación en los procesos de humificación y de despolimerización (Freeman, 2004), y la actividad de la enzima glicina aminopeptidasa, la cual cataliza la degradación de proteínas.

Con respecto a la actividad  $\beta$ -glucosidasa se observó un aumento considerable inmediatamente después de la incorporación de las enmiendas al suelo, observándose los valores más altos de actividad en el tratamiento S+RFd2, donde se produce un incremento de la actividad del 676% respecto al suelo control. A pesar de que la actividad de esta enzima tendía a disminuir con el tiempo, al final del experimento se sigue apreciando una alta disponibilidad de sustrato para esta actividad enzimática en todos los suelos enmendados, siendo este aumento de actividad de 100% y 133% en los suelos enmendados con RC a d1 y d2, respectivamente, y de 133% y 168% en los suelos tratados con RF a d1 y d2, respectivamente, respecto al suelo control (Figura 4.3.7).

En cuanto a la actividad glicina aminopeptidasa, sólo se observó un incremento significativo de la actividad de esta enzima con respecto al control en el tratamiento de S+RFd2, tanto al inicio como al final del experimento (Figura 4.3.7).

La actividad polifenol oxidasa, enzima que juega un papel clave en la dinámica del carbono en el suelo debido a su implicación en los procesos de humificación y despolimerización (Freeman, 2004), se comportó de forma contraria a la tendencia observada para las actividades  $\beta$ -glucosidasa y glicina aminopeptidasa. Así, la actividad de esta enzima en los suelos enmendados presentó, tanto al inicio como al final del experimento, valores menores que los del suelo control, presentando los menores valores, los tratamientos de dosis alta (d2) (Figura 4.3.7). Esta enzima mostró una clara correlación negativa con el contenido de carbono orgánico total, carbono hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles. Así, al final de la incubación, el

tratamiento S+RCd2 que era el que mostraba los valores más elevados de  $C_{org}$  y C hidrosoluble, mostraba los valores más bajos de actividad polifenoloxidasas.

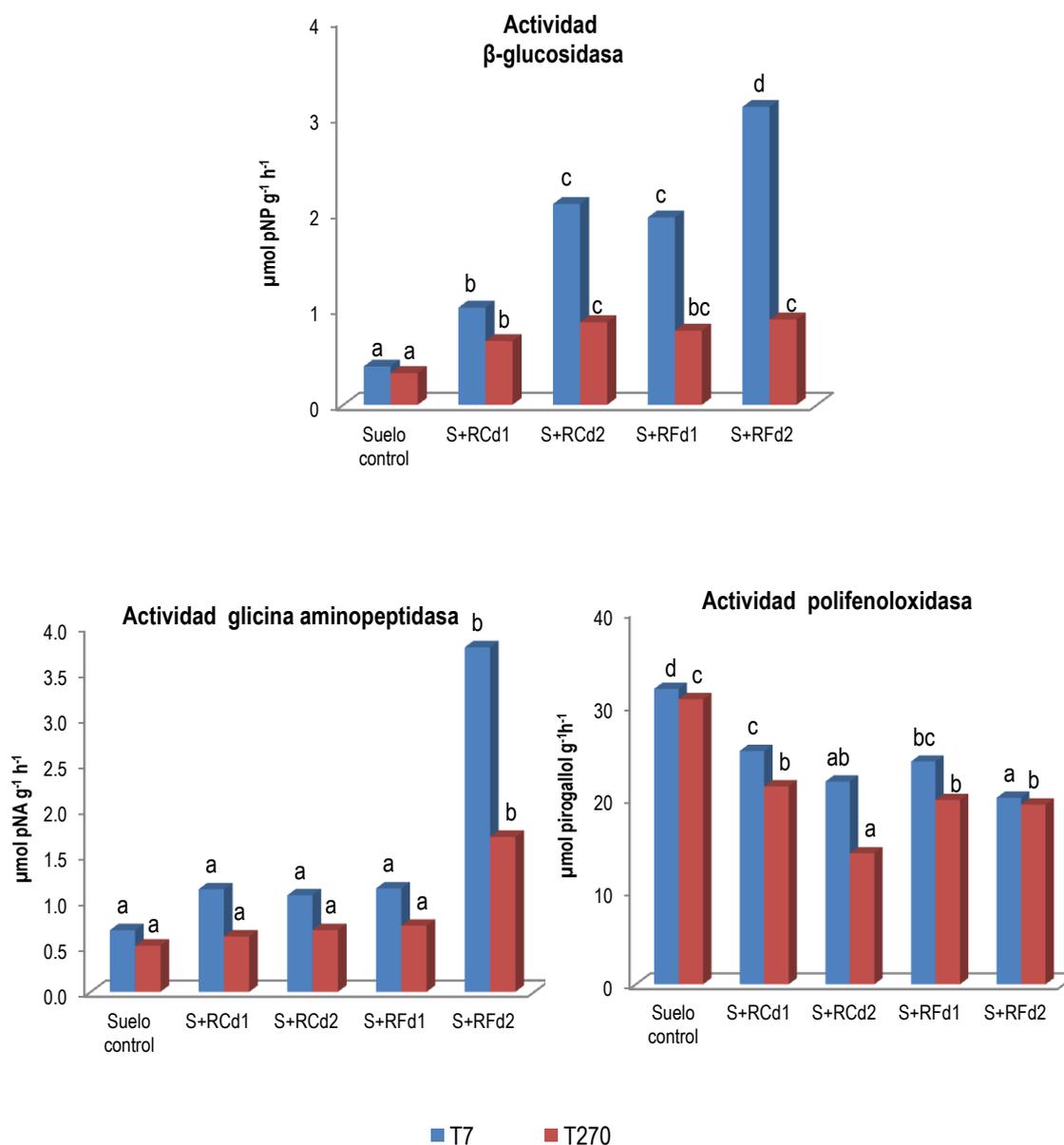


Figura 4.3.7. Cambios en las actividades  $\beta$ -glucosidasa, glicina aminopeptidasa y polifenol oxidasas en el suelo control y en los suelos enmendados. S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. 7 (T7) y 270 (T270) días después de la enmienda. Para cada tratamiento la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey  $p \leq 0,05$ .

Estos resultados sugieren que las enmiendas incorporadas al suelo contienen los sustratos específicos de estas enzimas que estimulan la mineralización, y de ahí los valores elevados de actividad inicialmente.

Después, se va tendiendo hacia un equilibrio al ir disminuyendo dichos sustratos, si bien, pueden aparecer nuevos sustratos procedentes de la degradación de sustratos más complejos.

### **Actividad general y específica de las poblaciones microbianas en las diferentes fracciones de tamaño de partícula del suelo**

#### **Respiración basal y actividad deshidrogenasa**

Los valores de respiración basal (RB) en las diferentes fracciones de los suelos recién enmendados eran significativamente más altos que en los de las respectivas fracciones del suelo control y aunque los valores de RB disminuían con el tiempo, los suelos enmendados mantuvieron en todas sus fracciones de diferente tamaño de partícula valores superiores a los de las respectivas fracciones del control al final del periodo de incubación (Tabla 4.3.6).

Inicialmente, los mayores valores de RB se detectaron en la fracción de arena gruesa seguida de la fracción de arcilla, y al final del experimento esta tendencia se invierte observándose mayores valores para la fracción de arcilla que para la fracción de arena gruesa.

Para la actividad deshidrogenasa (ADH) también se observó que los valores de actividad en todas las fracciones de los suelos enmendados eran superiores a los del suelo control, tanto al inicio como al final del periodo experimental, a pesar de que los valores de ADH disminuían con el tiempo. En todos los tratamientos, los mayores valores de ADH, tanto al inicio como al final de la incubación se observaron en la fracción arcilla (Tabla 4.3.6).

Inicialmente los valores de ADH eran superiores en la fracción de arena gruesa que en la fracción de limo, pero al final del experimento esta tendencia se invierte, siendo los valores de ADH en la fracción de limo similares e incluso superiores a los de la fracción de arena gruesa, lo que sugiere que los sustratos específicos para la actividad de esta enzima se desplazan desde la fracción de arena gruesa hacia las fracciones de limo y arcilla.

Nueve meses después de la adición de la enmienda orgánica los mayores valores tanto de respiración basal como de actividad deshidrogenasa se detectaron, en la fracción arcilla, lo cual coincide con estudios anteriores (Kandeler et al., 1999b; Poll et al., 2003) que indicaban una mayor actividad microbiana en las fracciones más finas del suelo.

Los valores de RB y ADH detectados en la fracción arcilla eran superiores a los encontrados en el suelo completo. Este hecho ha sido también observado por otros autores (Poll et al., 2003; Marhan et al., 2007) y puede ser debido a que los microorganismos que se encontraban asociados a los agregados del suelo son liberados de los mismos y activados por efecto de la sonicación y el tamizado húmedo (Marhan et al., 2007). Esto sin embargo, no ocurre en el suelo completo donde estos microorganismos están inaccesibles y no contribuyen a la actividad del suelo.

**Tabla 4.3.6. Cambios en la actividad deshidrogenasa y en la respiración basal en el suelo control y en los suelos enmendados en las fracciones del suelo.**

	Actividad deshidrogenasa		Respiración basal	
	(µg INTF g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		(mg C-CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	
	T7	T270	T7	T270
<b>Arena gruesa (&gt; 250µm)</b>				
Suelo control	3,93aA	1,53aAB	24,04aA	10,77aB
S+RCd1	12,85bB	4,07bcB	72,56bC	20,46abB
S+RCd2	10,82abA	3,28abB	109,42cB	30,62dB
S+RFd1	10,78abB	3,30bAB	101,62bcA	23,07bcB
S+RFd2	15,24bB	5,48cB	125,77cB	38,39cdAB
<b>Arena fina (250-63 µm)</b>				
Suelo control	2,90aA	0,83aA	5,35aA	5,03aA
S+RCd1	3,99abA	2,32bcA	26,97bAB	12,84bA
S+RCd2	5,23bA	1,76abA	37,45bA	15,69bcA
S+RFd1	4,04abA	3,08cA	26,13bA	12,82bA
S+RFd2	5,17bA	2,87bcA	33,55bA	18,40cA
<b>Limo (63-2 µm)</b>				
Suelo control	3,87aA	1,74aAB	8,22aA	5,68aA
S+RCd1	7,78bA	3,71bB	21,55abA	14,12bA
S+RCd2	7,20bA	5,03cdC	38,50bA	20,42cdAB
S+RFd1	6,70bA	4,27bcB	25,08abA	14,50bcA
S+RFd2	8,38bAB	5,44dB	36,28bA	21,32dA
<b>Arcilla (2-0,1 µm)</b>				
Suelo control	8,62aB	2,49aB	17,06aA	9,44aAB
S+RCd1	18,27bC	7,54bC	43,13abB	22,93abB
S+RCd2	21,94bB	11,68cD	117,40cB	44,41bcC
S+RFd1	17,93bC	6,74bC	54,00bA	24,29abB
S+RFd2	32,35cC	11,08cC	98,26cAB	53,00cB

S+RC (suelo + compost); S+RF (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. 7 (T7) y 270 (T270) días después de la enmienda. Letras minúsculas indican diferencias entre tratamientos para un mismo tiempo y fracción y letras mayúsculas diferencias entre las fracciones para un mismo tratamiento y tiempo de muestreo. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ; test Tukey).

### Actividades específicas en los suelos fraccionados: actividades enzimáticas

Al final del periodo experimental, la actividad  $\beta$ -glucosidasa era, en general, mayor en todas las fracciones de los suelos enmendados que en las del suelo control. La actividad de esta enzima en las fracciones de los suelos enmendados con RF tendía a ser mayor que en las de los suelos enmendados con RC, aunque las diferencias no eran siempre estadísticamente significativas (Figura 4.3.8; Anexo III; Tabla III.7).

Inicialmente, los valores más altos de actividad  $\beta$ -glucosidasa se encontraron en la fracción de arena gruesa y en la fracción de arcilla, pero mientras que en los suelos enmendados a d1, la actividad era mayor en la fracción de arena gruesa, los suelos enmendados a d2 presentaban mayores valores en la fracción de arcilla que en la fracción de arena gruesa (Figura 4.3.8). Al final del periodo de incubación, las actividades más altas se encontraron, en general, en la fracción de arcilla seguida por la fracción de limo.

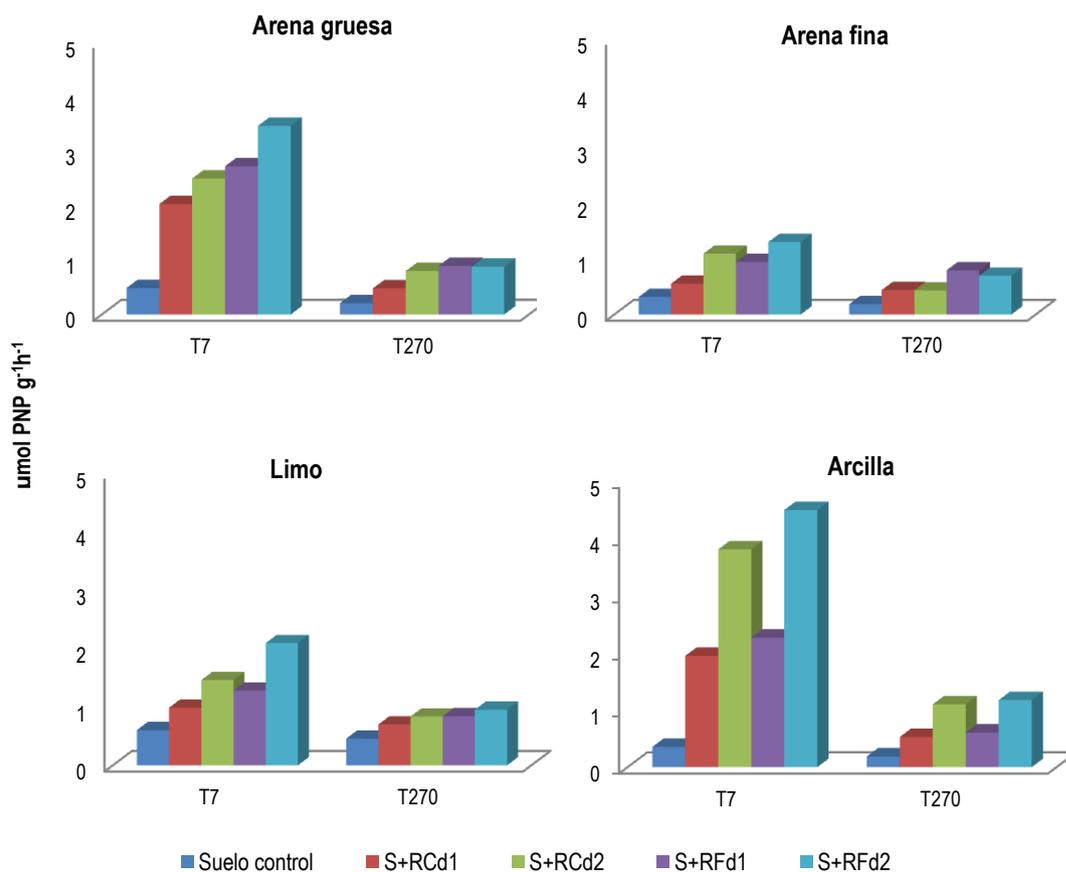


Figura 4.3.8. Cambios con el tiempo la actividad  $\beta$ -glucosidasa en las diferentes fracciones del suelo. S+RC (suelo + compost); S+RF (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. 7 (T7) y 270 (T270) días después de la enmienda.

Los suelos enmendados también presentaban mayores valores de actividad glicina aminopeptidasa (GAP) al final del experimento, en todas las fracciones de tamaño de partícula que el suelo control, aunque no siempre estas diferencias eran estadísticamente significativas (Figura 4.3.9; Tabla III.8 del Anexo). Al igual que en la actividad  $\beta$ -glucosidasa los valores más altos de la actividad GAP se encontraron inicialmente en las fracciones de arena gruesa y de arcilla, mientras que al final del periodo de incubación, las actividades más altas se detectaron en la fracción de arcilla.

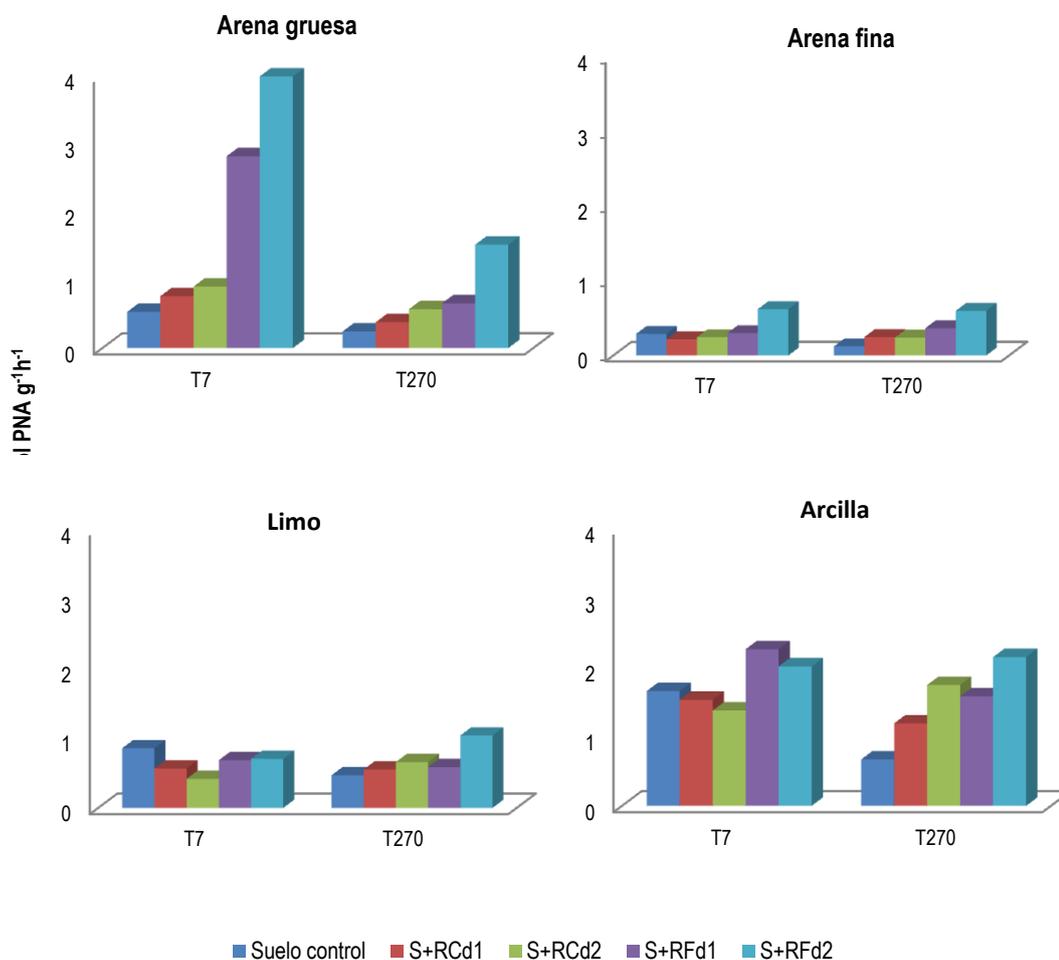


Figura 4.3.9. Cambios con el tiempo la actividad glicina aminopeptidasa en las diferentes fracciones del suelo. S+RC (suelo + compost); S+RF (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. 7 (T7) y 270 (T270) días después de la enmienda.

Los suelos enmendados mostraron valores más altos que el suelo control, para la actividad polifenol oxidasa (PFO), en las fracciones de arena gruesa y arena fina, tanto al principio como al final de la incubación, mientras que estos valores de PFO para las fracciones de limo y arcilla fueron, inferiores a los del suelo control tanto al inicio como al final de la incubación (Figura 4.3.10; Tabla III.9 del Anexo).

El comportamiento de las diferentes enzimas en las distintas fracciones del suelo depende de la localización de los microorganismos del suelo y de sus sustratos. Así, las actividades  $\beta$ -glucosidasa y GAP se distribuyeron a través de las diferentes fracciones del suelo, en gran parte, en relación a la proporción de concentración de  $C_{org}$ . La mayor actividad que presentan estas dos enzimas, tanto para el suelo completo como para las fracciones del suelo, en los suelos enmendados con RF en relación a los suelos enmendados con RC es debido a que el RF proporciona una mayor cantidad de sustratos fácilmente biodegradables que el RC.

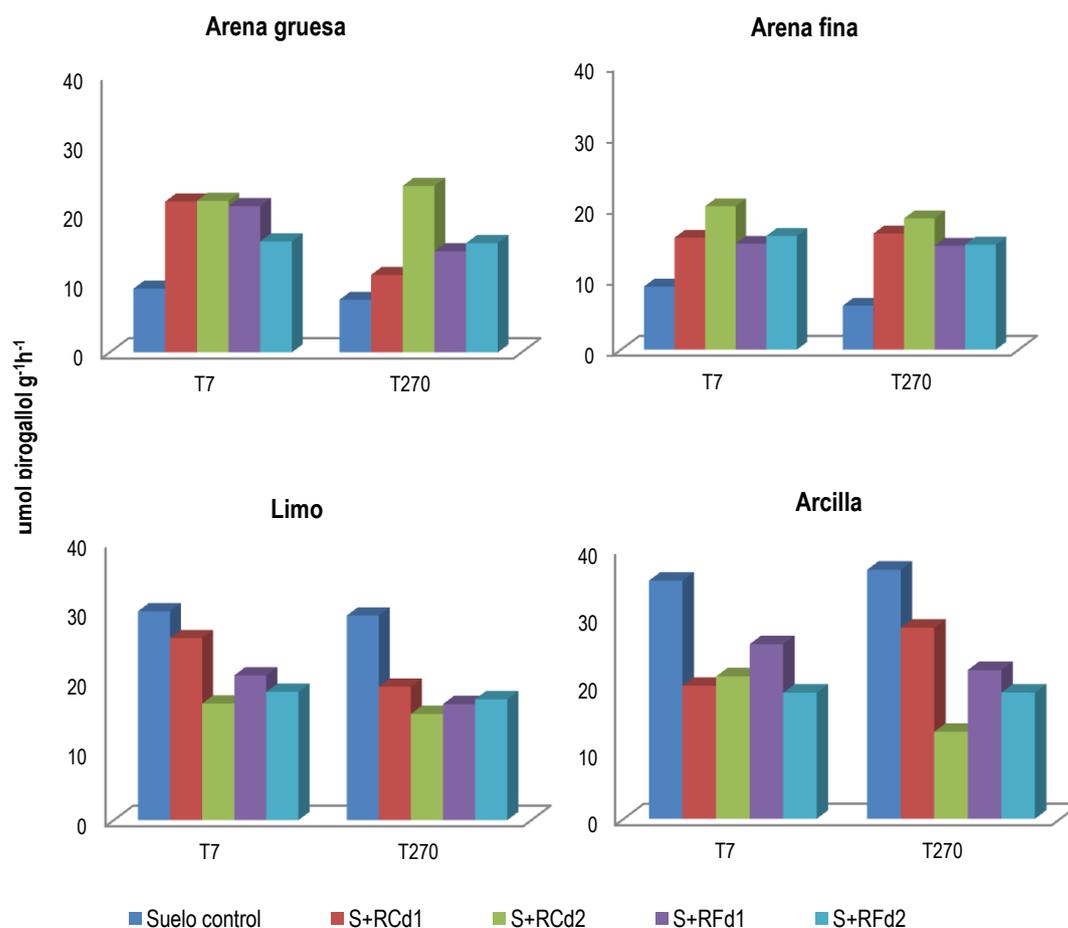


Figura 4.3.10. Cambios con el tiempo la actividad polifenol oxidasa en las diferentes fracciones del suelo. S+RC (suelo + compost); S+RF (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. 7 (T7) y 270 (T270) días después de la enmienda.

Puesto que las enzimas extracelulares catalizan la mineralización de la materia orgánica, provocando una disminución en la concentración de  $C_{\text{org}}$  del suelo, podríamos presuponer que la actividad enzimática sería mayor en las fracciones de suelo que presenten una mayor materia orgánica mineralizable, como ocurre en la fracción de arena gruesa y presentaría una menor actividad en las fracciones de limo y arcilla, donde esta materia orgánica está protegida y la mineralización es menos viable. Sin embargo, se observó al final del experimento, que las actividades más altas  $\beta$ -glucosidasa, GAP y PPO se detectaron en las fracciones de arcilla (con valores similares o incluso más altos que en las fracciones gruesa). Esto sugiere que, o estas enzimas están estabilizadas en la superficie de las arcillas y/o se han producido cerca de las partículas arcillosas (Allison, 2006), o que existe una disposición mayor de sustratos en estas fracciones.

Zimmerman et al. (2004) indicaron que si ambos, las enzimas y el  $C_{\text{org}}$  se inmovilizan sobre o dentro de los minerales del suelo, las enzimas pueden coexistir con los sustratos de carbono sin degradarlos. Allison & Jastrow (2006) sugirieron que las fracciones minerales pueden contener pequeños depósitos de C lábil que elevan el contenido de C y sostienen elevadas actividades enzimáticas a pesar de la predominancia de depósitos de C con una lenta mineralización. Los sustratos de C, fácilmente asimilables por los

microorganismos, añadidos con la enmienda estimularan la producción de enzimas pero una gran parte de la actividad enzimática puede quedar aislada de los sustratos carbonados debido a la formación de agregados y a la estabilización de dichos sustratos en la fracción mineral del suelo.

Al igual que se había observado para la RB y la ADH, los valores de actividad glicina aminopeptidasa en la fracción arcilla excedían a los del suelo completo, lo cual sugiere la liberación, bien del sustrato, o bien de la enzima que se encontraban protegidos en las partículas de arcilla.

La correlación negativa encontrada entre la actividad PFO y el contenido de  $C_{org}$  en el suelo completo también se observó en las fracciones de tamaño de partícula más finas, en particular en la fracción de arcilla donde al final del periodo experimental los tratamientos que mostraban un mayor contenido  $C_{org}$  exhibían los valores más bajos de PFO. Así, S+RCd2 que mostraba el mayor contenido de  $C_{org}$  en la fracción de arcilla, también mostraba la menor actividad PFO en esta fracción, sin embargo, no se observó dicha relación negativa en las fracciones de arena. Esto está de acuerdo con Allison & Jastrow (2006), quienes indicaron que la potencial actividad de la PFO en la fracción arcilla depende de los procesos de absorción mineral más que de la disponibilidad de sustratos de C.

Contrariamente al comportamiento de la actividad PFO, los valores más altos de actividad GAP se encontraron en la fracción arcilla de los suelos enmendados con la dosis d2, en concordancia con los mayores contenidos de N detectados en esta fracción.

La relación negativa encontrada entre estas dos enzimas (PFO y GAP) podría indicar una competencia entre ellas por la superficie de la arcilla, pero también podría ser debida a la inhibición de la enzima PFO como resultado de una alta disponibilidad de N y el consecuente aumento de la actividad GAP (Sinsabaugh et al., 2002).

El comportamiento opuesto que presentan las enzimas GAP y PFO podría también explicarse por un efecto degradativo de la creciente actividad GAP (una proteasa) sobre la enzima PFO (una proteína) antes de que ésta pueda estabilizarse en las superficies minerales. Esto explicaría el hecho de que la actividad PFO en las fracciones de limo y arcilla de los suelos enmendados, las cuales muestran los valores más elevados de actividad GAP, sea más baja que la que presentan estas fracciones en el suelo control.

Los datos derivados de este ensayo de incubación pueden ser interpretados como que la mayor parte de las poblaciones microbianas se encuentran realmente activas, confirmando que las enmiendas que se emplean tienen una gran capacidad biológica. También pudimos observar que es en las fracciones del suelo que contienen mayor cantidad de carbono donde se pueden encontrar gran parte de los sustratos que estimulan la síntesis y actividad de las enzimas.

#### *Conclusiones parciales:*

*Los suelos semiáridos degradados son capaces de admitir grandes cantidades de materia orgánica procedente de residuos orgánicos urbanos sin perjuicio para el crecimiento y la actividad microbiana del suelo y sin riesgos para el medio ambiente, siempre y cuando estos residuos orgánicos urbanos tengan la suficiente calidad. La adición de estos residuos contribuye de este modo tanto a la rehabilitación de estos suelos degradados, como a la creación de una reserva de  $C_{org}$  protegido en dichos suelos.*

Vemos así que la actividad de la comunidad microbiana del suelo completo (medida como actividad microbiana general del suelo mediante respiración, contenido de ATP y actividad de diferentes enzimas), incrementó con la aplicación de enmiendas a los suelos degradados, debido posiblemente a los sustratos que introducen en el suelo, los cuales, activan el desarrollo de las poblaciones microbianas y la síntesis de enzimas, generando una mejora de la calidad microbiológica de los suelos receptores.

Con respecto a la actividad microbiana asociada a los distintos tamaños de partícula del suelo presentaron un comportamiento relacionado con la disponibilidad de sustratos, variando en función de la enzima y de la fracción de suelo estudiada. No obstante, estas enzimas parecen encontrarse en gran medida, asociadas a la fracción arcilla del suelo.

### **Incidencia de las enmiendas en la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas del suelo**

Como ya comentamos en el apartado anterior, la adición de enmiendas orgánicas a un suelo semiárido lleva asociada un aumento en la actividad y el desarrollo microbiano de dichos suelos (Bastida et al., 2008). Pero existe poca información sobre la incidencia de la aplicación de dosis altas, como las aplicadas en este estudio, en la estructura y funcionalidad de las poblaciones microbianas del suelo, por ello, hemos creído de interés el profundizar en el estudio, en condiciones controladas de microcosmos, de los cambios producidos por las enmiendas en estudio en la funcionalidad y estructura de las poblaciones microbianas del suelo.

#### **Análisis de la diversidad funcional de las comunidades microbianas del suelo mediante placas Biolog Ecoplate**

Como ya comentamos anteriormente, el Biolog Ecoplate es un sistema automatizado que consiste en microplacas de 96 pocillos, cada uno de ellos conteniendo un medio de cultivo suplementado con una única fuente de carbono distinta, además de otros nutrientes básicos y un indicador colorimétrico, el cual señala el nivel de consumo de cada sustrato orgánico en el medio de cultivo (Garland & Mills, 1991). Este sistema proporciona un patrón de utilización de los diferentes sustratos orgánicos in vitro cuando en cada pocillo de la microplaca se inocula una alícuota de una disolución acuosa de la muestra.

Realizando el mismo tratamiento de los datos que previamente habíamos realizado para el estudio de los suelos de las parcelas de campo, calculamos, con los datos transformados (DT), una curva de crecimiento sigmoideal AWCD (para  $\lambda=595$  nm) vs Tiempo (hrs). Con las diferentes muestras sometidas a estudio enfrentadas en dicha curva, se pretende encontrar un punto de crecimiento comparable entre ellas. Para ello se escogen valores de AWCD que pueden oscilar entre 0,2-0,6. En este caso el valor de AWCD elegido fue 0.25.

En la Figura 4.3.11 se muestra la evolución del desarrollo medio de color observado en los suelos de los diferentes tratamientos a tiempo inicial (T7) y a tiempo final (T270). Podemos observar que inicialmente los suelos enmendados presentaban mayores valores que el suelo control durante todo el tiempo mientras que tras 9 meses de incubación se aprecia que los valores de los suelos enmendados tienden más hacia los

valores del suelo control, siendo este comportamiento más marcado para las dosis bajas de ambos enmendantes.

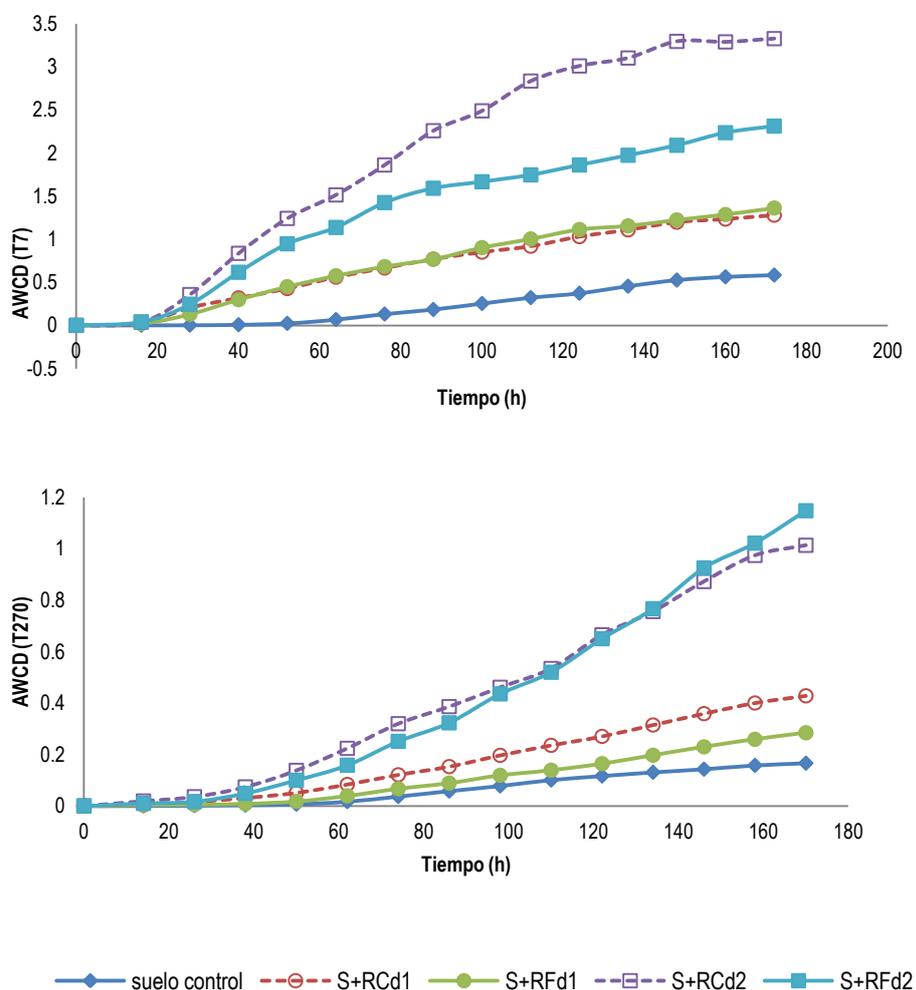


Figura 4.3.11. Representación de la AWCD (Average Well Colour Development) con respecto al tiempo para el suelo control y los suelos enmendados. S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3 % de C orgánico, respectivamente. 7 (T7) y 270 (T270) días después de la enmienda.

De acuerdo con Weber y Legge (2009) los sustratos situados sobre las placas del Biolog Ecoplate se dividieron en seis grupos principales: ácidos carboxílicos, polimeros, carbohidratos, aminoácidos, compuestos fenolicos y aminas.

La Figura 4.3.12 representa la utilización de las diferentes fuentes de carbono para cada cada uno de los cinco grupos por parte del suelo control y de los suelos enmendados.

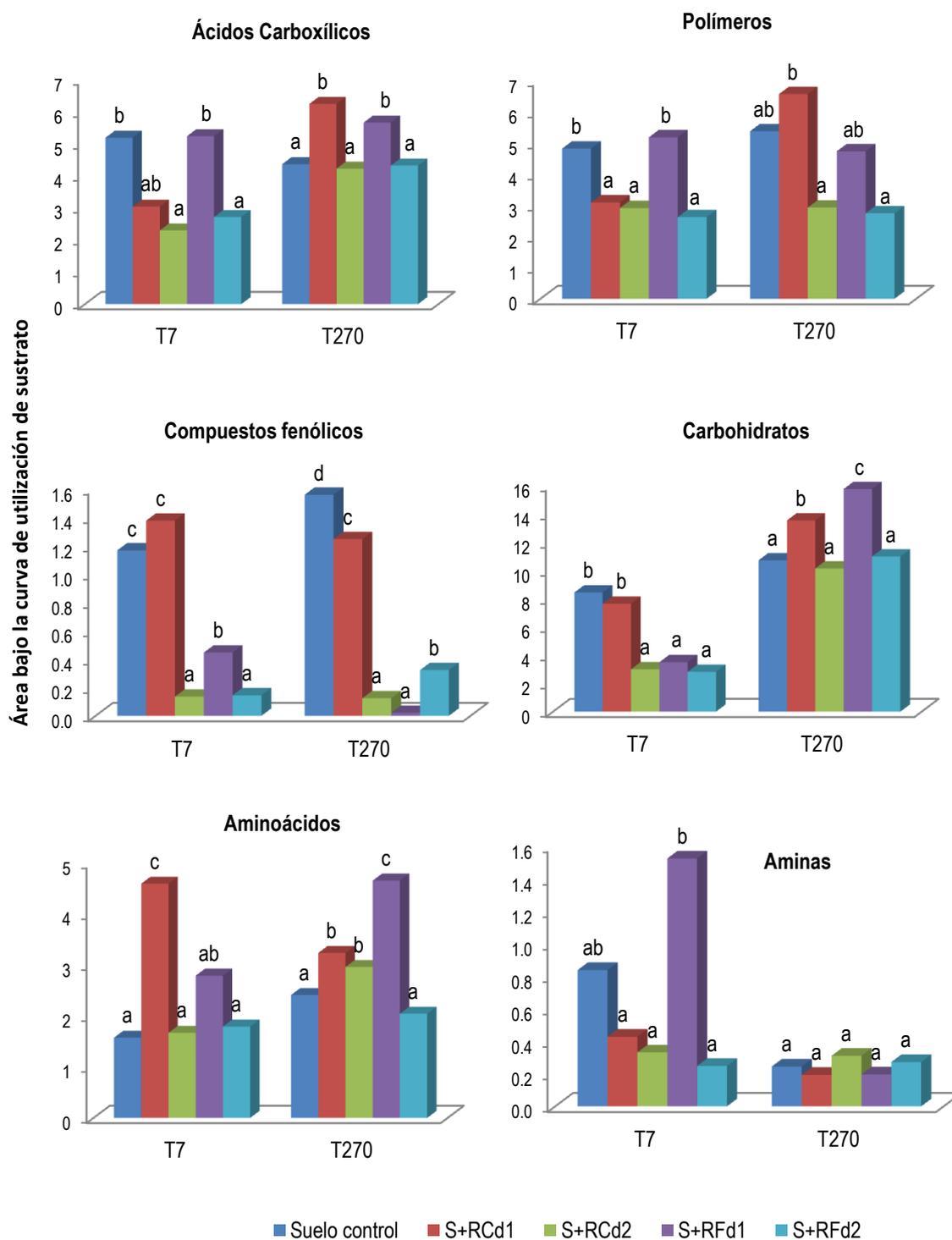


Figura 4.3.12 . Cambios en la utilización de los sustratos de Carbono por parte de las bacterias en el suelo control y los suelos enmendados. S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. 7 (T7) y 270 (T270) días después de la enmienda. Para cada tiempo de muestreo (letra minúscula) la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Como puede observarse, el mayor consumo de sustrato en todos los tratamientos correspondía a carbohidratos y compuestos carboxílicos y los menores a compuestos fenólicos y aminas. Inicialmente (T7), la adición de las enmiendas al suelo alteraba la funcionalidad de la comunidad bacteriana del suelo. Así, excepto en los suelos enmendados con compost en dosis baja, en los suelos enmendados disminuía significativamente el catabolismo de carbohidratos, observándose, asimismo, en los suelos enmendados a d2 un significativo menor consumo de todos los grupos de sustratos ensayados. Sin embargo, el consumo de aminoácidos incrementó significativamente en S+RCd1, y en el suelo tratado con RF a d1 se observó, asimismo, un mayor catabolismo de aminas con relación al control (Figura 4.3.12).

Con el tiempo se observan cambios en la funcionalidad de la comunidad bacteriana de estos suelos. Así, el consumo de carbohidratos a T270 de los suelos enmendados con dosis bajas presentaron un catabolismo de este tipo de compuestos significativamente superior al del control, mientras que los suelos enmendados con dosis altas presentaron un consumo comparable al suelo control; asimismo, el consumo de compuestos carboxílicos en los suelos enmendados a d1 pasaba a ser estadísticamente superior al del suelo control, que no mostraba diferencias con los suelos enmendados a d2 (Figura 4.3.12).

Las principales diferencias en el consumo de sustratos en los suelos enmendados en relación al suelo control al final del periodo de incubación (270 días) residió en un mayor consumo de compuestos carboxílicos, carbohidratos y aminoácidos en los suelos enmendados a d1 y una clara inhibición en todos los suelos enmendados del consumo de compuestos fenólicos.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el experimento de campo, observamos, que si bien existen analogías de comportamiento en relación a la utilización de algunos de los sustratos (fenoles, aminoácidos), se observan ciertas diferencias con respecto a otros (carboxílicos, polímeros, carbohidratos), poniéndose en evidencia la incidencia de la vegetación desarrollada en los suelos de las parcelas del experimento de campo en la funcionalidad de las comunidades del suelo.

Para obtener más información sobre el efecto de los tratamientos sobre la comunidad microbiana, se calculó el índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ), el cual se emplea para conocer la biodiversidad en comunidades biológicas. Es un valor que tiene en consideración tanto el número de especies diferentes como el número de individuos que forman las poblaciones de las diferentes especies dando valores altos. Su fórmula tiene la siguiente estructura:

$$H' = -\sum p_i (\ln p_i)$$

donde  $P_i$  es el la frecuencia relativa del valor normalizado de densidad óptica para un determinado sustrato en un momento determinado.

Como se ha indicado anteriormente, su valor nos indica el grado de incertidumbre que existe para predecir la especie a la cual pertenece un individuo extraído aleatoriamente de la comunidad. La elección de este índice es debido a la sensibilidad que presenta frente a los cambios de la abundancia de las especies.

En este caso, al igual que en el experimento de campo, se ha utilizado como descriptor de la diversidad metabólica de la comunidad; sustituyendo las especies "biológicas", por las especies químicas (formas de carbono a degradar), y la densidad de individuos por la intensidad de la degradación. Así, índices mayores indicarían la capacidad de degradar muchos sustratos diferentes con mucha eficiencia, y un índice bajo, justo lo contrario.

Como se puede ver en la Figura 4.3.13 la enmienda orgánica incrementó inicialmente (T7) la diversidad funcional con relación al control, mostrando todas las enmiendas índices de diversidad significativamente superiores al del control. Sin embargo, tras 9 meses de incubación los valores del índice de diversidad tendían a igualarse al del suelo control, no observándose diferencias significativas entre el suelo control y los suelos enmendados a dosis baja, mientras que los suelos enmendados a las dosis altas seguían presentando valores de  $H'$  significativamente superiores a los del control. Vemos así que este parámetro de diversidad total es significativamente mayor en los suelos enmendados que en los suelos sin enmienda observándose una influencia mayor de la dosis que de la madurez de la enmienda en la funcionalidad estructural de las comunidades bacterianas de este suelo.

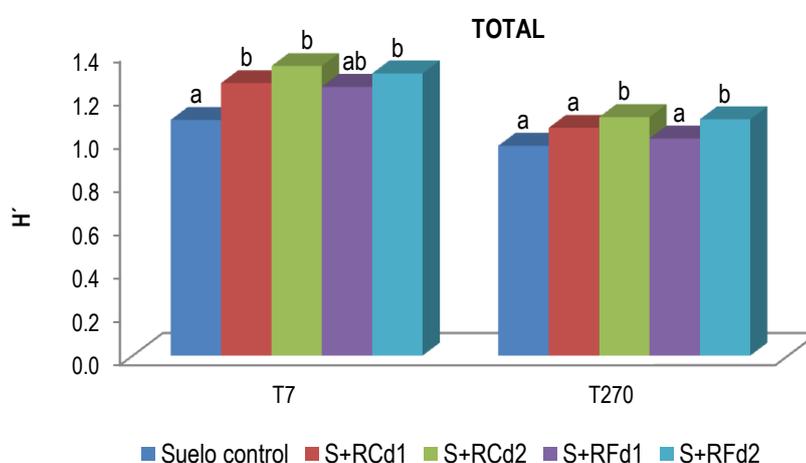
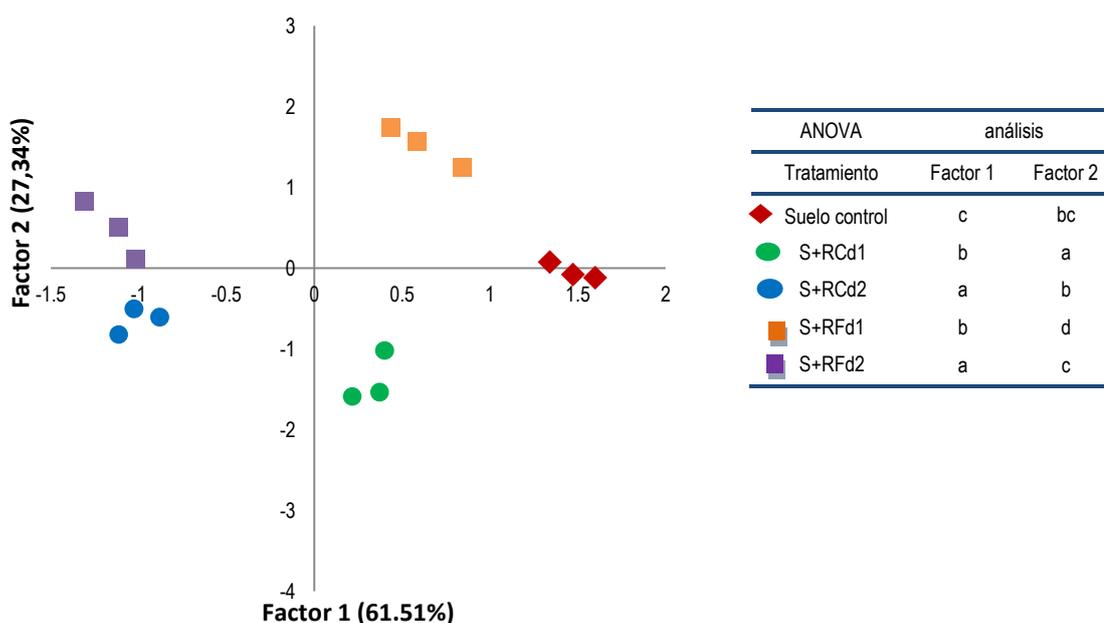


Figura 4.3.13. Índice de la diversidad de Shannon para el suelo control y los suelos enmendados. S+RC (suelo + compost); S+FR (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. 7 (T7) y 270 (T270) días después de la enmienda. Para cada tiempo de muestreo (letra minúscula) la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

El Análisis multivariable de los componentes principales en el espacio canónico o PCA es el método más empleado para la interpretación de los resultados de la CLPP (Community Level Physiological Profile), se trata de un proceso en el que se generan unos nuevos ejes (o componentes principales) que son combinaciones de algunas de las variables que concentran la mayor proporción de la varianza. Es capaz de comparar la similitud relativa de las muestras contrastando los valores de unos pocos componentes principales y evaluar cuál de las variables originales es responsable de los componentes principales analizando las correlaciones de las variables originales con las componentes principales (Galard, 1997).

El estudio del PCA realizado con los resultados del estudio de la CLPP al inicio (7 días después de la enmienda, T7) y final (T270) de la incubación, puso también de manifiesto variaciones en la funcionalidad de las poblaciones bacterianas en función del tiempo, tal como se refleja en las Figuras 4.3.14 y 4.2.15. Para T7 el PCA presentó dos factores: el factor 1, que explicaba el 62% de la varianza observada en los resultados y el factor 2, que se explicaba el 27% (Figura 4.3.14). Para el factor 1 (en el que el mayor peso correspondía a carbohidratos, polímeros y carboxílicos) el análisis de la varianza (ANOVA) de las

coordenadas de ese factor permitió establecer claras diferencias entre el suelo control y los suelos enmendados, observándose una evidente separación entre suelos enmendados con dosis bajas y dosis altas, los cuales se agrupaban separadamente entre sí y separados del control en función de este factor. Por otra parte, con respecto al factor 2, en el que como se observa en la matriz de componentes el catabolismo de aminas tiene el mayor peso, las diferencias se apreciaron tanto entre dosis como entre el tipo de enmienda (Figura 4.3.14). De acuerdo a este factor se podrían diferenciar tres grupos, un primer grupo incluyendo al control y a los tratamientos S+RCd2 y S+RFd2, un segundo grupo con S+RCd1 y un tercer grupo conteniendo a S+RF1.



Matriz de componentes

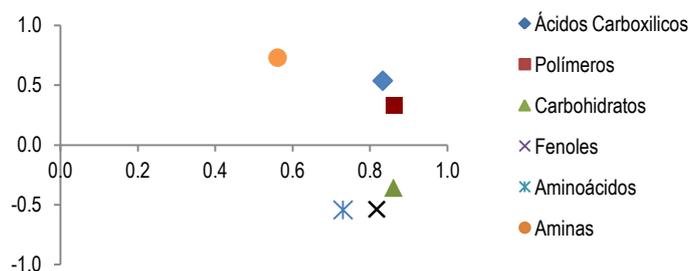


Figura 4.3.14. Análisis de componentes principales del perfil fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) del suelo control y de los suelos enmendados al tiempo inicial de la incubación (T7). S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>-. Para cada Factor, la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a p≤0,05.

El análisis de factores (PCA) realizado con los datos de consumo de sustrato correspondientes a los suelos tras 9 meses de incubación, proporcionó, asimismo, dos factores de los cuales el factor 1 explicaba el 54%

de la varianza de los resultados obtenidos y el factor 2 el 25% (Figura 4.3.15). El análisis de la varianza (ANOVA) del factor 1 mostró una importante diferenciación entre los suelos tratados a dosis altas y los tratados a la dosis más baja, encontrándose menores diferencias entre las dosis bajas y el suelo control. Así, este análisis factorial indicó que según el factor 1 se podían establecer claramente tres grupos diferenciados estadísticamente, un grupo incluyendo los suelos tratados a la dosis más baja de enmienda (S+RCd1 y S+RFd1), otro grupo con el control y un tercer grupo que incluyendo a los suelos tratados a la dosis más alta de ambas enmiendas (S+RCd2 y S+RFd2). Por otro lado, el análisis de la varianza del factor 2 presentaba un comportamiento más ambiguo aunque diferenciaba entre suelo control y suelos enmendados. Según este factor, se podían establecer 4 grupos diferentes, por una parte se separarían independientemente entre sí el control, el tratamiento S+RCd1 y el tratamiento S+RFd1, y en un cuarto grupo se agruparían los suelos tratados con ambas enmiendas a la dosis más alta (S+RCd2 y S+RFd2).

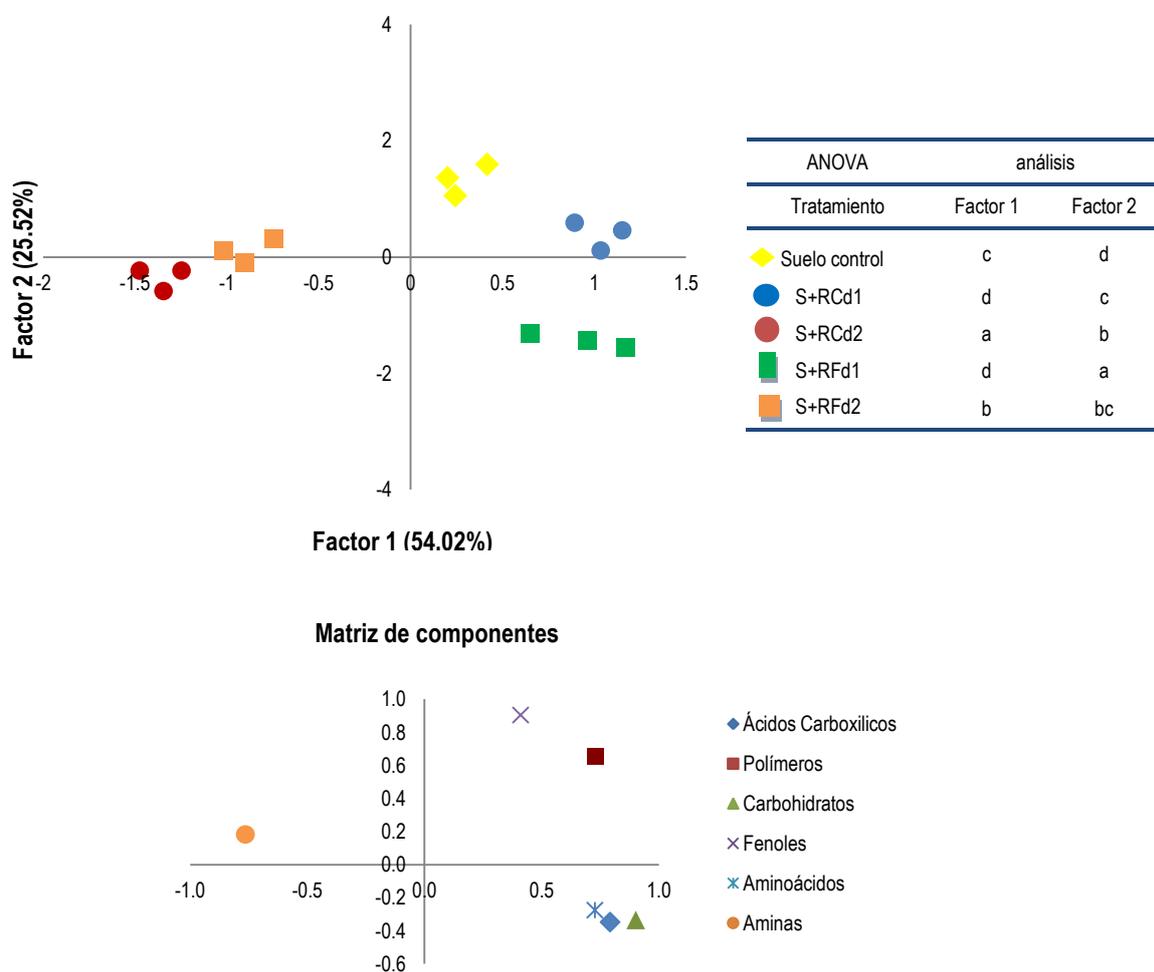


Figura 4.3.15. Análisis de componentes principales del perfil fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) del suelo control y de los suelos enmendados al tiempo final de la incubación (T270). S+RC: suelo con compost; S+RF: suelo con residuo orgánico fresco; d1: 1% C<sub>org</sub>; d2: 3% C<sub>org</sub>. Para cada Factor, la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Las variaciones observadas con la adición de las enmiendas orgánicas en la utilización de los sustratos por parte de la comunidad microbiana de los suelos es explicable por la cantidad y variedad de sustratos orgánicos aportados con dichas enmiendas, ya que es un hecho ampliamente reconocido que el C es un factor clave que regula el crecimiento de microorganismos en el suelo (Hu et al., 2011). Autores como Fisk et al., (2003) encontraron que las tasas de entrada de sustratos lábiles de C podían influir más en la biomasa microbiana del suelo que los niveles de MO. Algunos autores (Chakraborty et al., 2011) han demostrado que la mayoría de los microorganismos del suelo son heterótrofos y que la utilización de fuentes de C por las comunidades microbianas es la fuerza motriz para el funcionamiento del suelo, con efectos sobre el tamaño y las actividades de la biomasa microbiana. Por esto vemos que al inicio de la incubación, momento en el que se produce la mayor disponibilidad de C, tras la incorporación de las enmiendas, los valores encontrados apuntan hacia un incremento en la actividad global de la comunidad microbiana apuntando hacia una mayor diversidad funcional de esta población mientras que transcurridos 9 meses se observan menores valores apuntando hacia una diversidad funcional más semejante al suelo control, coincidiendo con la menor disponibilidad de fuentes de C. Esta relación entre la presencia de enmiendas y el aumento de la diversidad funcional en los suelos ha sido ampliamente demostrada (Gomez et al. 2006; Ros et al., 2008; Frac et al., 2012; Hueso et al., 2012). También Mechri et al. (2007) y Suhadolc et al. (2010) investigaron el efecto a corto plazo de los residuos orgánicos sobre las comunidades microbiana del suelo, indicando que la aplicación de residuos orgánicos y lodos de depuradora puede causar cambios en la estructura de la comunidad microbiana y dar lugar a cambios en la utilización de los diferentes patrones de C en el suelo.

Por otra parte, el hecho de que tras 9 meses de incubación disminuyese en nivel de consumo de sustratos de los suelos enmendados, presentando los suelos enmendados a la dosis más baja índices de diversidad semejantes a los del suelo control, mientras que los de los suelos enmendados a la dosis más alta se mantenían superiores al suelo control, podría ser debido a que estos suelos con dosis altas presentaban una mayor cantidad de sustratos carbonados fácilmente asimilables por los microorganismos incluso tras este periodo de incubación. Autores como Bending et al. (2000) encontraron también relación entre un aumento de la disponibilidad de C orgánico soluble y los cambios que experimentaba la comunidad microbiana en la utilización de los sustratos de C.

Cabe comentar que el hecho que en el estudio previo de parcelas tras 5 años de la incorporación de las enmiendas se observara una mayor diversidad funcional en estos suelos que en el suelo control a diferencia de lo observado en este estudio de incubación, donde en las dosis bajas no se observaron diferencias significativas con el suelo control, puede explicarse por una menor disponibilidad de C orgánico soluble debido a la ausencia de planta en este experimento de incubación, confirmando el importante papel que juega la vegetación presente en las parcelas, a través de sus exudados radiculares, en el incremento de la diversidad funcional de estas comunidades microbianas.

*Podemos resumir diciendo que el suelo mostró inicialmente un incremento en la diversidad funcional de los microorganismos con la incorporación de las enmiendas orgánicas, debido al incremento y mayor disponibilidad de C que provocan dichas enmiendas en el mismo (Hu et al., 2011), lo cual conduce a grandes cambios en la utilización de los sustratos de carbono por parte de los microorganismos (Zhong et*

al. 2010) lo que a su vez, está en consonancia con lo previamente observado en el aumento de las actividades enzimáticas, las cuales apuntaban a una funcionalidad bioquímica mayor. Sin embargo, y debido a nuevos aportes de C y a la ausencia de vegetación, esta diversidad funcional tiende a disminuir, siendo esta disminución dependiente de la dosis aplicada, presentando menor diversidad funcional los suelos enmendados a la dosis más baja que los enmendados a la dosis más alta, no observándose diferencias entre el tipo de enmienda empleada.

### **Análisis de la estructura de la comunidad microbiana mediante PLFAs**

Las membranas celulares de todos los microorganismos están constituidas principalmente por fosfolípidos, los cuales están formados por una región hidrofílica unida a una cadena hidrófoba compuesta por ácidos grasos; excepto en el caso de los procariontes del dominio arqueas donde la región hidrófoba está constituida por moléculas de fitano o biftano. Teniendo en cuenta que los ácidos grasos de fosfolípidos varían en función de cada especie microbiana, el patrón de los diversos ácidos grasos presentes en una muestra puede ser utilizado como “*fingerprinting*” de la comunidad microbiana, proporcionando además, una buena estimación de su biomasa (Gómez-Brandón et al., 2010b). Además, ya que ciertos ácidos grasos son considerados característicos de determinados grupos de microorganismos, su cuantificación relativa permite evaluar la estructura de la comunidad microbiana en base a ellos. No obstante, como se ha comentado anteriormente, hay que tener en cuenta que algunos PLFAs pueden encontrarse en bacterias y en eucariotas, y que incluso PLFAs que se asumen como indicadores de un grupo determinado de organismos pueden encontrarse en pequeña cantidad en otros grupos totalmente diferentes, por lo que la interpretación de los datos debe realizarse con precaución.

En nuestro experimento encontramos que los contenidos de ácidos grasos relacionados con las bacterias Gram<sup>+</sup> como son i14:0, i15:0, a15:0, i17:0 eran significativamente mayores en los suelos enmendados que en el suelo control. De igual modo, los suelos enmendados también presentaban un mayor contenido de PLFAs de bacterias Gram<sup>-</sup>, si bien no se observaron diferencias significativas entre los contenidos de algunos ácidos grasos como cy17 y cy19, relacionados con este grupo de bacterias (Gram<sup>-</sup>) de los suelos enmendados y del control (Tabla 4.3.7 y 4.3.8).

Se ha demostrado que los ácidos grasos se degradan rápidamente en el suelo después de la muerte celular (White et al., 1979; Elfstrand et al., 2007b) y, por tanto, la presencia del ácido graso 18:2 $\omega$ 6 puede responder a la presencia de poblaciones fúngicas viables en el suelo. En nuestro caso vemos que este ácido presentaba mayores valores para los suelos enmendados que para el suelo control, encontrándose diferencias significativas entre los suelos enmendados y suelos sin enmienda pero no encontrándose diferencias significativas entre los suelos enmendados ni respecto a su dosis ni al tipo de enmienda utilizado.

Por otra parte, para el ácido graso 16:1 $\omega$ 5 vemos que la variación que presentan los suelos no se relaciona con la aportación de enmienda, así, el suelo control y los suelos enmendados a la dosis más baja presentan valores significativamente superiores a los que presentan los suelos enmendados a la dosis más alta de enmienda (Tabla 4.3.7). Al tratarse de un experimento carente de vegetación, la presencia de los hongos micorrízicos no puede proliferar a través de la simbiosis de las raíces de las plantas y los hongos.

**Tabla 4.3.7. Abundancia de PLFAs individuales en el suelo control y en los suelos enmendados al final del periodo de incubación.**

PLFA (nmol g <sup>-1</sup> )	Suelo control	S+RCd1	S+RCd2	S+RFd1	S+RFd2
i14	0,00a	0,60b	1,06d	0,77c	0,98d
14;0	1,17a	1,34a	1,73b	1,72b	1,91b
i15	6,19a	7,63b	8,82c	9,08c	9,34c
a15	3,30a	4,01b	5,99d	4,96c	5,75d
15;0	0,28a	0,91ab	0,97b	1,06b	1,07b
i16:0	5,11a	6,47b	6,53b	6,04ab	6,14ab
16:1ω 9	0,77a	1,45ab	1,41ab	1,97b	1,44ab
16:1ω 7c	7,20c	6,43b	6,62b	6,87bc	5,67a
16:1ω 5	2,97bc	3,29c	2,74ab	3,15c	2,41a
16; 0	18,18b	17,52ab	16,11a	16,80ab	16,79ab
10Me16a	7,48b	4,51a	4,79a	4,48a	4,77a
10Me16b	0,51a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
i17	2,85a	3,51bc	3,81c	3,06ab	3,38abc
a17	3,09b	2,80ab	3,01ab	2,61a	2,76ab
cy17	2,44a	1,99a	2,32a	2,12a	2,17a
17;0	2,46b	1,14a	0,88a	1,02a	0,98a
br18	0,00a	0,00a	0,52b	0,05a	0,39ab
10Me17	0,24a	0,88b	0,83b	0,82ab	0,88b
18;2 ω 6	2,54a	4,32b	4,65b	4,79b	4,68b
18:1ω 9	10,14a	13,90c	11,67ab	13,01bc	13,11bc
18:1ω 7	12,56b	7,84a	6,96a	7,27a	7,15a
18; 0	4,00b	3,58ab	2,88a	3,00a	2,92a
10Me18	3,22a	3,36a	2,95a	2,78a	2,55a
cy19	3,18a	2,41a	2,67a	2,47a	2,64a

S+RC (suelo + compost); S+RF (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. Para cada tratamiento (letra minúscula) la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Si analizamos más detalladamente el perfil fosfolipídico, observamos que el suelo control presentaba valores de abundancia de PLFAs bacterianos, PLFA fúngico, bacterias Gram<sup>+</sup> y Gram<sup>-</sup>, y de PLFA saturados y monoinsaturados, significativamente inferiores ( $p \leq 0,05$ ) a los de los suelos enmendados observándose valores significativamente más altos de PLFAs en los suelos enmendados a la dosis más alta, con independencia del tipo de enmienda, no observándose, en general, diferencias entre las enmiendas a igualdad de dosis (Tabla 4.3.8).

Algunos estudios han constatado un incremento en ácidos grasos monoinsaturados con la adición de materiales orgánicos (Bossio & Scow, 1998; Lundquist et al., 1999) por lo que este tipo de ácidos grasos parece ser sensible a la disponibilidad de sustratos (Peacock et al., 2001; Bohme et al., 2005). En nuestro experimento se observó un aumento significativo de los PLFAs monoinsaturados y saturados en los suelos enmendados con respecto al suelo control (Tabla 4.3.8).

**Tabla 4.3.8. Abundancia de bacterias, hongos, Gram+, Gram-, concentración de PLFAs saturados y monoinsaturados en el suelo control y en los suelos enmendados al final del periodo de incubación.**

PLFA (nmol g <sup>-1</sup> )	Suelo control	S+RCd1	S+RCd2	S+RFd1	S+RFd2
Bacterias	8,84a	38,67b	91,39c	43,09b	83,64c
Bacterias Gram <sup>+</sup>	4,66a	20,93b	54,96d	24,48b	48,39c
Bacterias Gram <sup>-</sup>	4,17a	17,74b	36,42c	18,60b	35,25c
Hongos	0,67a	4,16b	10,12c	5,07b	9,19c
PLFA saturados total	13,86a	52,22b	124,08c	57,88b	111,81c
PLFA monoinsaturados total	12,02a	40,36b	83,04c	42,66b	74,73c

S+RC (suelo + compost); S+RF (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1,1% y 3,3 % de C orgánico, respectivamente. Para cada tratamiento (letra minúscula) la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

Se observó un incremento significativo en la cantidad de PLFA totales en los suelos enmendados con respecto al suelo control, no apreciándose diferencias significativas con respecto a los tratamientos, pero sí entre las dosis (Figura 4.3.15). Vemos que para las dosis bajas, la cantidad de PLFA totales en los suelos enmendados aumenta con respecto al suelo control siendo 3,6 superior el valor para S+RCd1 y 4 veces superior para S+RFd1 con respecto al suelo control, mientras que para las dosis altas los incrementos son 8,2 veces superior para S+RCd2 y 7,4 veces superior para S+RFd2, vemos así que al aplicar dosis tres veces superiores a las dosis medias, el incremento que experimenta la cantidad total de PLFA oscila entre 2,25 y 1,86 en las dosis altas con respecto a las dosis medias, observándose que no se produce un incremento proporcional al incremento de dosis aplicada.

Con respeto a la relación bacterias/hongos, se pone de manifiesto el mayor incremento de la comunidad fúngica en relación a la población bacteriana de los suelos provocado por las enmiendas, que determina que el valor de esta relación en el suelo control sea significativamente mayor que el de los suelos enmendados (Figura 4.3.15). Entre los suelos enmendados no se aprecian diferencias significativas al producirse un incremento semejante en las comunidades bacterianas y fúngicas con los dos tipos de enmienda.

El cociente PLFAs Gram<sup>+</sup>: PLFAs Gram<sup>-</sup> era mayor en los suelos enmendados que en el suelo control (Figura 4.3.15) ya que las enmiendas incrementaban las bacterias Gram<sup>+</sup> en mayor proporción que las Gram<sup>-</sup>, siendo este cociente mayor a la dosis más alta sin que se apreciaran diferencias significativas entre los dos tipos de enmienda. La relación entre PLFA saturados y monoinsaturados mostró una tendencia similar, presentando valores significativamente mayores en los suelos enmendados, observándose diferencias entre dosis pero no entre tratamientos.

Los valores del cociente G<sup>+</sup>:G<sup>-</sup> indicaron un desarrollo preferencial de bacterias Gram<sup>+</sup> en los suelos enmendados con relación al suelo control. El mayor desarrollo de este grupo bacteriano podría ser interpretado como un cambio desde unas poblaciones microbianas quimiolitotróficas (Schlegel, 1992) hasta a una comunidad heterotróficas con el incremento del contenido de carbono (Tscherko et al., 2004). Muchas de estas bacterias Gram<sup>+</sup> tienen capacidad de esporular, como por ejemplo *Actinomycetes*, *Bacillus*, *Clostridium*, etc (Schlegel, 1992). La importancia de los ácidos grasos de Gram<sup>+</sup> en el análisis de factores de PLFAs muestra que este grupo de bacterias tiene una importancia fundamental en la funcionalidad del

suelo y en la estructura de la comunidad microbiana, lo cual no sería extraño en zonas mediterráneas puesto que las condiciones ambientales pueden favorecer la presencia de las bacterias más resistentes: las endosporuladas. La presencia de coeficientes de correlación positivos y significativos entre el cociente entre PLFAs de bacterias Gram<sup>+</sup> y PLFAs de Gram<sup>-</sup>, con parámetros como carbono de biomasa microbiana, respiración, ATP, carbono orgánico total, carbono hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles apoya el hecho de que las bacterias Gram<sup>+</sup> llevan a cabo un papel importante en la funcionalidad de suelos semiáridos (Bastida et al., 2008).

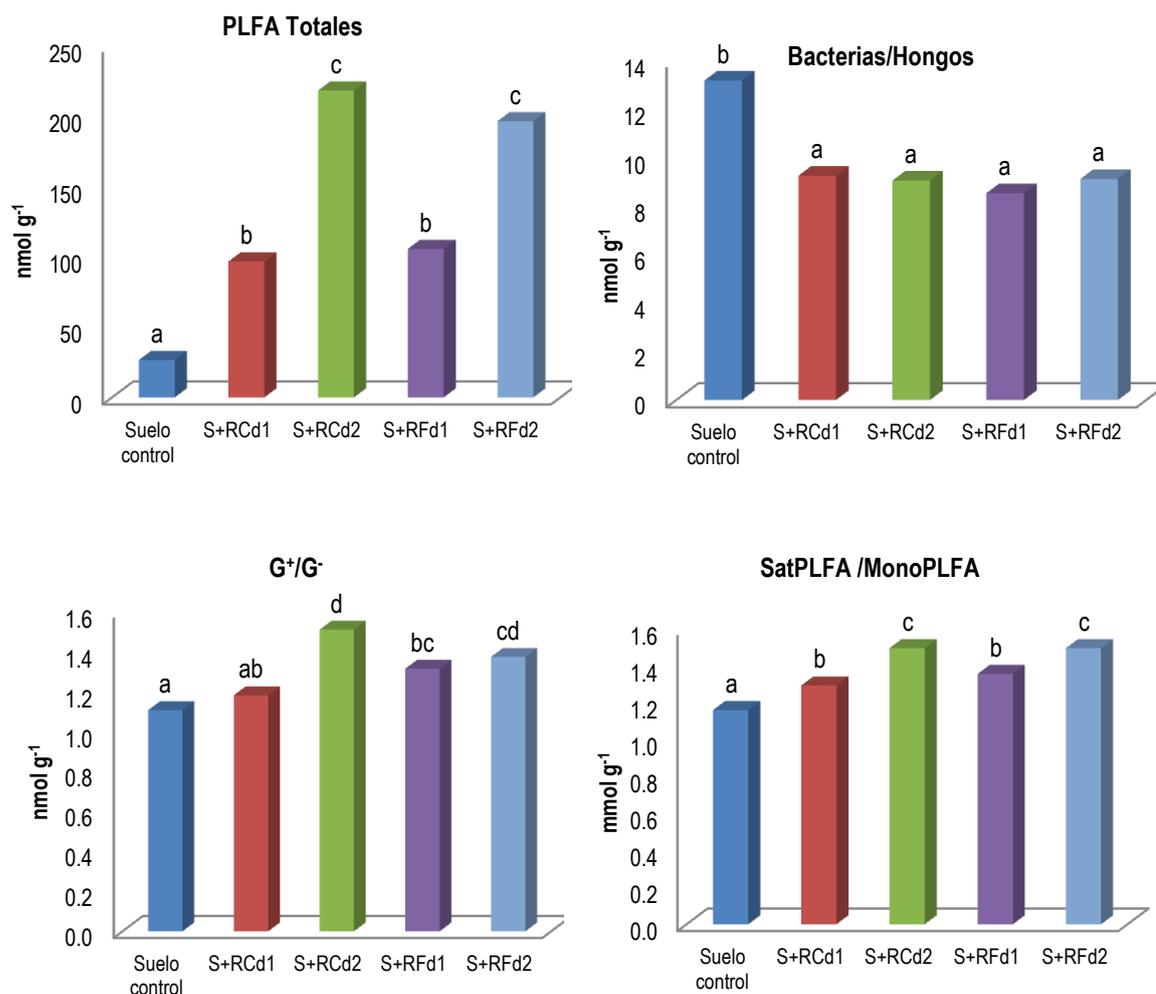
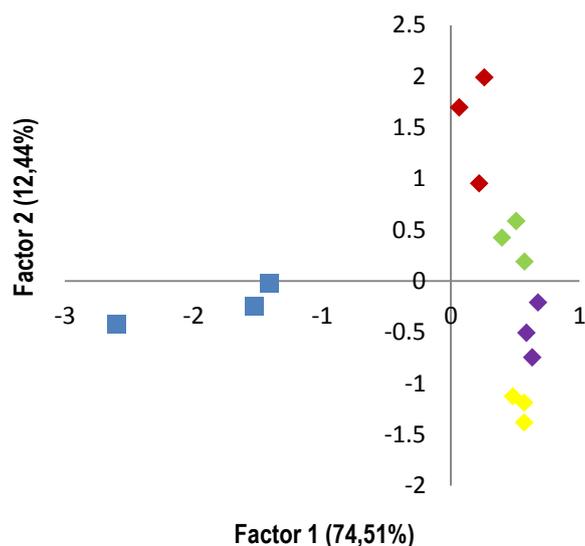


Figura 4.3.16. PLFA totales y relaciones bacterias/hongos, Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> PLFAsaturados/PLFAmonoinsaturados en el suelo control y en los suelos enmendados al final del periodo de experimentación. S+RC (suelo + compost); S+RF (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. Para cada tratamiento (letra minúscula) la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a p≤0,05.

La adición de enmiendas orgánicas provocó en una clara alteración de la estructura de la comunidad microbiana, tal y como se desprende de los resultados del análisis de factores realizado con los 23 PLFAs que se han determinado. Este análisis de componentes principales (PCA) proporcionó dos factores: el factor 1 que explica casi el 75% de la varianza y el factor 2 que explica el 12%. El peso de cada ácido graso en cada factor se muestra en la Figura 4.3.17. Para el factor 1 el test ANOVA encuentra diferencias

significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el suelo control y los suelos enmendados, no encontrándose diferencias atribuibles al tipo de enmienda o a la dosis empleada. El factor 2, en cambio, discrimina entre tratamientos y dosis de aplicación, encontrándose diferencias significativas entre los suelos enmendados con RC y los enmendados con RF, así como entre los suelos tratados a d1 y d2 en el caso del RC.

Factores de carga		
Parámetros	Factor 1	Factor 2
i14:0	0,92	-0,31
14:0	0,81	-0,39
i15:0	0,90	-0,19
a15:0	0,84	-0,53
15:0	0,87	0,07
i16:0	0,81	0,30
16:1w9	0,56	0,20
16:1w7c	-0,62	0,15
16:1w5	-0,24	0,68
16:0	-0,73	0,52
10:Me16a	-0,93	-0,18
i17:0	0,67	-0,03
a17:0	-0,53	-0,17
cy17:0	-0,63	-0,39
17:0	-0,71	0,08
br18:0	0,45	-0,70
10:Me17	0,83	0,20
18:2w6	0,90	0,05
18:1w9	0,71	0,68
18:1w7	-0,99	0,03
18:0	-0,73	0,44
10:Me18	-0,34	0,52
cy19:0	-0,81	-0,24



ANOVA	análisis	
	Factor 1	Factor 2
■ Suelo control	a	b
◆ S+RCd1	b	c
◆ S+RCd2	b	a
◆ S+RFd1	b	b
◆ S+RFd2	b	ab

Figura 4.3.17. Análisis de factores con los PLFAs analizados en los suelos enmendados y el control. S+RC (suelo + compost); S+RF (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. Para cada tratamiento (letra minúscula) la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey MDS a  $p \leq 0,05$ .

Al igual que se observó en las parcelas del experimento de campo, la incorporación de enmiendas orgánicas al suelo ha provocado cambios en la estructura de su comunidad bacteriana y fúngica estando, en este experimento, estos cambios más influenciados por la dosis de enmienda empleada que por la naturaleza de la enmienda.

Al igual que hiciéramos al estudiar la comunidad microbiana en las parcelas experimentales, se realizaron también en estos suelos medidas de actividad bacteriana y fúngica basadas en la incorporación de sustratos radiactivos, técnicas que nos permiten ampliar los conocimientos de la abundancia de estas poblaciones teniendo una visión del crecimiento que se produce en estas comunidades.

La técnica utilizada para estimar el crecimiento bacteriano fue, al igual que en las parcelas de campo, el empleo de incorporación de leucina radiomarcada ( $^3\text{H}$ -leucina) durante la síntesis proteica y la utilización de la posterior tasa de síntesis de proteínas por parte de las bacterias como indicador de la actividad bacteriana (Bääth, 2001). Asimismo, la estimación del crecimiento fúngico se realizó mediante la adición de  $^{14}\text{C}$  a una suspensión del suelo, tal y como se describió en el experimento de campo.

De igual modo, se cuantificó también en estos suelos el contenido total de ergosterol, molécula que como se ha indicado anteriormente, es fundamental en el crecimiento de los hongos, ya que sólo se presenta en células vivas, empleándose como bioindicador de la biomasa fúngica activa (Lees et al., 1995; Grant y West, 1986; Frostegard y Baath, 1996).

Con respecto al crecimiento bacteriano (estimado a través de la incorporación de Leucina) los suelos enmendados presentaros valores significativamente superiores al suelo control, siendo este incremento superior en las dosis altas, no observándose un comportamiento diferente entre tratamientos a igualdad de dosis (Figura 4.3.18).

En cuanto al contenido en ergosterol del suelo, la molécula de esteroles y su cuantificación, actualmente, se está empleando como indicador tanto del contenido de biomasa fúngica como del crecimiento de estos hongos en el suelo (Hart & Reader, 2002). En este trabajo, se ha determinado el contenido de ergosterol en el suelo como parámetro indicador de la respuesta de las poblaciones de hongos a la adición de materia orgánica, para evaluar la estimulación del crecimiento de la población fúngica del suelo (no para cuantificar biomasa fúngica).

Los resultados obtenidos, ponen de manifiesto el notable efecto bioestimulante de los distintos tratamientos, siendo especialmente altos los valores para los suelos enmendados a la dosis alta. Así, todos los suelos enmendados mostraron contenidos de ergosterol significativamente superiores a los del suelo control (Figura 4.3.18).

Si se analiza el efecto de la dosis, se aprecia que los resultados son los esperados: los suelos enmendados a la dosis más baja presentan un crecimiento fúngico entre 1,7 y 2,1 superior al del suelo control, para S+RCd1 y S+RFd1, respectivamente, mientras que el incremento con respecto al control para los suelos enmendados a la dosis más alta oscilaba entre 4 y 4,5, para S+RCd2 y S+RFd2, respectivamente. Se comprueba así que cuanto mayor es la concentración de materia orgánica en el suelo, mayor crecimiento fúngico se produce sin llegar a observarse diferencia en relación a este comportamiento entre los dos diferentes tipos de enmiendas utilizadas.

En cuanto al crecimiento fúngico (incorporación de  $[1,2-^{14}\text{C}]$ -acetato en las moléculas de ergosterol) en los suelos, presentó la misma tendencia observada para el crecimiento bacteriano, presentando un incremento con el incremento de la dosis, menos marcado cuando la enmienda se realizaba con compost que cuando se realizaba con RF (Figura 4.3.18).

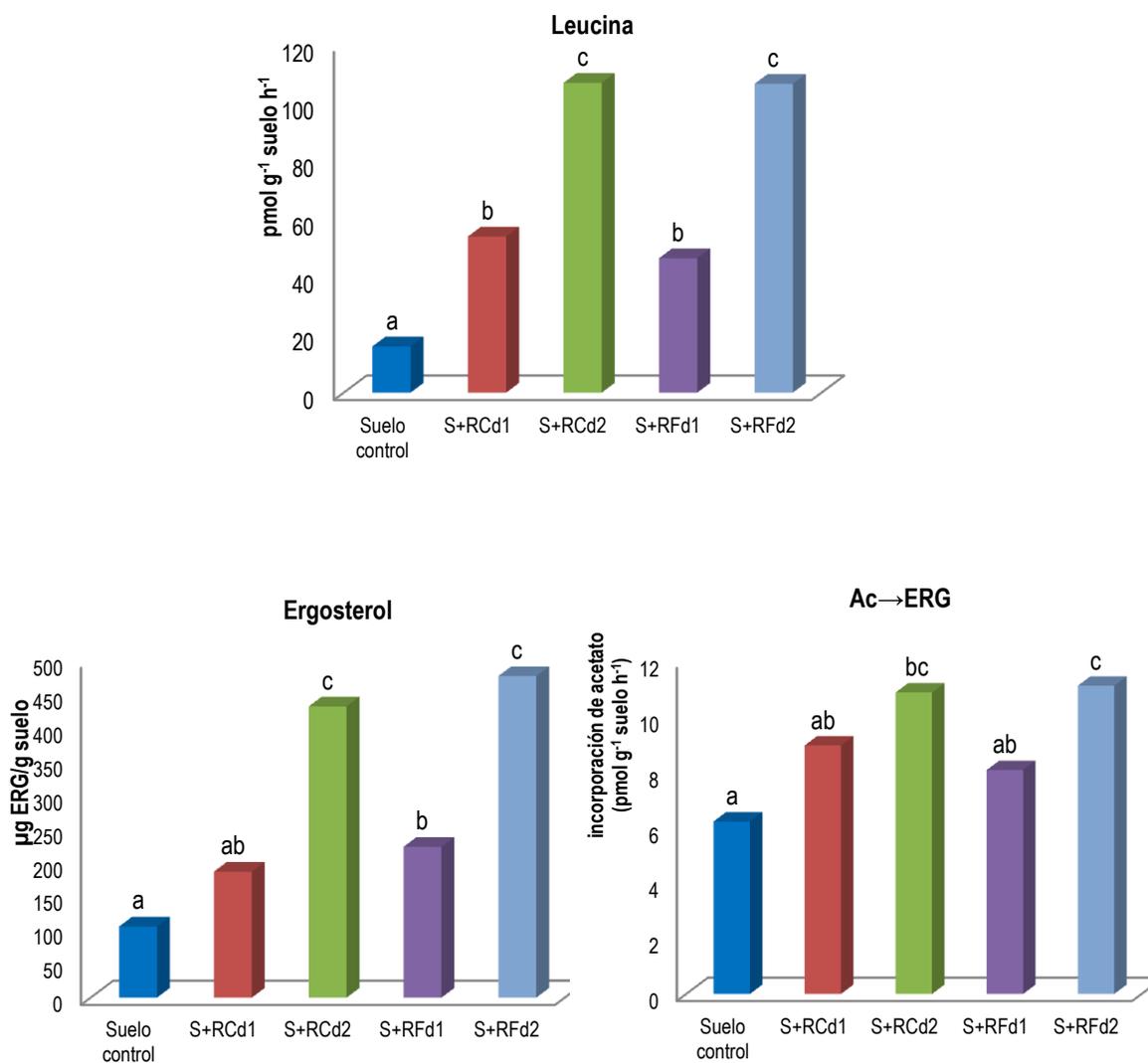


Figura 4.3.18. Contenido de incorporación de <sup>3</sup>H-Leucina, Ergosterol e incorporación de <sup>14</sup>C-Acetato, en el suelo control y en los suelos enmendados al final del periodo de experimentación. S+RC (suelo + compost); S+RF (suelo + residuo fresco); d1 y d2: 1% y 3% de C orgánico, respectivamente. Para cada tratamiento (letra minúscula) la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey a  $p \leq 0,05$ .

El hecho de que se produzca un incremento en el crecimiento bacteriano tras aumentar la disposición de sustratos en los suelos es un efecto observado con anterioridad por otros autores, por ejemplo tras la adición de glucosa (Vinten et al., 2002; Meidute et al., 2008) o alfalfa (Rousk & Bååth, 2007b).

Con respecto a los hongos, todos los cambios producidos en la biomasa fúngica (tanto el ergosterol como PLFA 18:2ω6) reflejan que el aporte de MO induce su crecimiento y desarrollo en el suelo y que 9 meses después de la enmienda se mantiene este efecto estimulante respecto al suelo control.

En relación a las bacterias, su desarrollo se ve favorecido a valores elevados de pH (Rousk et al., 2009; 2010) y puesto que nuestros suelos presentan un pH alrededor de 7.5-8, la presencia y actividad de estos microorganismos se verán favorecidas en estos suelos; por otra parte, cuando las bacterias recolonizan el sustrato presente en el suelo ocupan los recursos disponibles retrasando la recuperación de los hongos.

De hecho, la producción de compuestos antifúngicos por parte de las bacterias es un fenómeno bien documentado (De Boer et al., 2003, Zou et al., 2007). Sin embargo, en nuestros suelos, los beneficios aportados por tasa elevadas de liberación de C han provocado un aumento tanto en las bacterias como en los hongos del suelo, efecto también encontrado por Griffiths et al., (1999). Podemos señalar por tanto, que las enmiendas orgánicas estimularon la proliferación bacteriana y fúngica, como ya indicó Marschner et al. (2003).

Hay que indicar que los resultados obtenidos en este estudio de diversidad estructural, realizado en condiciones controladas y en ausencia de planta, mostraron ciertas diferencias con los resultados obtenidos en el experimento de campo, ya que mientras en este estudio de microcosmos se observó un gran paralelismo en el comportamiento de ambos tipos de enmienda y en la respuesta a la dosis aplicada, en el experimento de campo se observaron ciertas diferencias en relación a algún componente en función de la enmienda o dosis. Cabría destacar como diferencia más acusada la respuesta de las poblaciones fúngicas, ya que mientras que en el estudio de campo se observó una inhibición de estas poblaciones en los tratamientos con RFd2, en particular cuando la enmienda se añadía en mulching, en el experimento de incubación ambas enmiendas incrementaron la población fúngica, aumentando este incremento con el aumento de la dosis de enmienda aplicada. Posiblemente la presencia de planta, con los aportes de sustratos y cambios que produce en el ecosistema, y la mayor duración del experimento (5 años frente a 9 meses de incubación) acrecienta la competencia entre bacterias y hongos, determinando a largo plazo un mayor desarrollo bacteriano en condiciones de campo.

#### *Conclusiones parciales:*

*La adición de enmiendas orgánicas aumenta la diversidad funcional microbiana probablemente debido al incremento en la disponibilidad de C, el cual es un factor clave en el crecimiento de los microorganismos del suelo.*

*La aportación de enmiendas orgánicas provocó un incremento en el desarrollo de hongos y bacterias, acompañado de un cambio en la estructura de la comunidad microbiana. El desarrollo de bacterias Gram+ fue mayor que el de Gram- para el suelo enmendado con compost y para el suelo enmendado con RF. La mayor relación G+:G- podría ser interpretada como un cambio en las poblaciones microbianas quimiolitotóficas. Vemos que el incremento de la población microbiana está directamente relacionada con la dosis aplicada, pero no se observan demasiadas diferencias, en este sentido, entre el empleo de enmienda fresca o compostada. Podemos decir que la adición de enmiendas orgánicas a un suelo degradado supone en general una buena estrategia para acometer la recuperación de su biomasa microbiana fúngica y bacteriana, demostrada mediante análisis de los PLFA, así como de la actividad de dichas poblaciones microbianas.*

*Podemos resumir añadiendo que mediante estos estudios sobre actividad y estructura de la comunidad microbiana, podemos señalar que la aplicación de materiales orgánicos con diferente grado de estabilización (RC y RF) a un suelo ha demostrado ser una estrategia útil para la restauración de suelos a corto plazo.*

*Estas aplicaciones pueden tener más beneficios que desventajas en la recuperación de suelos semiáridos debido al alto contenido en nutrientes y materia orgánica que aportan estos materiales a unos suelos realmente pobres, promoviendo, no sólo el contenido en nutrientes, sino también la actividad de la comunidad microbiana, lo que podría relacionarse con un mejor estatus de estos suelos.*

---

# CONCLUSIONES

---



## CONCLUSIONES

Esta Memoria de Tesis Doctoral tiene como base ciertos hechos de gran importancia hoy en día, por una parte, la enorme y creciente cantidad de residuos orgánicos urbanos que nuestra sociedad genera en la actualidad, necesitando de forma acuciante minimizar en lo posible el problema que ello plantea, y por otra, la existencia de suelos en proceso de degradación en muchas de las zonas semiáridas del sureste español, y en particular en la Región de Murcia, los cuales es necesario recuperar si no queremos que se pierdan definitivamente llegando a la desertificación de estas zonas. Desde una perspectiva social y ambiental, esta degradación del suelo nos conduce a perseguir su conservación y protección, como recurso natural que es y por otra parte, se plantea la necesidad de dar la salida más lógica y ecológica posible a nuestros residuos domésticos.

Dado que una de las características de estos suelos degradados de zonas semiáridas es su extrema escasez en materia orgánica, se hace evidente que una de las vías más adecuadas para la recuperación de los mismos es aportarles esta materia orgánica de la que carecen. Esto hace que surja la propuesta de aunar las dos problemáticas antes mencionadas (suelos degradados-acumulación de residuos orgánicos), para darles una solución conjunta mediante el empleo de los residuos orgánicos como fuente de materia orgánica para estos suelos degradados.

En base a esto, en este Trabajo de Tesis doctoral nos propusimos como objetivo el establecer la posibilidad de aportar DOSIS ELEVADAS de residuos orgánicos urbanos para la fijación de carbono y la recuperación de suelos de zonas degradadas en ambientes semiáridos, sin perjuicio para la "vida" del ecosistema, y el profundizar en el conocimiento de la dinámica en el suelo de esta materia orgánica exógena y en la incidencia del nivel de estabilidad y dosis de la enmienda en estos procesos de fijación de carbono y recuperación de la calidad del suelo.

Los resultados obtenidos constituyen una interesante aportación científica que contribuye a un mejor conocimiento de los efectos de la integración de estos residuos orgánicos en los suelos degradados, siendo una fuente alternativa de materia orgánica y nutrientes para los suelos, contribuyendo a la mejora de sus propiedades, y por consiguiente, de su calidad. No obstante, conviene resaltar que estas enmiendas pueden contener elementos tóxicos (exceso de salinidad, metales pesados, los elementos tóxicos de diversos orígenes orgánicos o inorgánicos, la contaminación de patógenos, etc) y el conocimiento de su dinámica en los suelos es de vital importancia para minimizar los riesgos que pueden conllevar sobre el medioambiente.

Las **principales conclusiones** obtenidas en este estudio han sido las siguientes:

- I. La adición de enmiendas orgánicas contribuye al desarrollo de una vegetación espontánea en los suelos tratados, presentando a lo largo de todo el experimento los suelos tratados, excepto el tratado con dosis alta de residuo fresco, una cobertura vegetal superior a la

- presentada por el suelo control. Si bien inicialmente dicha vegetación es oportunista, con el tiempo, la vegetación tiende a evolucionar hacia especies autóctonas de la zona.
- II. La adición de la enmienda produce inicialmente una disminución de la diversidad vegetal con relación al suelo control, si bien con el tiempo la diversidad vegetal de los suelos enmendados tiende a igualarse con la del suelo control.
  - III. Con respecto al tipo de manejo utilizado para la adición de la enmienda (incorporación en la capa arable o mulching), se puede concluir que no afecta de modo notable a la densidad y diversidad de la cobertura vegetal desarrollada. Cabe destacar que la incorporación de la biomasa vegetal al suelo será sumamente útil para la recuperación del mismo, al producirse la incorporación de una mayor cantidad de carbono, lo cual convierte al suelo en un sumidero de este elemento.
  - IV. La incorporación de enmendantes orgánicos al suelo produce una mejora en las propiedades físicas del mismo, mejorando con ello la calidad de dicho suelo. Esta mejora se produce en todos los suelos enmendados independientemente del modo de aplicación de la enmienda (incorporación en la capa arable o mulching), del tipo de residuo y de la dosis aplicada. El tratamiento que da lugar a una mayor estabilidad de agregados y capacidad de retención hídrica en el suelo es la adición de compost en dosis alta, presentando también estos suelos mayor porosidad que el resto de los tratamientos.
  - V. Las enmiendas orgánicas pueden actuar como una fuente alternativa de nutrientes de lenta liberación y suministrar energía altamente disponible para los microorganismos del suelo. Hemos observado que durante el tiempo de realización del experimento se han producido cambios lógicos en todos los macronutrientes, observándose cinco años después de la aportación de las enmiendas una mejora de la calidad nutricional del suelo. Los suelos enmendados con compost, especialmente en dosis alta, han presentado valores más altos para todos los elementos que los suelos enmendados con residuos orgánicos frescos, mostrando una mayor persistencia de estos elementos en el sistema. En cuanto al modo de aplicación de la enmienda al suelo, por incorporación en la capa arable o disposición en superficie (mulching), no influye, en general, en el efecto de la enmienda sobre estos parámetros del suelo.
  - VI. Si bien es cierto que los residuos orgánicos de origen urbano (fracción orgánica de basura doméstica fresca y residuo compostado) debido a un elevado contenido en materia orgánica, junto a una nada despreciable cantidad de macro y micronutrientes, son buenos candidatos para incorporarlos a suelos degradados con fin de recuperarlos, no es menos

cierto que también pueden generar problemas. Este tipo de materiales pueden contener metales pesados y otros productos orgánicos que pueden resultar peligrosos adicionarlos al suelo. Es por tanto una exigencia ineludible el realizar un análisis exhaustivo de los residuos orgánicos previo a su aplicación al suelo. En nuestro experimento de campo constatamos que el aumento de CE del suelo siempre se mantuvo por debajo del umbral de  $2 \text{ dS m}^{-1}$  establecido como perjudicial para las plantas sensibles a la salinidad. La concentración de nitratos tampoco resulto preocupante debido a que los nitratos se liberan gradualmente, y solo se realiza una única adición de materia orgánica, por lo que la lixiviación de los nitratos resultantes de esta práctica no es probable que resulte problemática, especialmente en las zonas semiáridas donde la lluvia es escasa. Tampoco se ha observado un incremento preocupante de metales pesados en los suelos enmendados ya que aún en los suelos tratados con la dosis más elevada de enmienda, los contenidos de estos elementos quedaban por debajo de los límites establecidos por la normativa vigente.

- VII. La incorporación de enmiendas orgánicas al suelo provoca un aumento en el desarrollo y actividad de los microorganismos del suelo. Estas enmiendas aportan una serie de sustratos capaces de activar la síntesis por parte de los microorganismos de diversas enzimas, cuya actividad permite poner en movimiento a elementos de interés agronómico en el suelo (C, N y P), imprescindibles para la funcionalidad del mismo. El tratamiento que ha presentado un comportamiento más favorable, mostrando mayores valores de actividad, es el compost en dosis alta cuando la aplicación se realiza en superficie (mulching), pero cabe destacar que todos los tratamientos, excepto el tratamiento con dosis alta de residuo fresco, han mostrado 5 años después de la incorporación de la enmienda, valores de biomasa y actividad microbiana superiores al suelo control. Podemos por tanto afirmar que la aplicación de las distintas enmiendas orgánicas ha producido una recuperación de la calidad microbiológica del suelo, mostrando un incremento significativo de los parámetros que determinan la actividad microbiana de dicho suelo.
- VIII. La incorporación de las enmiendas al suelo incrementa en el mismo, el contenido de materia orgánica lo cual queda reflejado tanto en el contenido de carbono orgánico total como en el contenido de fracciones lábiles, capaces de actuar como alimento energético para los microorganismos. Vemos que tras 5 años de la aportación de la enmienda, tanto los valores de  $C_{\text{org}}$  como los valores de las fracciones más lábiles de carbono (C hidrosoluble y carbohidratos hidrosolubles) siguen presentando valores superiores al suelo control, siendo el suelo tratado con compost a la dosis más alta el que presenta valores más elevados en ambos tipos de manejo de la enmienda (incorporación o mulching).

- IX. Vemos así que la introducción en el suelo de un material orgánico (ya sea estabilizado o fresco) produce un enriquecimiento del suelo en materia orgánica y en diversas fracciones de carbono, lo que promueve una mejora en su fertilidad y productividad, así como una fijación de carbono en el suelo que contribuye a mitigar el efecto invernadero, y a conseguir hacer del suelo un verdadero sumidero de carbono.
- X. El ensayo de incubación ha puesto de manifiesto que la mineralización de las enmiendas orgánicas empleadas es más intensa cuando se aplican a la dosis más elevada, siendo esta mineralización mayor cuando se emplea enmienda fresca. No obstante, la adición de enmienda a la dosis más elevada contribuye en mayor medida que la dosis más baja a incrementar el C orgánico del suelo, particularmente el compost, aunque no de modo proporcional al incremento de la dosis.
- XI. La adición de las enmiendas orgánicas al suelo incrementa el contenido de ácidos húmicos del suelo, favoreciendo que grupos alifáticos, polisacáridos y estructuras de lignina así como grupos que aportan S y N se incorporen a dichos ácidos húmicos, modificando su composición elemental y estructura química. Además, 5 años después de la incorporación de la enmienda, las diferencias entre los AH del suelo de partida y los AH de los suelos enmendados no son muy marcadas, lo que nos hace intuir una tendencia de estos “nuevos” AH a igualarse a los del suelo de origen, contribuyendo de este modo a mejorar la calidad del suelo al que se añaden y a incrementar el “pool” de carbono estable en el suelo. En cuanto a la incidencia de la naturaleza, dosis o tipo de manejo de la enmienda aplicada, vemos que los resultados no se ven muy influenciados ni por la madurez de la enmienda, ni por la dosis o el tipo de manejo.
- XII. Las enzimas tienen capacidad para unirse con las sustancias húmicas del suelo quedando así protegidas frente a posibles procesos de desnaturalización (enzimas inmovilizadas). La adición de las enmiendas orgánicas incrementó la proporción de enzimas inmovilizadas en las sustancias húmicas del suelo, en concreto, incrementaron significativamente la cantidad de  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa, polifenol oxidasa y glicina aminopeptidasa. Las sustancias húmicas extraídas de los suelos enmendados con compost mostraron mayor capacidad para asociarse con la glicina aminopeptidasa y  $\beta$ -glucosidasa que las procedentes de suelos tratados con residuo fresco, particularmente a dosis alta. El tipo de manejo en la incorporación de la enmienda no mostró incidencia a este respecto. Cabe destacar que estas enzimas inmovilizadas representan un reservorio biológico en el suelo importante puesto que poseen capacidad funcional incluso cuando los suelos se encuentran en condiciones estresantes o desfavorables para la vida microbiana, un

incremento en la cantidad de enzimas inmovilizadas como el presentado por nuestros suelos enmendados supone una mejora en la calidad de los mismos.

- XIII. De forma general se puede afirmar que 5 años después de la enmienda, hay un aumento generalizado de la biomasa bacteriana y fúngica en los suelos tratados con compost y con la dosis más baja de RF cuando las enmiendas han sido incorporadas a la capa arable del suelo, y en los suelos enmendados con compost cuando las enmiendas habían sido añadidas en superficie, reflejando el efecto bioestimulante de estos tratamientos sobre el desarrollo de las poblaciones microbianas del suelo. El hecho de que estos suelos presenten valores superiores tras 5 años desde la incorporación de la enmienda sugieren que el desarrollo en los suelos degradados de las poblaciones fúngica y bacteriana no es fruto sólo de una mejora inicial pasajera al aplicar la enmienda sino que esta mejora permanece con el tiempo, generando una adecuada funcionalidad de estos suelos.
- XIV. Cuando el estudio se realizó a nivel de microcosmo la aportación de la enmienda provocó un aumento tanto en la población bacteriana como en la población fúngica, estando este incremento de la población microbiana directamente relacionado con la dosis aplicada, sin que se observasen diferencias dignas de mención entre el empleo de enmienda fresca o compostada.
- XV. La adición de enmiendas orgánicas aumenta inicialmente la diversidad funcional microbiana probablemente debido al incremento en la disponibilidad de C que provocan dichas enmiendas en el suelo, lo cual conduce a grandes cambios en la utilización de los sustratos de carbono por parte de los microorganismos y a su vez está en consonancia con lo previamente observado en el aumento de las actividades enzimáticas, las cuales apuntaban a una funcionalidad bioquímica mayor. En el experimento de incubación, debido a la ausencia de vegetación, esta diversidad funcional tiende a disminuir a lo largo del tiempo, siendo esta disminución dependiente de la dosis aplicada, presentando menor diversidad funcional los suelos enmendados a la dosis más baja que los enmendados a la dosis más alta, no observándose diferencias entre el tipo de enmienda empleada.
- XVI. En el experimento de campo se observó que tras 5 años desde la realización de los tratamientos, el incremento de la diversidad funcional se vio influenciado tanto por el tipo de enmienda empleado como por la dosis, observándose el mayor incremento de diversidad funcional cuando se adicionaba compost al suelo a la dosis más elevada, mientras que la aplicación de residuo orgánico fresco ejercía menor efecto sobre la diversidad microbiana aplicada a la dosis más alta que aplicada a la dosis más baja.

- XVII. El tipo de manejo para la adición de la enmienda no afecta al efecto de la misma sobre la diversidad funcional microbiana cuando el enmendante es compost; sin embargo, si el enmendante es residuo fresco, la diversidad funcional de los suelos es mayor cuando se realiza la incorporación de la enmienda a la capa arable del suelo.
- XVIII. Del estudio de la incidencia del aporte de grandes cantidades de materia orgánica exógena en la fijación de carbono en las fracciones de diferente tamaño de partícula del suelo podemos concluir que:
- La adición de enmiendas orgánicas de origen urbano incrementa el contenido de  $C_{org}$  de todas las fracciones de diferente tamaño de partícula del suelo, siendo este aumento superior en la fracción arcilla y en la fracción de arena gruesa.
  - Este aumento en la cantidad de  $C_{org}$  depende tanto de la dosis como de la naturaleza de la enmienda, siendo los residuos compostados más adecuados para estimular la fijación de  $C_{org}$  en las fracciones finas del suelo (limo y arcilla), donde queda protegido frente al ataque microbiano, creando así una reserva de  $C_{org}$  en el suelo.
  - Con respecto a la dosis, los suelos enmendados a la dosis más alta de residuo mostraron un mayor nivel de fijación de  $C_{org}$  en todas las fracciones del suelo que los suelos enmendados a la dosis más baja, sin que el aumento fuese proporcional a la dosis de aplicación, reafirmando la posibilidad de la existencia de un límite de acumulación de  $C_{org}$  en las fracciones del suelo.
  - Si bien la fijación de  $C_{org}$  es mayor con la utilización de dosis elevadas de enmienda, la eficacia conseguida con la aportación de estas grandes cantidades de enmienda es menor que con dosis más bajas, debido a la mayor mineralización que tiene lugar a dosis elevadas de enmienda.
  - Los suelos tratados con dosis alta de compost mostraron las mayores concentraciones de  $C_{org}$  en la fracción de arena gruesa, que es fundamental para el mantenimiento de las mejoras físicas de las propiedades de los suelos (porosidad, capacidad de retención de agua) y el suministro de nutrientes y compuestos orgánicos a largo plazo, y en la fracción arcillosa.
  - En definitiva, la adición de enmiendas orgánicas puede ser considerada como una técnica útil para restaurar los suelos degradados y aumentar las existencias de  $C_{org}$  en los suelos semiáridos.
  - Con respecto a la actividad microbiana asociada a los distintos tamaños de partícula del suelo, presentaron un comportamiento relacionado con la disponibilidad de sustratos, variando en función de la enzima y de la fracción de suelo estudiada. No obstante, estas enzimas parecen encontrarse en gran medida, asociadas a la fracción arcilla del suelo.

Como **Conclusión General** de esta Memoria de Tesis doctoral podemos mencionar que la utilización de residuos orgánicos urbanos en dosis altas son aceptables para mejorar a corto, medio y largo plazo suelos degradados, siempre y cuando estos residuos sean compostados previamente a su aplicación en los suelos degradados. Mediante la incorporación de estas enmiendas orgánicas se consigue mejorar la calidad física, química y biológica del suelo, lo que le permite ser capaz de mantener la vegetación que de forma espontánea aparece en los suelos. Estas enmiendas consiguen reactivar la vida microbiana del suelo, logrando así poner en marcha los ciclos de elementos de interés para la sostenibilidad del suelo (C, N, P). Se ha puesto, además, de manifiesto, que los suelos degradados de zonas semiáridas son capaces de admitir grandes cantidades de carbono orgánico exógeno, que queda fijado de modo estable en el suelo tanto a través de su asociación con las partículas finas del suelo como mediante su incorporación a las sustancias húmicas del mismo. También cabe mencionar que estas enmiendas son una fuente de enzimas libres e inmovilizadas, las cuales contribuyen a mejorar los procesos de mineralización y humificación en los suelos.



---

---

# BIBLIOGRAFÍA

---

---



**Abbaye, D. A., Lawlor, K., Hirsch, P. R., Brookes, P. C., 2005.** Changes in the microbial community of an arable soil caused by long-term metal contamination. *European Journal Soil Science*. 56:93-102.

**Abiven, S., Menasseri, S., and Chenu, C., 2009.** The effects of organic inputs over time on soil aggregate stability: A literature analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:1-12.

**Adani, F. and Tambone, F., 2005.** Long-term effect of sewage sludge application on soil humic acid. *Chemosphere*, 60:1214-1221.

**Adani, F., Genevini, P., Tambone F., Montoneri E., 2006.** Compost effect on soil humic acid: a NMR study. *Chemosphere*, 65:1414-1418.

**Adani, F., Genevini, P.L., Ricca, G., Tambone, F., Montoneri, E., 2007.** Soil humic acids modification after four years of compost application. *Waste Manage*, 27:319-324.

**Adani, F., Tambone, F., Genevini, P., 2009.** Effect of compost application rate on carbon degradation and retention. *Soil Waste Management*, 29:174-179.

**Agnelli, A., Ascher, J., Corti, G., Ceccherini, M. T., Nannipieri, P., and Pietramellara, G., 2004.** Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology and Biochemistry*, 36:859-868.

**Albaladejo, J., Martínez-Mena, M., Castillo, V., 1994.** Changes in soil physical properties induced by soil degradation. Transaction of the 15th World Congress of Soil Science, Mexico, VOL. 2b. ISSS, Acapulco, México, pp. 250– 252.

**Albaladejo, J. y E. Díaz. 1990.** Degradación y regeneración del suelo en el litoral mediterráneo español: experiencias en el proyecto LUCDEME. En: Degradación y regeneración del suelo en condiciones ambientales mediterráneas. CSIC. 191-214.

**Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F., 2000.** Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Bioresource Technology*, 75:43-48.

**Albuzio, A., Nardi, S. and Gullim, A., 1989.** Plant growth regulator activity of small molecular size humic fractions. *The Science of the Total Environment*, 81/82:671–674.

**Alef, K., Nannipieri, P. and Trazar-Cepeda, C., 1995.** Phosphatase activity. In: Alef K and Nannipieri P. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press Inc., San Diego, USA. pp. 335-336.

**Alef, K., Nannipieri, P., 1995.** Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Third edition, Academic press, San Diego, 576 pp.

**Allison, S. D. and Jastrow, J. D., 2006.** Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:3245-3256.

**Allison, S. D., 2006.** Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem processes. *Biogeochemistry*, 81:361-373.

- Almendros, G., 2002.** Investigaciones básicas sobre el origen y la estructura molecular de las formas estables de la materia orgánica relacionadas con el proceso de secuestro de carbono. En: Macías and Camps Arbestain. Actas de la Reunión Internacional de Secuestro de Carbono en Suelos y Biomasa (eds.). Castelo de Santa Cruz. A Coruña, Spain.
- Almendros, G., Dorado, J., González-Vila, F.J., Blanco, M.J., Lankes U., 2000.** <sup>13</sup>C NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and shrub biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 32:793-804.
- Almendros, G., Guadalix, M. E., González-Vila, E. J., Martín, F., 1998.** Distribution of structural units in humic substances as revealed by multi-step selective degradations and <sup>13</sup>C-NMR of successive residues. *Soil Biology and Biochemistry* 30(6): 755- 765.
- Amir, S., Hafidi, M., Bailly, J. R., Revel, J. C., 2003.** Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex gel fractions. *Agronomie*. 23:269–275.
- Amundson, R., 2001.** The carbon budget in soils. *Annual review of Earth and Planetary Sciences*, 29:535-562.
- Anderson, T. H., Domsch, K. H., 1993.** The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (*q*CO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25:393-395.
- Anderson, T.-H., Domsch, K.H., 1989.** Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21:471-479.
- Andjelkovic, M., Camp, J. V., Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., Verhe, R., 2006.** Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, 98:23–31.
- Anikwe, M. A. N. and Nwobodoko, K. C. A., 2002.** Long term effect of municipal waste disposal on soil properties and productivity of site used for urban agriculture in abakaliki, Nigeria. *Bioresource Technology*. 83:241–250.
- Annabi, M., Houot, S., Francou, C., Poitrenaud, M. and Le Bissonnais, Y., 2007.** Soil aggregate stability improvement with urban composts of different maturities. *Soil Science Society of America Journal*, 71:413-423.
- Antolín, M. C., Pascual, I., García, C., Polo, A., Sánchez-Díaz, M., 2005.** Growth, yield and solute content of barley in soil treated with sewage sludge under semiarid Mediterranean conditions. *Field Crops Research*, 94:224–237.
- Atlas, M. R., Horowitz, A., Krichevsky, M., Bej, K. A. 1991.** Response of microbial population to environmental disturbance. *Journal of Microbial Ecology*, 22:249-256.
- Attwill, P.M. and Adams, M.A. 1993.** Nutrient cycling in forests. *New Phytologist*, 124:561-582.
- Ayuso, L. M., 1995.** Utilización de residuos orgánicos como enmiendas orgánicas sólidas y líquidas: Valoración agronómica y efectividad frente a enmiendas tradicionales. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

- Ayuso, M., Hernández, T., García, C., Costa, F., 1992.** Utilización de un lodo aerobio como sustitutivo de fertilizantes fosforados inorgánicos. *Suelo y Planta*, 2:271-280.
- Ayuso, M., Pascual, J. A., García, C. and Hernández, T., 1996.** Evaluation of urban wastes for agricultural use. *Soil Science and Plant Nutrition*, 42:105-111.
- Bååth, E., 1994.** Measurement of protein synthesis by soil bacterial assemblages with the leucine incorporation technique. *Biology and Fertility of Soils*, 17:147-153.
- Bååth, E., 1998.** Growth rates of bacterial communities in soils at varying pH: a comparison of the thymidine and leucine incorporation techniques. *Microbial Ecology*, 36:316-327.
- Bååth, E., 2001.** Estimation of fungal growth rates in soil using C-14-acetate incorporation into ergosterol. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:2011-2018.
- Bååth, E., 2003.** The use of neutral lipid fatty acids to indicate the physiological conditions of soil fungi. *Microbial Ecology*, 45:373-383.
- Bååth, E., Pettersson, M., Söderberg, K. H., 2001.** Adaptation of a rapid and economical microcentrifugation method to measure thymidine and leucine incorporation by soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:571-1574.
- Badalucco, L. and Kuikman, P. J., 2001.** Mineralization and immobilization in the rhizosphere. In: R Pinton; Z Varanini; P Nannipieri (eds). *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Marcel Dekker, New York, pp. 141-196.
- Baer, S. G., J. M. Blair, S. L. Collins, and A. K. Knapp. 2003.** Soil resources regulate productivity and diversity in newly established tallgrass prairie. *Ecology* 84:724-735.
- Baldock, J. A., Oades, J. M., Nelson, P. N., Skene, T. M., Golchin, A., Clarke, P., 1997.** Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Australian Journal of Soil Research*. 35:1061-1083.
- Balser, T. C., and Firestone, M. K., 2005.** Linking microbial community composition and soil processes in a California annual grassland and mixed-conifer forest. *Biogeochemistry*, 73:395-415.
- Barahona, E., and Santos, F., 1981.** Un Nuevo método para la determinación de densidades aparentes y del coeficiente de extensibilidad lineal (COLE) por el método de la parafina. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 40:721-725.
- Bardgett, R. D., and McAlister, E., 1999.** The measurement of soil fungal:bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biology and Fertility of Soils*, 29:282-290.
- Barrena, R., Pagans, E., Faltys, G., Sanchez, A., 2006.** Effect of inoculation dosing on the composting of source-selected organic fraction of municipal solid wastes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81:420-425.
- Barrena, R., Vázquez, F., and Sánchez, A., 2006.** The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Management and Research*, 24:37-47.

- Bastida, F., Moreno, J.L., Hernandez, T., Garcia, C., 2006.** Microbiological degradation index of soils in a semiarid climate. *Soil Biology and Biochemistry*, 38 (12), 3463 – 3473.
- Bastida F., Algora C., Hernández T., García, C., 2012.** Feasibility of a cell separation-proteomic based method for soils with different edaphic properties and microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 45:136–138.
- Bastida, F., Barberá, G. G., García, C., Hernández, T., 2008.** Influence of orientation, vegetation and season on soil microbial and biochemical characteristics under semiarid conditions. *Applied Soil Ecology*, 38:62-70.
- Bastida, F., Kandeler, E., Hernández, T., García, C., 2008.** Long-term effect of municipal solid waste amendment on microbial abundance and humus-associated enzyme activities under semiarid conditions. *Microbial Ecology*, 55:651–661.
- Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J. L., Ros, M., García, C., Hernández, T., 2008.** Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, 40:318–329.
- Bastida, F., Moreno, J. L., Garcia, C., Hernández, T., 2007.** Addition of Urban Waste to Semiarid Degraded Soil: Long-term Effect. *Pedosphere*, 17:557–567.
- Bastida, F., Moreno, J. L., Hernández, T., García, C., 2006.** Microbiological degradation index of soils in a semiarid climate. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:3463–3473.
- Batjes, N. H. 1998.** Mitigation of atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations by increased carbon sequestration in the soil. *Biology and Fertility of Soils*, 27:230-235.
- Bayhan, K., A. Isisdar, and M. Akgul. 2005.** Tillage impacts on aggregate stability and crop productivity in a loam soil of a dryland in Turkey. *Soil and Plant* 55:214–220.
- Belyaeva O N, Haynes R J, Birukova O A, 2005.** Barely yield and soil microbial and enzyme activities as affected by contamination of two soils with lead, zinc or copper[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 41(2):85-94.
- Belyaeva, O.N. and Haynes, R., 2009.** Chemical, microbial and physical properties of manufactured soils produced by co-composting municipal green waste with coal fly ash. *Bioresource Technology*, 100:5203-5209.
- Belzile, N., Joly, H. A. and Li, H., 1997.** Characterization of humic substances extracted from Canadian lake sediments. *Canadian Journal of Chemistry*, 75:14-27.
- Bending, G.D., Putland, C., and Rayns, F., 2000.** Changes in microbial community metabolism and labile organic matter fractions as early indicators of the impact of management on soil biological quality. *Biology and Fertility of Soils*, 31:78–84.
- Benítez, E., Sainz, H. and Nogales, R., 2005.** Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. *Bioresource Technology*, 96:785-790.
- Berger, T. W., and Hager, H., 2000.** Physical top soil properties in pure stands of Norway spruce (*Picea abies*) and mixed species stands in Austria. *Forest Ecology and Management*, 136:159-172.

- Bernal, M. P., Roig, A., Lax, A., Navarro, A. F., 1992.** Effects of the applications of pig slurry on some physico-chemical properties of calcareous soils. *Bioresource Technology*, 42:233-239.
- Bertoncini, E. I., D'orazio, V., Senesi, N., Mattiazzo, M. E., 2005.** Fluorescence analysis of humic and fulvic acids from two Brazilian Oxisols as affected by biosolid amendment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 381:1281-1288.
- Bird, S. B., Herrick, J. E., Wander, M. M., Wright, S. E., 2002.** Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in a semi-arid rangeland. *Environmental Pollution*, 116:445-455.
- Bochner, B. R., 1989.** Sleuthing out bacterial identities. *Nature*, 339:157-158.
- Bohme, L. and Bohme, F., 2006.** Soil microbiological and biochemical properties affected by plant growth and different long-term fertilization. *European Journal of Soil Biology*, 42: 1-12.
- Bohme, L., Langer, U. and Bohme, U., 2005.** Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 109:141-152.
- Bol, R., Bolger, T., Cully, R., Little, D., 2003.** Recalcitrant soil organic materials mineralize more efficiently at higher temperatures. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 166:300-307.
- Bonmati, M., Ceccanti, B. and Nannipieri, P., 1998.** Protease extraction from soil by sodium pyrophosphate and chemical characterization of the extracts. *Soil Biology and Biochemistry*. 30:2113-2125.
- Bonmati, M., Ceccanti, B., Nannipieri, P. and Valero, J., 2009.** Characterization of humus-protease complexes extracted from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:1199-1209.
- Börjesson, G., Menichetti, L., and Kirchmann, H., 2012.** Soil microbial community structure affected by 53 years of nitrogen fertilisation and different organic amendments. *Biology and Fertility of Soils*, 48:245-257.
- Bossio, D. A., and Scow, K. M., 1995.** Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:4043-4050.
- Bossio, D. A., and Scow, K. M., 1998.** Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: Phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microbial Ecology*, 35:265-278.
- Bossio, D. A., Scow, K. M., Gunapala, N., Graham, K. J., 1998.** Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipids fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, 36:1-12.
- Bouyoucos G. J., 1962.** Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal, Madison*, 54(3):464-465.
- Braun, S., Thomas, V., Quiring, R., Flückiger W., 2010.** Does nitrogen deposition increase forest production? The role of phosphorus. *Environmental Pollution*. 158(6):2043-2052.
- Bremner, J. M., and Mulvaney, C.S. 1982.** Nitrogen-total. En: Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller y D.R. Keeny, 2<sup>nd</sup> Edition. American Society of Agronomy, Madison, pp. 595-622.

- Bremner, J. M., Mulvaney, R. L., 1978.** Urease activity in soils. In 'Soil enzymes'. (Ed. RG Burns) pp. 149-196. (Academic Press: London)
- Brink, R. H., Dubar, P., and Linch, D. L., 1960.** Measurements of carbohydrates in soil hydrolysates with anthrone. *Soil Science*, 89:157-166.
- Brockway, D. G., Outcalt K. W., Wilkins R. N., 1998.** Restoring longleaf pine wiregrass ecosystems: plant cover, diversity and biomass following long-rate hexazonone application on Florida sandhills. *Forest Ecology and Management*, 103:159-175.
- Bronick, C. J., and Lal, R., 2005.** Soil structure and management: A review. *Geoderma*, 124:3-22.
- Brookes, P. C., Cayuela, M. L., Contin, M., De Nobili, M., Kemmitt, S. J., Mondini, C., 2008.** The mineralisation of fresh and humified soil organic matter by the soil microbial biomass. *Waste Management* 28:716–722.
- Brunetti G., Senesi N., Plaza C., 2007.** Effects of amendment with treated and untreated olive oil mill wastewaters on soil properties, soil humic substances and wheat yield. *Geoderma*, 138:144-152. Extraction f
- Brunetti, G., Plaza, C. and Senesi, N., 2005.** Olive pomace amendment in mediterranean conditions: effect on soil and humic acid properties and wheat (*Triticum turgidum* L.) yield. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:6730-6737.
- Burns, R. G., 1978a.** Enzyme activity in soil: Some theoretical and practical considerations. In: Soil Enzymes (Burns RG, Ed.), pp. 295-340. Academic Press, London.
- Burns, R. G., 1978b.** Soil Enzymes. Academic Press, New York, p. 370
- Burns, R. G., 1982.** Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 14:423-427.
- Burns, R. G., 1986.** Interaction of enzymes with soil minerals and organic colloids. Soil Science Society of America, Special Publication Number 17, Madison.
- Busto, M. D., Ortega, N., and Pérez-Mateos, M., 1995.** Induction of  $\beta$ -D-glucosidase in fungal and soil bacterial cultures. *Soil Biology and Biochemistry*, 27:949-954.
- Cambardella, C. A., and Elliot, E. T., 1992.** Particulate soil organic matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Science Society of America Journal*, 56:777-783.
- Campbell, C. A., and Zentner, R. P., 1993.** Soil organic matter as influenced by crop rotations and fertilization in an aridic haploboroll. *Soil Science Society of America Journal*, 57:1034-1040.
- Campbell, C. D., Chapman, S. J., Cameron, C. M., 2003.** A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:3593-3599.
- Caravaca, F., and Roldán, A. 2003.** Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. *Geoderma*, 117:53-61.

- Caravaca, F., García, C., Hernández, M. T., Roldán, A., 2002.** Aggregate stability changes alter organic amendment and mycorrhizal inoculation in the afforestation of a semiarid site with *Pinus halepensis*. *Applied Soil Ecology*, 19:199--208.
- Caravaca, F., Lax, A., and Albaladejo, J., 2001.** Soil aggregate stability and organic matter in clay and fine silt fractions in urban refuse-amended semiarid soils. *Soil Science Society of America Journal*, 65:1235-1238.
- Caravaca, F., Lax, A., and Albaladejo, J., 2004.** Aggregate stability and carbon characteristics of particle-size fractions in cultivated and forested soils of semiarid Spain. *Soil Tillage Research*, 78:83-90.
- Carrasco, L., Caravaca, F., Azcón, R., Roldán A., 2009.** Soil acidity determines the effectiveness of an organic amendment and a native bacterium for increasing soil stabilization in semiarid mine tailings. *Chemosphere*, 74:239–244.
- Carter, M. R., 2002.** Soil Quality for Sustainable Land Management: Organic Matter and Aggregation Interactions that Maintain Soil Functions. *Agronomy Journal*, 94: 38-47.
- Ceccanti, B., and García, C., 1994.** Coupled chemical and biochemical methodologies to characterize a composting process and the humic substances. En: Senesi, N., Miano, T.M. (Eds.). Humic substances in the global environment and implications on human health. Elsevier, New York, 1279-1285.
- Ceccanti, B., and Masciandaro, G., 2003.** Stable humus–enzyme nucleus: the last barrier against soil desertification. In: Lobo, M.C., Ibanez, J.J. (Eds.), Preserving Soil Quality and Soil Biodiversity – the Role of Surrogate Indicators. CSIC-IMIA, Madrid, 77–82.
- Ceccanti, B., Bonmatí-Pont, M., and Nannipieri, P., 1989.** Microdetermination of protease activity in humic bands of different sizes after analytical isoelectric focusing. *Biology and Fertility of Soils*, 7:202-206.
- Ceccanti, B., Masciandaro, G., and García C., 1994.** Biomonitoring the environment and its functionality. In: Ceccanti, B., Garcia, C. (Eds.), Environmental Biochemistry in Practice. Wastes and soil management. Area della Ricerca CNR -Pisa-, 1- 24.
- Celis, J., Sandoval, M., y Zagal, E., 2009.** Actividad respiratoria de microorganismos en un suelo patagónico enmendado con lodos salmonícolas. *Archivos de Medicina Veterinaria* 41:275-279.
- Chai, X., Huang, Y., and Yuan, X., 2007.** Accuracy and uncertainty of spatial patterns of soil organic matter. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 50: 1141-1148.
- Chai, X., Takayuki, S., Cao, X., Guo, Q., Zhao, Y., 2007.** Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere*, 69:1446-1453.
- Chakraborty, P., Babu, P. V. R., and Sarma, V. V., 2011.** A multi-method approach for the study of lanthanum speciation in coastal and estuarine sediments. *Journal of Geochemical Exploration*, 110:225–231.
- Chefetz, B., Tarchitzky, J., Ashish, P., Desmukh, P., Hatcher, G., Chen, Y., 2002.** Characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agriculture soils. *Soil Science Society of America Journal*. 66:129-141.

- Chevallier, T., Muchaonyerwa, P., Chenu, C., 2003.** Microbial utilisation of two proteins adsorbed to a vertisol clay fraction: Toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis* and bovine serum albumin. *Soil Biology and Biochemistry*, 35:1211-1218.
- Chiu, C. Y., and Tian, G., 2011.** Chemical structure of humic acids in biosolids-amended soils as revealed by NMR spectroscopy. *Applied Soil Ecology*, 49:76 – 80.
- Christensen, B. T., 1985.** Carbon and nitrogen in particle size fractions isolated from Danish arable soils by ultrasonic dispersion and gravity-sedimentation. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 35:175–187.
- Christensen, B. T., 1996.** Carbon in primary and secondary organo- mineral complexes. In: Carter, M. R., Stewart, B. A. (eds) *Structure and organic matter storage in agricultural soils*. CRC Press, Boca Raton, Adv Soil Sci, pp 97–165
- Christensen, S., 1995.** Weed suppression ability of spring barley varieties. *Weed Research*, 35:241-247.
- Christensen, S., Rønn, R., Ekelund, F. et al. 1996.** Soil respiration profiles and protozoan enumeration agree as microbial growth indicators. *Soil Biology and Biochemistry*, 28:865–868.
- Ciardi, C., and Nannipieri, P., 1990.** A comparison of methods for measuring ATP in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 22:725-727.
- Clapp, C. E., and Hayes, M. H. B., 1999.** Characterization of humic substances isolated from clay- and silt-sized fractions of a corn residue-amended agricultural soil. *Soil Science*, 164:899–913.
- Clapp, C. E., Stark, S. A., Clay, D. E. and Larson, W. E. 1986.** Sewage sludge organic matter and soil properties. pp. 209–253. In Y. Chen and Y. Avnimelech (ed.) *The role of organic matter in modern agriculture*. Developments in plant and soil sciences. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, The Netherlands.
- Costa, F., García, C., Hernández, T., Polo, A., 1991.** Residuos orgánicos urbanos. Manejo y utilización. C.S.I.C. (Eds.), Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Murcia.
- Creccchio, C., Gelsomino, A., Ambrosoli, R., Minati, J. L. and Ruggiero, P., 2004.** Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 36:1873-1883.
- Cuevas, J., Seguel, O., Ellies, A., Dörner, J., 2006.** Efectos de las enmiendas orgánicas sobre las propiedades físicas del suelo con especial referencia a la adición de lodos urbanos. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal* 6(2):1-12.
- Cwalina-Ambrozak, B., Bowszys, T., 2009.** Changes in fungal communities in organically soil. *Plant, Soil and Environment*, 55(1):25-32.
- Dalzell, H. W., Gray, K. R., and Biddlestone, A. J., 1981.** Composting in tropical agriculture. 2<sup>nd</sup> Ed. International Institute of Biological Husbandry, England.
- Darst, B., and Murphy, L., 1990.** Soil Organic Matter. An integral ingredient in crop production. *Better Crops with Plant Food*, 74 (1):10-11.

**de Boer, J., Wester, P.G., van der Horst, A., Leonards, P. E., 2003.** Polybrominated diphenyl ethers in influents, suspended particulate matter, sediments, sewage treatment plant and effluents and biota from the Netherlands. *Environmental Pollution*, 122:63–74.

**Degens, B.P., and Harris, J.A., 1997.** Development of a physiological approach to measuring the metabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 29:1309-1320.

**Dexter, A. R., 1997.** Physical properties of tilled soils. *Soil and Tillage Research*. 43:41-63.

**Díaz Burgos, M. A., 1990.** Compostaje de lodos residuales: aplicación agronómica y criterios de madurez. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 127 p.

**Díaz, E., 1992.** Efecto de la adición de residuos urbanos en la regeneración de suelos degradados como medio de control de la desertificación. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.

**Díaz, E., Roldán, A., Lax, A., Albaladejo, J., 1994. Formation of stables aggregates in degraded soil by amendment with urban refuse and peat. *Geoderma*, 63:277-288.**

**Díaz, G., Azcón Aguilar, C. and Honrubia, M., 1996.** Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant and Soil*, 180:241-249.

**Díaz-Marcote, I., 1994.** Aprovechamiento del compost de los residuos sólidos urbanos: estudio de su capacidad fertilizante y del efecto sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 281p.

**Díaz-Raviña, M. and Bååth, E., 2001.** Response of soil bacterial communities pre-exposed to different metals and reinoculated in an unpolluted soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 241–248.

**Díaz-Raviña, M., Bååth, E., Frostegård, A., 1994.** Multiple tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:2238-2247.

**Dick, W. A., and McCoy, E. L., 1993.** Enhancing soil fertility by addition of compost. In: Hoitink, H.A.J., Keener, H.M. (Eds.), *Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiological and Utilization Aspects*. Renaissance Publications. Worthington, OH, 622–644.

**Dick, W. A., and Tabatabai, M. A., 1993.** Significance and potential uses of soil enzymes. En: Metting, F.B. (Ed.). *Soil Microbial Ecology: Application in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, New York, 95-125.

**Dimas López, J., Díaz E. A., Martínez, R. E. y Valdéz C., 2001.** Abonos orgánicos y su efecto en propiedades físicas y químicas del suelo y rendimiento en maíz. *Terra*, 19: 293-299.

**Doran, J. W. and Parkin, T. B., 1996.** Quantitative indicators of soil quality: A minimum data set. Pp. 25-37. In: J. W. Doran and A. J. Jones (Eds.). *Methods for assessing soil quality*. SSSA Special. Publication No. 49. SSSA, Madison.

**Doran, J. W., Parkin, T. B., 1994.** Defining and assessing soil quality. En: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.). *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA Special Pub. 34. Soil Science Society of America, Madison, Wiaconsin, USA, 3-21.

- Duah-Yentumi, S., Rønn R., and Christensen, S., 1998.** Nutrients limiting microbial growth in a tropical forest soil of Ghana under different management. *Applied Soil Ecology*, 8:19-24.
- Dunjó, G., Pardini, G., and Gispert, M., 2003.** Land use change effects on abandoned terraced soils in a Mediterranean catchment, NE Spain *Catena*, 52, pp. 23–37
- Ebersberger, D., Werrnbtter, N., Niklaus, P., Kandeler, E., 2004.** Effects of long term CO<sub>2</sub> enrichment on microbial community structure in calcareous grassland. *Plant and Soil*, 264:313-323.
- Eiland, F., 1985.** Determination of adenosine triphosphate (ATP) and adenylate energy charge (AEC) in soil and use of adenine nucleotides as measures of soil microbial biomass and activity. Dissertation, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, pp. 1–193
- Eivazi, F. and Tabatabai, M. A., 1988.** Glucosidases and galactosidase in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5):601-606.
- Eivazi, F., and Tabatabai, M. A., 1977.** Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9:167-172.
- Eivazi, F., and Zakaria, A., 1993.**  $\beta$ -glucosidase activity in soils amended with sewage sludge. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 43:155-161.
- Eivazi, F., Tabatabai, M. A., 1990.** Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22: 891-897.
- Ekenler, M. and Tabatabai, M. A., 2003.** Effects of liming and tillage systems on microbial biomass and glycosidases in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 39:51-61.
- Elfstrand, S., Bath, B., Martensson. A., 2007.** Influence of various forms of green manure amendment on soil microbial community composition, enzyme activity and nutrient levels in leek. *Applied Soil Ecology*, 36:70–82.
- Ellerbrock, R. H., and Kaiser, M., 2005.** Stability and composition of different soluble soil organic matter fractions – evidence from delta C-13 and FTIR signatures. *Geoderma*, 128:28–37.
- Ellies, A., 2004.** Efecto de la materia orgánica en el suelo. En: Residuos orgánicos y su uso en sistemas agroforestales. Simposio de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo, Universidad de La Frontera, Temuco, pp: 139-150.
- El-Sayed, A. H. M. M., Mahmoud, W. M., Davis, E. M., Coughlin, R. C., 1996.** Growth of hydro- carbon-utilizing isolates in chemically defined media. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 37: 61-68.
- El-Sayed, M.A., Naga, W.M.A., Beltagy, A:l, Halim, Y., 1996.** Sedimentary humic substances isolated from a coastal lagoon of the Nile Delta: physical and chemical characteristics. *Estuarine, Coastal and Shelf science*, 43:205-215.
- El-Shakweer, M. H. A., El-Sayad, E. A., and Ewees, M. S. A., 1998.** Soil and plant analysis as a guide for interpretation of the improvement efficiency of organic conditioners added to different soil in Egypt. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 29:2067-2088.
- Ensminger, L. E., and Giesecking, J. E., 1939.** The adsorption of proteins by montmorillonitic clays. *Soil Science*, 48:467-474.

- Esterman E. F., Peterson G. H. and McLaren A. D., 1959.** Digestion of clay-protein, lignin-protein and silica-protein complexes by enzymes and bacteria. *Soil Science Society of America*, 23:31.
- Ettema, C. H. and Wardle, D. A., 2002.** Spatial soil ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, 17:177-183.
- Fantechi, R. and Margaris, N. S. 1986.** Desertication in Europe: Proceedings of the Information Symposium in the EEC Programme on Climatology Held in Mytilene, Greece, 15–18 April 1984. Dordrecht: Reidel.
- FAO, 2008.** Land use systems of the World. <http://www.fao.org/geonetwork/srv/en/metadata.show> . Accessed 15 June 2008.
- Felton, G. K., 1995.** Temporal variation of soil hydraulic properties on municipal solid waste amended mine soils. *Trans. ASAE* 38:775-782.
- Fernandes, S. A. P., Bettiol, W., and Cerri, C. C., 2005.** Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. *Applied Soil Ecology*, 30(1):65–77. doi: 10.1016/j.apsoil.2004.03.008.
- Fernández, J. M., Hockaday, W. C., Plaza, C., Polo, A., Hatcher, P. G., 2008.** Effects of long term soil amendment with sewage sludges on soil humic acid thermal and molecular properties. *Chemosphere*, 73(11):1838–1844.
- Fernández, J. M., Senesi, N., Plaza, C., Brunetti, G., Polo, A., 2009.** Effects of composted and thermally dried sewage sludge on soil and soil humic acid properties. *Pedosphere*, 19(3):281- 291.
- Fierer, N., Bradford, M. A. and Jackson, R. B., 2007.** Towards an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88:1354-1364.
- Fisk, M. C., Reuther K. F., Yavit, J. B., 2003.** Microbial activity and functional composition among northern peatland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 35:591-602.
- Fraç, M., Oszust, K., and Lipiec, J., 2012.** Community level physiological profiles (CLPP), characterization and microbial activity of soil amended with dairy sewage sludge. *Sensors*, 12:3253-3268.
- Frankenberger, W. Jr., Johanson, J., and Nelson, C., 1983.** Urease activity in sewage sludge-amended soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 15:543-549.
- Frankenberger, W.T., Dick, W.A. 1983.** Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Science Society of America Journal*, 47: 945-951
- Freeman, C., Ostle, N. J., Fenner, N., Kang, H., 2004.** A regulatory role for phenol oxidase during decomposition in peatlands. *Soil Biology and Biochemistry*, 36:1663-1667.
- Frostegard, A., and Bååth, E., 1996.** The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 22:59-65.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., and Simonet, P., 1999.** Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:5409-5420.

**Frostegård, Å., Tunlid, A., and Bååth, E., 1993.** Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:3605–3617.

**GACGC, 1994.** World in transition: The treat to soils. Annual report. German Advisory Council on Global Change. Economica Verlag, Bonn.

**Gallardo-Lara, F., and Nogales, R., 1987.** Effect of the Application of Town Refuse Compost on the Soil-Plant System: A Review. *Biological Wastes*, 19:35-62.

**Garcette-Lepecq, A., Derenne, S., Largeau, C., Bouloubassi, I., Saliot, A. 2000.** Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis of kerogen-like organic matter in recent sediments of the Danube delta. In: 14th International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis, Seville. Abstract Book, p. 48.

**García, C., 1990.** Estudio del compostaje de residuos orgánicos. Valoración Agrícola. Doctoral Dissertation. Universidad de Murcia, Murcia.

**García, C., and Hernández, T., 1997.** Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biology and Biochemistry*, 29:171-177.

**García, C., Ceccanti, B., Masciandaro, G., and Hernández, T., 1995.** Phosphatase and  $\beta$ -glucosidase activities in humic substances from animal wastes. *Bioresource Technology*, 53: 79-87.

**García, C., Hernández, M. T., and Costa, F., 1997.** Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28:123–134.

**García, C., Hernández, T., Albaladejo, J., Castillo, V., Roldán, A., 1998.** Revegetation in semiarid zones: influence of terracing and organic refuse on microbial activity. *Soil Science Society of America Journal*, 62:670-676.

**García, C., Hernández, T., and Costa, F., 1992.** Variation in some chemical parameters and organic matter in soils regenerated by the addition of municipal solid-waste. *Environmental Management*, 16:763-768.

**García, C., Hernández, T., and Costa, F., 1994.** Microbial activity in soils under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1185-1191.

**García, C., Hernández, T., Costa, F., Barahona, A., 1996.** Organic matter characteristics and nutrient content in eroded soils. *Environmental Management* 20:131-141.

**García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., 1994.** Biochemical parameters in soil regenerated by addition of organic wastes. *Waste Management and Research* 12:457-466.

**García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G., 1993.** The dehydrogenase activity of soils: an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. En: Gallargo, J.F. (Ed.). XI International Symposium of Environmental Biogeochemistry, Salamanca.

**García, C., Hernández, T., Pascual, J. A., Moreno, J. L., Ros, M., 2000.** Microbial activity in soils of SE Spain exposed to degradation and desertification processes- Strategies for their rehabilitation. In: García, C., Hernández, M. T. (Eds), Research and perspectives of soil enzymology in Spain. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Murcia, Spain, pp. 93-143.

- García, C., Hernández, T., Roldán, A., Albaladejo, J., 1997.** Biological and biochemical quality of a semiarid soil after induced vegetation. *Journal of Environmental Quality*, 26:1116–1122.
- García, C., Hernández, T., Roldán, A., Albaladejo, J., Castillo, V., 2000.** Organic amendment and mycorrhizal inoculation as a practice in afforestation of soils with *Pinus halepensis* Miller: effect on their microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 32:1173-1181.
- García, C., Hernández, T., Roldán, A., Martín, A., 2002.** Effect of plant cover decline on chemical microbiological parameters under Mediterranean climate. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 635-642.
- García, C., Roldán, A., and Hernández, T. 1997a.** Changes in microbial activity after abandonment of cultivation in a semiarid Mediterranean environment. *Journal of environmental quality*, 26:285–291.
- García, C., Roldán, A., and Hernández, T. 2005.** Ability of different plant species to promote microbiological processes in semiarid soil. *Geoderma*, 124:193-202.
- García, C., Hernández, T., Costa, F., del Rio, J. C., 1989.** Study of the lipidic and humic fractions from organic wastes before and after the composting process. *Science of the Total Environment*, 81/82:551-560.
- García-Gil, J. C., 2001.** Efectos residuales y acumulativos producidos por la aplicación de compost de residuos urbanos y lodos de depuradoras sobre agrosistemas mediterráneos degradados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- García-Gil, J. C., Plaza, C., Senesi, N., Brunetti, G., Polo, A., 2004.** Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. *Biology and Fertility of Soils*, 39: 320- 328.
- García-Gil, J. C., Plaza, C., Solerrovira, P., and Polo, A., 2000.** Longterm effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*. 32:1907-1913.
- García-Orenes, F., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Navarro-Pedreño, J., Gómez, I. and Mataix-Beneyto, J., 2005.** Factors controlling the aggregate stability and bulk density in two different degraded soils amended with biosolids. *Soil and Tillage Research*, 82:65--76.
- Garland, J. L., and Mills, A. I., 1994.** A community-level physiological approach for studying microbial communities. In: Ritz K., Dighton J, Giller KE, (eds) *Beyond the Biomass*, Wiley, London pp 77-83.
- Garland, J. L., and Mills, A.L., 1991.** Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:2351–2359.
- Garland, J.L., 1996.** Analytical approaches to the characterization of sample microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 28:213-221.
- Genevini, P. L., Adani, F., Veeken, A., Nierop, G. J., Scaglia, B., Dijkema, C., 2002.** Qualitative modifications of humic acidlike and core-humic acid-like during high-rate composting of pig faces amended with wheat straw. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 48(2):143–150.
- Gestring, W. D. and Jarrell, W. M., 1982.** Plant availability of phosphorus and heavy metals in soils amended with chemically treated sewage sludge. *Journal of Environmental Quality*, 11(4):669-675.

- Gianfreda, L., and Bollag, J. M., 1996.** Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil, pp. 123–194. In G. Stotzky and J.M. Bollag (eds.). *Soil biochemistry*, Vol 9. Dekker, New York, USA.
- Gianfreda, L., Bollag, J.-M. 2002.** Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: R.G. Burns, R. Dick. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, 491-538.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., Violante, A., 1995.** Formation and activity of urease–tannate complexes affected by aluminum, iron, and manganese. *Soil Science Society of America Journal*, 59:805-810.
- Gigliotti, G., Giusquiani, P. L., Businelli, D., and Macchioni, A., 1997.** Composition changes of dissolved organic matter in a soil amended with municipal waste compost. *Soil Science*, 162:919-926.
- Gill, K. S., Gajri, P. R., Chaudry, M. R., and Singh, B., 1996.** Tillage, mulch and irrigation effects on corn (*Zea mays* L.) in relation to evaporative demand. *Soil and Tillage Research*, 39 (3–4):213-227.
- Gil-Sotres F., Trasar Ceperda, M. C., Ciardi, C., Ceccanti, B., 1992.** Biochemical parameters in soils regenerated by the addition of organic wastes. *Waste Management and Research*, 12:25-30.
- Giusquiani, P. L., Concezzi, L., Businelli, M., Macchioni, A., 1998.** Fate of pig sludge liquid fraction in calcareous soil: agricultural and environmental implications. *Journal of Environmental Quality*. 27, 364-371.
- Gliotti, C., Giusquiani, P.L., Businelli, D., Machioni, A., 1997.** Composition changes of dissolved organic matter in a soil amended with municipal waste compost. *Soil Science* 162, 919 -926.
- Golabi, M. H., Denney, M. J., and Iyekar, C., 2007.** Value of composted organic wastes as an alternative to synthetic fertilizers for soil quality improvement and increased yield. *Compost Science and Utilization*, 15(4):267-271.
- Gomes, M. P., Duarte, D. M., Miranda, P. L. S., Barreto, L. C., Matheus, M. T., and Garcia, Q. S., 2012.** The effects of arsenic on the growth and nutritional status of *Anadenanthera peregrina*, a Brazilian savanna tree. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. In press.
- Gómez, E., Ferreras, L., and Toresani, S., 2006.** Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology*, 97:1484–1489.
- Gómez, M., 2006.** Manual técnico de fertilización de cultivos. Microfertisa, Bogotá. 116 p.
- Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Lores, M., Domínguez, J., 2010.** Detritivorous earthworms modify microbial community structure and accelerate plant residue decomposition. *Applied Soil Ecology*, 44:237-244.
- González, J. M., Ortiz-Martínez, A., González-del Valle, M. A., Laiz, L., and Saíz-Jiménez, C., 2003.** An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities. *The Journal of Microbiological Methods*, 55:459–463.
- González-Quiñones, V., 2006.** Metodología, formulación y aplicación de un índice de calidad de suelos con fines agrícolas para Castilla-La Mancha. Tesis Doctoral. Madrid.

- González-Vila, F. J., Lentz, H., and Lüdemann, H-D., 1976.** FT-C13 nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 73:1063-1070.
- Gormsen, D., Olsson, P. A., and Hedlund, K., 2004.** The influence of collembolans and earthworms on AM fungal mycelium. *Applied Soil Ecology*, 27:211–220.
- Granatstein, D., and Bezdicsek, D. F., 1992.** The need for a soil quality index: local and regional perspective. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7:12–16.
- Grant, W. D., and West, A. W., 1986.** Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosaminic in soil: evaluation as indicators of microbial biomass. *Journal of Microbiological Methods*, 6(1):47–53.
- Grayston, S. J., Wang, S. Q., Campbell, C. D., Edwards, A. C., 1998.** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 30:369-378.
- Grayston, S. J., and Prescott, C. E., 2005.** Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:1157-1167.
- Griffiths, B. S., Ritz, K. and Ebbelwhite, N., 1999.** Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:145-53.
- Gros, A. y Domínguez, A., 1992.** Abonos guía práctica de la fertilización. 8va. edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 450 p.
- Guggenberg G., Zech W., Huamaier L., Christensen B.T., 1995.** Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soils. II. CPMAS and solution <sup>13</sup>C NMR analysis. *European Journal of Soil Science*, 46, 147-158.
- Gunapala, N. and Scow, K. M., 1998.** Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 30:805-816.
- Haack, S. K., Garchow, H., Klugg, M. J., Forney, L. J., 1995.** Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1458-1468.
- Hackett, C. A. and Griffiths, B. S. 1997.** Statistical analysis of the time-course of Biolog substrate utilization. *Journal of Microbiological Methods*, 30:63–69.
- Hafidi, M., Amir, S., and Revel, J. C., 2005.** Structural characterization of olive mill wastewater after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and <sup>13</sup>C-NMR. *Process Biochemistry*, in press.
- Harada, Y., and Inoko, A., 1975.** Cation-exchange properties of soil organic matter. I. Effects of conditions for the measurement on cation-exchange capacity values of humic acid preparations. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21:361–369.
- Hart, M. M. and Reader, R. J., 2002.** Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytology*, 153:335–344.
- Harwood, C. S. and Ornston, L. N., 1984.** TOL plasmid can prevent induction of chemotactic responses to aromatic acids. *Journal of Bacteriology*, 160(2): 797–800.

- Harwood, C. S., Rivelli, M., and Ornston, L. N., 1984.** Aromatic acids are chemoattractants for *Pseudomonas putida*. *J Bacteriology*, 160(2): 622–628.
- Hassink, J., and Whitmore, A. P., 1997.** A model of the physical protection of organic matter in soils. *Soil Science Society of America Journal*, 61:131–139.
- Hatcher, P. G., Breger, I. A., Maciel, G. E., Szeverenyi, M., 1985.** Humic Substances in Soil, Sediment and Water, John Wiley, New York. 275–301.
- Haynes, R. J., 1980.** Influence of soil management practice on the orchard agro-ecosystem. *Agro-Ecosystems*, 6:3-30.
- Haynes, R. J., Swift, R. S., and Stephen, R. C., 1991.** Influence of mixed cropping rotations (pasture-arable) on organic matter content, water stable aggregation and clod porosity in a group of soils. *Soil and Tillage Research*, 19:77-87.
- Haynes, R.J., and Swift, R.S., 1990.** Stability of soil aggregates in relation to organic constituents and soil water content. *Soil Science*, 41, 73–83.
- He, X. T., Traina, S. J., and Logan, T. J., 1992.** Chemical properties of municipal solid waste compost. *Journal of Environmental Quality*, 21:318-329.
- Hernández, A. J., Pastor, J. and Rey-Benayas, J., 1994.** Forage production under suboptimal conditions: an overview of drought problems in Mediterranean-type ecosystems. In Grasslands and Society. L. t Mannelje and J. Frame (eds). Wageningen Pers, Wageningen NL, pp. 539-548.
- Hernández, J. A., Francisco, J., Corpas, F. J., Del Rio, L. A., Sevilla, F., 1993.** Salt induced oxidative stresses mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Plant Physiology*, 89: 103-110.
- Hernández, T., Masciandaro, G., Moreno J. L., García, C., 2006.** Changes in organic matter composition during composting of two digested sewage sludges. *Waste Management*, 26:1370-1376.
- Hernández, T., y García, C., 2003.** Estimación de respiración microbiana del suelo. In: García, C., F. Gil S., T. Hernández, y C. Trasar C. (eds). Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos. Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana. Mundi-Prensa. Madrid, pp: 311–346.
- Hernando, S., 1988.** Aprovechamiento de residuos sólidos urbanos como fuente de materia orgánica y sus efectos sobre las propiedades físicas y químicas del suelo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Hinojosa, M. B., Carreira, J. A., García-Ruiz, R., Dick, R. P., 2005.** Microbial response to heavy metal-polluted soils: Community analysis from phospholipid-linked fatty acids and ester-linked fatty acids extracts. *Journal of Environmental Quality*, 34:1789–1800.
- Högberg, M. N., Bääth, E., Nordgren, A., 2003.** Contrasting effects of nitrogen availability on plant carbon supply to mycorrhizal fungi and saprotrophs – a hypothesis based on field observations in boreal forest. *New Phytologist*, 160:225–238.
- Högberg, M. N., Hogberg, P. and Myrold, D. D., 2007.** Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C to N ratio, the trees or all three? *Oecología*, 150:590-601.

- Högberg, P., and Read, D. J., 2006.** Towards a more plant physiological perspective on soil ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, 21:548– 554.
- Hopkins, W. A., Mendonça, M.T., Congdon, J. D., 1997.** Increased circulating levels of testosterone and corticosterone in southern toads, *Bufo terrestris*, exposed to coal combustion waste. *General and Comparative Endocrinology*, 108:237-246.
- Hu, J., Lin, X., Wang, J., Dai, J., Chen, R., Zhang, J., Wong, M. H., 2011.** Microbial functional diversity, metabolic quotient and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer. *Journal of Soils and Sediments*, 11:271–280.
- Huang, B., Fry, J.D., Wang, B., 1998.** Water relations and canopy characteristics of tall fescue cultivars during and after drought stress. *HortScience*, 33:837–840.
- Hueso, S., García, C. and Hernández, T., 2012.** Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 50: 167-173.
- Hughes, R. B., Katz, S. A. and Stubbins, S. E., 1968.** Inhibition of urease by metal ions. *Enzymologia*, 36: 332-334.
- Insam, H., 1997.** A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. H Insam, A Rangger (Eds.), *Microbial Communities*, Springer, Heidelberg. 259–260.
- Insam, H., 2001.** Development in soil microbiology since mid 1960s. *Geoderma*, 100:389–402.
- Insam, H., Parkinson, D. and Domsch, K.H., 1989.** Influence of macroclimate on soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 21: 211-221.
- Jenkinson, D. S., 1988.** Determination of microbial biomass nitrogen and carbon in soil. pp 369-386. In: Wilson, J.T.(ed). *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*. Wallingford: CABI.
- Jiang, X., Hu, Y., Bedell, J.H., Xie, D., Wright, A.L., 2011.** Soil organic carbon and nutrient content in aggregate size fractions of a subtropical rice soil under variable tillage. *Soil Use and Management*, 28, 27–35.
- Jindo, K., Hernández, T., García, C., Sánchez-Monedero, M. A., 2011.** Influence of stability and origin of organic amendments on humification in semiarid soils. *Soil Science Society of America Journal*, 75:2178-2187.
- Joachim, H., Staben, N., Hein, A., Merkel, W., 2008.** Identification, assessment and control of hazards in water supply –experiences from Water Safety Plan implementations in Germany. *Memorias Water Safety Plans: Global experiences and future trends*. Portugal, ASPEB, IWA, OMS, Mayo, 2008.
- Joergensen, R. G., and Emmerling, C., 2006.** Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169:295-309.
- Johns, R. B., Perry, G. J., and Jackson, K. S., 1977.** Contribution of bacterial lipids to recent marine sediments. *Estuarine Coastal Mar. Sci.*, 5:521–529.

- Johnsen, K., Jacobsen, C. S., Torsvik, V. and Sørensen, J., 2001.** Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biology and Fertility of Soils*, 33:443-453.
- Kaiser, K. and Guggenberger, G., 2003.** Mineral surfaces and soil organic matter. *European Journal of Soil Science*, 54(2):219-236.
- Kalbitz, K., Schwesig, D., Rethemeyer, J., Matzner, E., 2005.** Stabilization of dissolved organic matter by sorption to the mineral soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:1319–1331.
- Kandeler, E., and Gerber, H. 1988.** Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6:68-72.
- Kandeler, E., Mosier, A. R., Morgan, J. A., Milchunas, D. G., King, J. Y., Rudolph, S., Tscherko, D., 2006.** Response of soil microbial biomass and enzyme activities to the transient elevation of carbon dioxide in a semi-arid grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:2448-2460.
- Kandeler, E., Mosier, A. R., Morgan, J. A., Milchunas, D. G., King, J. Y., Rudolph, S., Tscherko, D., 2008.** Transient elevation of carbon dioxide modifies the microbial community composition in a semi-arid grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 40:162-171.
- Kandeler, E., Stemmer, M., and Klimanek, E. M., 1999.** Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:261–273.
- Kandeler, E., Tscherko, D., Spiegel H., 1999.** Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralisation and enzyme activities of a Chernozem under different tillage management. *Biology and Fertility of Soils*, 28: 343–351.
- Kang S.Z., Hu X.T., Du T.S., Zhang J., Jirie P. 2003.** Transpiration coefficient and ratio of transpiration to evapotranspiration of pear tree (*Pyrus communis* L) under alternative partial rootzone drying condition. *Hydrological Processes*, 17:1165–1176.
- Kang, S.Y., Doh, S., Lee, D., Lee, D., Jin, V. L. and Kimball, J. S., 2003.** Topographic and climatic controls on soil respiration in six temperate mixed-hardwood forest slopes, Korea. *Global Change Biology*, 9:1427-1437.
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., Schuman, G. E., 1997.** Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Science Society of America Journal*, 61:4-10.
- Kay, B. D., and VandenBygaart, A. J., 2002.** Conservation tillage and depth stratification of porosity and soil organic matter. *Soil and Tillage Research*, 66:107-118.
- Khaleel, R., Reddy, K. R. and Overcash, M. R., 1981.** Changes in soil physical properties due to organic waste applications: a review. *Journal of Environmental Quality*, 10:133-141.
- Kholodov, V. A., Konstantinov, A. I., Kudryavtsev, V. A., Perminova, I.V., 2011.** Structure of Humic Acids in Zonal Soils from <sup>13</sup>C-NMR Data. *Eurasian Soil Science*, 44(9):976–983.

**Kirchman, D. L. and Hoch M. P., 1988.** Bacterial production of the Delaware Bay estuary estimated from thymidine and leucine incorporation rates. *Marine Ecology Progress Series* 45:169-178.

**Kirchman, D. L., Newell, S. Y. and Hodson, R. E., 1986.** Incorporation versus biosynthesis of leucine: implications for measuring rates of protein synthesis and biomass production by bacteria in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, 32:47-59.

**Kirchman, D., Knees, E. and Hodson, R., 1985.** Leucine incorporation and its potential as a measure of protein-synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 49:599-607.

**Kirk, H., Macel, M., Klinkhamer, P. G. L., Vrieling, K., 2004.** Natural hybridization between *Senecio jacobaea* and *Senecio aquaticus*: Molecular and chemical evidence. *Molecular Ecology*, 13:2267–2274.

**Kleber, M., Sollins, M. R., and Sutton, R., 2007.** A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry*, 85:9–24.

**Knicker, H. and Müller, P., 2006.** Transport and immobilization of 2, 4, 6 <sup>15</sup>N-trinitrotoluene in soil microcosms subjected to long term incubation under aerobic conditions. *Water Air Soil Pollution*, 6:235-260.

**Knicker, H., 2003.** Incorporation of <sup>15</sup>N-TNT transformation products into humifying plant organic matter as revealed by one- and two-dimensional solid-state NMR spectroscopy. *Science of the Total Environment*, 308:211–220.

**Knicker, H., 2010.** “Black nitrogen” e an important fraction in determining the recalcitrance of charcoal. *Organic Geochemistry*, 41:947-950.

**Knicker, H., Almendros, G., González-Vila, F. J., González-Pérez, J. A., Polvillo, O., 2006.** Characteristic alterations of quantity and quality of soil organic matter caused by forest fires in continental Mediterranean ecosystems: a solid-state <sup>13</sup>C NMR study. *European Journal of Soil Science* 57:558-569.

**Kögel-Knabner, I., 2002.** The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:139–162.

**Kögel-Knabner, I., Hatcher, P. G., and Zech, W., 1991.** Chemical structural studies of forest soil humic acids: aromatic carbon fraction. *Soil Science Society of American Journal*, 55:241-247.

**Kögel-Knabner, I., Hatcher, P.G., Tegelaar, E.W., De Leeuw, J.W., 1992.** Aliphatic components of forest soil organic matter as determined by solid-state <sup>13</sup>C NMR and analytical pyrolysis. *Science of the Total Environment* 113:89-106.

**Kramer, C., and Gleixner, G., 2008.** Soil organic matter in soil depth profiles: distinct carbon preferences of microbial groups during carbon transformation. *Soil Biology and Biochemistry*, 40:425–433.

**Kramer, S. and Green, D. M., 2000.** Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. *Soil Biology and Biochemistry*, 32:179-188.

**Kütük, C., Cayci, G., Baran, A., Bas\_kan, O., Hartmann, R., 2003.** Effects of beer factory sludge on soil properties and growth of sugar beet (*Beta vulgaris saccharifera* L.). *Bioresource Technology*, 90:75-80.

- Kutilek, M., 2004.** Soil hydraulic properties as related to soil structure. *Soil and Tillage Research*, 79:175-184.
- Labrador, J., 1996.** La material orgánica en los agrosistemas. MAPA y Mundiprensa (Eds.), Madrid, pp. 11-28.
- Labud, V., García, C., and Hernández, T., 2007.** Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66:1863-1871.
- Ladd, J. N. and Butler, J. H. A. 1975.** Humus-enzyme systems and synthetic, organic polymer-enzyme analogs. In: Soil biochemistry, VOL 4 .Paul, E.A. and McLaren, A. d.(ed). M dekker, Inc. N.Y.
- Ladd, J. N., 1978.** Ladd Origin and range of enzymes in soil R.G. Burns (Ed.), Soil Enzymes Academic Press, London, pp. 51-96.
- Lagomarsino, A., Greco, S., Marhan, S., Moscatelli, M. C., and Kandeler, E., 2009.** Soil management modifies micro-scale abundance and function of soil microorganisms in a Mediterranean ecosystem. *European Journal of Soil Science*, 60:2-12.
- Lalande, R., Gagnon, B., Simard, R. R., and Côté, D., 2000.** Soil microbial biomass and enzyme activity following liquid hog manure in a longterm field trial. *Canadian Journal of Soil Science*, 80:263-269.
- Lapied, E., Nahmani, J. and Rousseau, G.X., 2009.** Influence of texture and amendments on soil properties and earthworm communities. *Applied Soil Ecology*, 43:241-249.
- Larchevêque, M., Ballini, C., Korboulewsky, N., Montes, N., 2006.** The use of compost in afforestation of Mediterranean areas: effects on soil properties and young tree seedlings. *Science of the Total Environment*, 369:220-230.
- Larchevêque, M., Montes, N., Baldy, V., Ballini, C., 2008.** Can compost improve *Quercus pubescens* Willd establishment in a Mediterranean post-fire shrubland? *Bioresource Technology*, 99:3754-3764.
- Larney, F. J., Janzen, H. H. 1996.** Restoration of productivity to a desurfaced soil with livestock manure, crop residue and fertilizer amendments. *Agron. J.* 88: 921-927
- Larney, F. J., Janzen, H. H., Olson, B. M., Olson, A. F., 2009.** Erosion-productivity-soil amendment relationships for wheat over 16 years. *Soil and Tillage Research*, 103:73-83.
- Lax, A., Díaz, E., Castillo, V., and Albaladejo, J., 1994.** Reclamation of physical and chemical properties of a salinized soil by organic amendment. *Arid Soil Research and Rehabilitation*. 8:9-17.
- Lees, N. D., Skaggs, B., Kirsch, D. R., and Bard, M., 1995.** Cloning of the Late Genes in the Ergosterol Biosynthetic Pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. A Review. *Lipids* 30(3):221- 226.
- Lehninger, A.L. 1989.** Enzimas de oxidación-reducción y transporte electrónico. En: Bioquímica. A.L. Lehninger (Eds.), Editorial Omega, 13ª ed., pp.487-518.
- Lguirati, A., Baddi, G.A., Mousadik, A.E., Gilard, V., Revel, J.C., Hafidi, M., 2005.** Analysis of humic acids from aerated and non-aerated urban landfill composts. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 56:8-16.

- Li, T., Di, Z., Han, X. and Yang, X. 2012. Elevated CO<sub>2</sub> improves root growth and cadmium accumulation in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Plant and Soil*, **354**: 325-334.
- Liang, Y., Nikolic, M., Peng, Y., Chen, W., Jiang, Y. 2005. Organic manure stimulates biological activity and barley growth in soil subject to secondary salinization. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**:1185-1195.
- Liao, J.D., Boutton, T. W., and Jastrow, J. D., 2006. Storage and dynamics of carbon and nitrogen in soil physical fractions following woody plant invasion of grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**:3184–3196.
- Liao, M., and Xiao, X. M., 2007. Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **66**:21-223.
- López Bermúdez, F., 1994. *Degradación del suelo ¿Fatalidad climática o mala gestión humana? Hacia una gestión sostenible del recurso en el contexto mediterráneo*. *Papeles de Geografía*, **20**:49-64.
- López Bermúdez, F., 1996. La degradación de tierras en ambientes áridos y semiáridos. Causas y consecuencias. En: *Erosión y recuperación de tierras en áreas marginales*. (T.Lasanta y J.M. Garcia Ruiz, eds.). Instituto de Estudios Riojanos, Sociedad Española de Geomorfología, Geoforma Ediciones. Logroño, 51-72.
- López-Bermúdez, F., 2006. Desertificación, una crisis ambiental silenciosa. Impactos en las regiones semiáridas mediterráneas. *Jornadas Internacionales Desertificación y Seguridad Ambiental: Consecuencias y Prevención*. Cosmocaixa, Madrid.
- López-Piñeiro A., S. Murillo, C. Barreto, A. Muñoz, J.M. Rato, A. Albarrán and A. García, 2007. Changes in organic matter and residual effect of amendment with two-phase olive-mill waste on degraded agricultural soils. *Science of Total Environment*, **378**: 84–89.
- Lowdermilk, W. C., 1953. Conquest of the land through seven thousand years. *SCS Agric. Inform. Bull.*, **99**, 30.
- Lu, X. Q., Hanna, J. V., and Johnson, W. D., 2000. Source Indicators Of Humic Substances: An Elemental composition solid state <sup>13</sup>C CP/MAS NMR and Py-GC/MS study. *Applied Geochemistry*, **15**:1019-1023.
- Lu, Z. T., Qi, W. H. and Liu, Z. H., 2000. A procedure for developing selective isolation of pseudonocardiacetes from soil samples. *Acta Microbiologica Sinica*, **40**:406-413 (in Chinese).
- Lundquist, E. J., Scow, K. M., Jackson, L. E., Uesugi, S. L. and Johnson, C. R., 1999. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming systems to a wet/dry cycle. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**:1661-1675.
- Lupwayi, N. Z., Rice, W. A., and Clayton, G. W. 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**:1733–1741.
- Mabuhay, J. A., Nakagoshi, N., and Isagi, Y., 2006. Microbial responses to organic and inorganic amendments in eroded soil. *Land Degradation and Development*, **17**:321-332.
- Magurran, A. E., 1988. *Ecological Diversity and Its Measurement*. Croom Helm, London.

- Mantovi, P., Baldoni, G., and Toderi, G., 2005.** Reuse of liquid, dewatered, and composted sewage sludge on agricultural land: effects of long-term application on soil and crop. *Water Research*, 39:289-296.
- Marhan, S., Kandeler, E. & Scheu, S. 2007.** Phospholipid fatty acid profiles and xylanase activity in particle size fractions of forest soil and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta, Lumbricide). *Applied Soil Ecology*, 35:412–422.
- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B., 2003.** Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 35:453–461.
- Martens, R., 1995.** Current methods for measuring microbial biomass-C in soil: Potentials and limitations. *Biology and Fertility of Soils*, 19:87–99.
- Martens, S. N., Breshears, D. D., Meyer, C. W., 2000.** Spatial distributions of understory light along the grassland—forest continuum: effects of cover, height and spatial pattern of tree canopies. *Ecological Modeling*, 126:79-93.
- Martin, A., Mariotti, A., Balesdent, J., Lavelle, P. and Vuattoux, R., 1990.** Estimate of organic matter turnover rate in a savanna soil by  $^{13}\text{C}$  natural abundance measurements. *Soil Biology and Biochemistry*, 22:517-523.
- Martínez, C. E., Jacobson, A. R., McBride, M. B., 2003.** Aging and temperature effects on DOC and elemental release from a metal contaminated soil. *Environmental Pollution*, 122:135-143.
- Martínez, E., Fuentes, J.-P., Silva, P., Valle, S., and Acevedo, E., 2008.** Soil physical properties and wheat root growth as affected by no-tillage and conventional tillage systems in a Mediterranean environment of Chile. *Soil and Tillage Research*, 99:232-244.
- Marzadori, C., Francioso, O., Ciavatta, C. and Gessa, C., 2000.** Activity and stability of jack bean urease in the presence of peat humic acids obtained using different extractants. *Biology and Fertility of Soils*, 32:415-420.
- Masciandaro, G., and Ceccanti, B., 1999.** Assessing soil quality in different agro-ecosystems through biochemical and chemical structural properties of humic substances. *Soil and Tillage Research*, 51:129–137.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., and Garcia, C., 2000.** “In situ” vermicomposting of biological sludges and impacts on soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 32:1015–1024.
- Mathers, N. J., Mendham, D. S., O’Connell, A. M., Grove, T. S., Xu, Z. H., Saffigna, P. G., 2003.** How does residue management impact soil organic matter composition and quality under *Eucalyptus globulus* plantations in Southwestern Australia? *Forest Ecology and Management*, 179:253–267.
- Mbagwu, J. S. C., 1992.** Improving the productivity of a degraded ultisol in Nigeria using organic and inorganic amendements. Part 2. Changes in physical properties. *Bioresource Technology*, 42:167-175.
- McAndrew, D.W., and S.S. Malhi. 1992.** Long-term N fertilization of a solonchic soil: effects on chemical and biological properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 24:619-623.
- McCarty, G. W., Shogren, D. R., and Bremner, J. M., 1992.** Regulation of urease production in soil by microbial assimilation of nitrogen. *Biology and Fertility of Soils*, 12:261-264.

- Mckinley, V.L., Vestal, J. R. and Eralp, A. E., 1985.** Microbial activity in composting. *Biocycle*, 26:39-43.
- McLaren, D., 1954.** The adsorption and reactions of enzymes and proteins on kaolinite-I. *Journal Physical Chemistry*, 58:129-137.
- Mechri, B., Echbili, A., Issaoui, M., Braham, M., Elhadj S. B., Hammami M., 2007.** Short-term effects in soil microbial community following agronomic application of olive mill wastewaters in a field of olive trees. *Applied Soil Ecology*, 36:216-223.
- Meidute, S., Demoling, F., Bååth, E., 2008.** Antagonistic and synergistic effects of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 40:2334-2343.
- Metzger, L. and Yaron, B., 1987.** Influence of sludge organic matter on soil physical properties. *Advances in Soil Science*, 7:141-163.
- Molina, J. A. E., 1996.** Description of the model NCSOIL in: D.S. Powlson, P. Smith, J.U. Smith (Eds.), Evaluation of Soil Organic Matter Models Using Existing Long-Term Datasets, NATO ASI Series I, 38:269–274.
- Montgomery, H. J., Monreal, C. M., Young, J. C., Seifert, K. A., 2000.** Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8-9):1207-1217.
- Moreno, J. L., 1997.** Uso de composts de lodo de depuradora para la mejora de la calidad de suelos de zonas áridas. Efecto de su contaminación metálica. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Moreno, J. L., García, C. and Hernández, T., 2003.** Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge[J]. *European Journal of Soil Science*, 54:377–386.
- Moreno, J. L., García, C., Hernández, T. and Pascual, J. A., 1996.** 'Transference of heavy metals from a calcareous soil amended with sewage sludge compost to barley plants'. *Bioresource Technology*, 55:251-258.
- Moreno, J. L., Jindo, K., Hernández, T., García, C., 2007.** Total and immobilized enzymatic activity of organic materials before and after composting. *Compost science and utilization*, 15:93-100.
- Murphy, J. and Riley, J. P., 1962.** A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27:31-36.
- Mustin, M., 1987.** Le compost, gestion de la matière organique. F. Dubusc Eds., Paris, pp. 954.
- Nair, S. S., King, S., Zhang, X., Miguez, F. E., Izaurralde, R. C., Post, W. M., Dietze, M. C., Lynd, L. R., Wullschleger, S. D., 2012.** Bioenergy crop models: descriptions, data requirements, and future challenges. *Global Change Biology: Bioenergy*, doi: 10.1111/j.1757-1707.2012.01166.x
- Nannipieri, P., and Eldor, P., 2009.** The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:2357–2369.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Conti, C. 1982.** Hydrolases extracted from soil: Kinetic parameters of several enzymes catalysing the same reaction. *Soil Biology and Biochemistry*, 5:429-432.

- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Matarese, E., 1980.** Extraction of phosphatase, urease, proteases, organic carbon, and nitrogen from soil. *Soil Science Society of America Journal*, 44: 1011-1016.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Sequi, P., 1974.** Use of 0.1 M pyrophosphate to extract urease from apodzol. *Soil Biology and Biochemistry*, 6:359-362.
- Nannipieri, P., Grego, S., Ceccanti, B. 1990.** Ecological significance of the biological activity in soils. In: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.). *Soil biochemistry*, 293-355.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., and Ruggiero, P., 2002.** Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: *Enzymes in the Environment* (eds R.G.Burns and R.Dick), pp.1–33. Marcel Dekker, New York.
- Nannipieri, P., Pechozzini F., Arcada, P.G., Pioranelli, C. 1979.** Changes in amino acids, enzyme activities and biomass during soil microbial growth. *Soil Science*, 127:26-34.
- Nannipieri, P., Sequi, P., Fusi, P. 1996.** Humus and enzyme activity. En: Piccolo, A. (Ed.). *Humus substances in terrestrial ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, pp. 293-329.
- Navarro Pedreño, J., Moral Herrero, Gómez Lucas y Mataix Beneyto., 1995.** *Residuos orgánicos y agricultura*. Universidad de Alicante. Servicio de Publicaciones. Alicante. España, 108 pp. nitrogen deposition increase forest production? The role of phosphorus. *Environmental Pollution*, 158(6): 2043–2052.
- Newell, S. Y. and Fallon, R. D., 1991.** Toward a method for measuring instantaneous fungal growth rates in field samples. *Ecology*, 72:1547-1559.
- Newell, S. Y., Arsuffi, T. L. and Fallon, R. D., 1988.** Fundamental procedures for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7):1876-1879.
- Nicolás, C., Hernández, T., and García, C., 2012.** Organic amendments as strategy to increase organic matter in particle-size fractions of a semi-arid soil. *Applied Soil Ecology*, 57:50-58.
- Nicolás, C., Masciandaro, G., Hernández, T., García, C., 2012.** Chemical-structural changes of organic matter in a semi-arid soil after organic amendment. *Pedosphere*, 22:283-293.
- Nogales, R., Elvira, C., Benítez, E., Gallardo-Lara, F., 1995.** Uso agrícola de compost y vermicompost de basuras urbanas (III): Capacidad de cesión de nutrientes al suelo y a la planta. *Residuos*, 29:61-67.
- Nunan, N., 2003.** Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *Microbiology Ecology*, 44:203-215.
- O' Connor, G. A., Knudtsen, K. L., and Connell, G. A., 1986.** Phosphorus solubility in sludge amended calcareous soils. *Journal of Environmental Quality*, 15: 308-312.
- O'Connor, K. F., and Clifford, P. T. P., 1966.** Fertiliser economy in run development Review Tussock Grasslands and Mountain Lands Institute, 11: 46-49.
- O'Connor, K., Nordmeycr, A., Condrón, L., Davis, M., Espie, P., Gibson, R., Harris, P., Metherell. A., Patterson, R., Sinclair, A., Svavarsdottir, K., Tonkin, P., 1996.** Safeguarding the life-supporting capacity

of soil and ecosystems: a survey of the role of high country soil fertility research. Lincoln: Centre for Mountain Studies.

**Oades, J. M., 1984.** Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant Soil*, 76:319-337.

**O'Dell, R., Silk W., Green, P., Claassen, V., 2007.** Compost amendment of Cu–Zn minespoil reduces toxic bioavailable heavy metal concentrations and promotes establishment and biomass production of *Bromus carinatus* (Hook and Arn.). *Environmental Pollution*, 148:115-124.

**Olsson, P. A., 1999.** Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 29:303–310.

**Olsson, P. A., Van Aarle, I. M., Allaway, W. G., Ashford, A. E., Rouhier, H., 2002.** Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiology*, 130:1162-1171.

**Ouedraogo, M., Paturel, J. E., Mahe´, G., Servat, E., Dezetter, A., Conway, D., 2001.** Influence de la nature et de l'origine des donne´es sur la mode´lisation hydrologique de grands bassins versants en Afrique de l'Ouest. In: Dolman, A.J., Hall, A.J., Kavvas, M.L., Oki, T., Pomeroy, J.W. (Eds.), *Soil–Vegetation–Atmosphere Transfer Schemes and Large-Scale Hydrological Models*, Proceedings of the Sixth IAHS Scientific Assembly, Maastricht, the Netherlands. 270:209–214.

**Ovreas, L., 2000.** Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, 3:236-251.

**Pagliai, M., Guido, G., La Marca, M., Giachetti, M., Lucamante, G., 1981.** Effects of sewage sludge and compost on soil porosity and aggregation. *Journal of Environmental Quality*, 10:556-561.

**Park, B. B., Yanai, R. D., Vadeboncoeur, M. A., Hamburg, S. P., 2007.** Estimating root biomass in rocky soils using pits, cores, and allometric equations. *Soil Science Society of America Journal*, 71:206-213.

**Park, E. J., Sul, W. J., Smucker, A. J. M., 2007.** Glucose additions to aggregates subjected to drying and wetting cycles promote carbon sequestration and aggregate stability. *Soil Biology and Biochemistry*, 39:2758-2768.

**Pascual, J. A., Garcıa, C. and Hernandez, T., 1999.** Lasting microbiological and biochemical effects of the addition of municipal solid waste to an arid soil. *Biology and Fertility of Soils* 30:1-6.

**Pascual, J. A., Garcıa, C., Hernandez, T., Ayuso, M., 1997.** Changes in the microbial activity of an arid soil amended with urban organic wastes. *Biology and Fertility of Soils*, 24:429-434.

**Pascual, J. A., Hernandez, T., Garcıa, C., Ayuso, M., 1998.** Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: Laboratory experiment. *Bioresource Technology*, 64:131-138.

**Pascual, J. A., Moreno, J. L., Hernandez, T., Garcıa, C., 2002.** Persistence of immobilised and total urease and phosphatase activities in a soil amended with organic wastes. *Bioresource Technology*, 82:73-78.

**Pascual, J.A., Garcıa, C., Hernandez, T., Moreno, J. L., Ros, M., 2000.** Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(13): 1877-1883.

- Peacock, A. D., Mullen, M. D., Ringelberg, D. B., Tyler, D. D., Hedrick, D. B., Gale, P. M., White, D. C., 2001.** Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:1011-1019.
- Pérez, A. 1998.** Caracterización y aplicación agrícola de un humato férrico procedente de sistemas acuáticos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Pérez, D. V., Alcantra, S., Ribeiro, C. C., Pereira, R. E., Fontes, G. C., Wasserman, M. A., Venezuela, T.C., Meneguelli, N. A., Parradas, C. A. A., 2007.** Composted municipal waste effects on chemical properties of Brazilian soil. *Bioresource Technology*, 98:525–533.
- Pérez, J. D., Esteban, E., Gómez, M., Gallardo-Lara, F., 1986.** Effects of wastewater from o live processing on seed germination and early plant growth of different vegetable species. *Journal of Environmental Science and Health*, B21, 349-357.
- Perucci, P., 1990.** Effect on the addition of municipal solid waste compost on microbial biomass and enzyme activities. *Biology and Fertility of Soils*, 10:221–226.
- Perucci, P., 1992.** Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biology and Fertility of Soils*, 14:54-60.
- Petersen, S.O., Henriksen, K., Mortensen, G.K., Krogh, P.H., Brandt, K.K., Sorensen, J., Madsen, T., Petersen, J., Gron C., 2003.** Recycling of sewage sludge and household compost to arable land: fate and effects of organic contaminants, and impact on soil fertility. *Soil and Tillage Research*, 72:139-152.
- Pettit, N. M., Smith, A. R. J., Freedman, R. B., Burns, R. G., 1976.** Soil urease: activity, stability, and kinetic properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 8:479-484.
- Piccolo, A., Pietramellara, G. and Mbagwu, J. S. C., 1997.** Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. *Geoderma*, 75:267-277.
- Piccolo. A. and Mbagwu, J. S. C., 1990.** Effects of diferent organic waste amendments on soil microaggregate stability and molecular sizes of humic substances. *Plant and Soil*, 123: 27-37.
- Pichtel, J. R., W. A. Dick and Sutton, P., 1994.** Comparison of amendments and management practices for long - term reclamation of abandoned mine lands. *Journal of Environmental Quality*, 23:766 -772.
- Pigozzo, A. T. G., Lenzi, E., Junior, J. L., Scapin, C., Da Costa, A. C. S., 2006.** Transition metal rates in latosol twice treated with sewage sludge. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49 (3):515–526.
- Pinamonti, F., 1998.** Compost mulch effects on soil fertility, nutritional status and performance of grapevine. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51:239-248.
- Plaza, C., Hernández, D., García-Gil, J. C., Polo, A., 2004.** Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 36:1577-1585.
- Poll, C., Thiede, A., Wermbter, N., Sessitsch, A., Kandeler, E. 2003.** Micro-scale distribution of microorganisms and microbial enzyme activities in a soil with long-term organic amendment. *European Journal of Soil Science*, 54:715-724.

- Polo, A., Muñoz, F., Plaza, C., García-Gil, J. C., 2001.** Effects of municipal solid waste compost application on microbial parameters. XII World Fertilizer Congress, Beijing, August 3-9.
- Porta, J., 1986.** Técnicas y experimentos en Edafología. Colegi Oficial d'Enginyers Agrònoms de Catalunya, Barcelona, España.
- Porta, J., López-Acevedo, M., and Roquero, C., 2005.** Información de suelos para la agricultura y el medio ambiente'. (Mundi-Prensa Editorial: Madrid).
- Portal, J.M., Pillon, P. Jeanson, P., Gerard, B., 1986.** Oxygen-containing functional groups in land-derived humic acids. Evaluation by derivatization methods. *Organic Geochemistry*, 9:305-311.
- Powlson, D. S., Brookes, P. C., and Christensen, B. T., 1987.** Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic-matter due to straw incorporation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19:159-164.
- Prasad, A. B., Allard, M. W., and Green, E. D., 2008.** Confirming the phylogeny of mammals by use of large comparative sequence data sets. *Molecular Biology and Evolution* 25:1795-1808.
- Preston, C. M., 1996.** Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Science*, 161:144-166.
- Preston, C. M., Trofymow, J. A., Niu, J., Fyfe, C. A., 1998.** <sup>13</sup>CPMAS-NMR spectroscopy and chemical analysis of coarse woody debris in coastal forests of Vancouver Island. *Forest Ecology and Management*, 111:61-68.
- Preston-Mafham, J., Boddy, L., and Randerson, P. F., 2002.** Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles e a critique. *FEMS Microbiology Ecology*, 42:1-14.
- Puglisi, E., Nicelli, M., Capri, E., Trevisan, M., Del Re, A.A.M. 2005.** A soil alteration index based on phospholipid fatty acids. *Chemosphere*, 61: 1548-1557.
- Puglisi, E., Del Re, A. A. M., Rao, M. A., Gianfreda, L., 2006.** Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:1673-1681.
- Pulleman, M. M. and Marinissen, J. C. Y., 2004.** Physical protection of mineralizable C in aggregates from long-term pasture and arable soil. *Geoderma* 120:273-282.
- Quezada, L., 2002.** Microbial activity in a volcanic ash soil under different agricultural management. *Agricultura Técnica*, 62:297-309.
- Rad, J. C., Navarro-González, M., and González-Carcedo, S., 1995.** Characterization of proteases extracted from a compost of municipal solid wastes. *Geomicrobiology Journal*, 13: 45-56.
- Randall, E. W., Mathieu, N., Powlson, D. S., Christensen, B. T., 1995.** Fertilization effects on organic matter in physically fractionated soils as studied by <sup>13</sup>C NMR: results from two long-term experiments. *European Journal of Soil Science*, 46:557-565.
- Randhawa, P. S., Condon, L. M. Di, H. J. Sinaj, S., McLenaghan, R. D., 2005.** Effect of green manure addition on soil organic phosphorus mineralization. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 73:181-189.

- Rashedul I., Puneet S. C., Yoohak K., Myung Sook K., Tongmin S., 2011. Community level functional diversity and enzyme activities in paddy soils under different long-term fertilizer management practices. *Biology and Fertility of Soils*, 47:599–604.
- Rethemeyer, J., Kramer, C., Gleixner, G., John, B., Yamashita, T., Flessa, H., Andersen, N., Nadeau, M. J., Grootes, P. M., 2005. Transformation of organic matter in agricultural soils: radiocarbon concentration versus soil depth. *Geoderma*, 128:94–105.
- Ribeiro, H. M., Vasconcelos, E., Ribeiro, D., Cabral, F., Santos, J. Q., 2001. Utilizacao de casca de pinheiro envelhecida na cultura de plantas ornamentais envasadas. *Revista de Ciencias Agrarias XXIV*(3–4):176–183.
- Ricca, G., Severini, F., Di Silvestro, G., Yuan, C. M., Adani, F., 2000. Derivatization and structural studies by spectroscopic methods of humic acids from Leonardide. *Geoderma*, 98:115–125.
- Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Saviozzi, A., 1983. Humic fractions of organic wastes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 10:353–359.
- Riffaldi, R., Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., 2002. Biochemical properties of a Mediterranean soil as affected by long-term crop management systems. *Soil and Tillage Research*, 69:109–114.
- Rillig, M. C., Wright, S. F. and Eviner, V., 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant Soil* 238:325–333.
- Roldán, A., Albaladejo, J., and Thornes, J. B., 1996. Aggregate stability changes in a semiarid soil after treatment with different organic amendments. *Arid Land Research and Management*, 10:139–148.
- Roldán, A., García-Orenes, F. and Lax, A., 1994. An incubation experiment to determine factors involving aggregation changes in an arid soil receiving urban refuse. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1699–1707.
- Ros, M., 2000. Recuperación de suelos agrícolas abandonados mediante el reciclaje en los mismos de residuos orgánicos de origen urbano. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Ros, M., Goberna, M., Pascual, J. A., Klammer, S., Insam, H., 2008: 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. *Journal of Microbiological Methods*, 72:221–226.
- Ros, M., Hernández, M. T., García, C., 2003. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 35:463–469.
- Ros, M., Hernández, T., and García, C., 2003. Biorremediation of soil degraded by sewage sludge: effects on soil properties and erosion losses. *Environmental Management*, 31:741–747.
- Ros, M., Pascual, J. A., García, C., Hernández, M. T., Insam, H., 2006. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:3443–3452.
- Ross, D. J., Speir, T. W., Tate, K. R., Cairns, A., Meyrich, K. F., Pansier, E. A., 1982. Restoration of pasture after topsoil removal: effect of soil carbon and nitrogen mineralization, microbial biomass and enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 14:575–81.

- Rothon, F. E., 2000.** Influence of time on soil response to no-till practices. *Soil Science Society of America Journal*, 64: 700-709.
- Rousk, J. and Bååth, E., 2007a.** Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. *FEMS Microbiology Ecology*, 62:258-267.
- Rousk, J. and Bååth, E., 2007b.** Fungal biomass production and turnover in soil estimated using the acetate-in-ergosterol technique. *Soil Biology and Biochemistry*, 39:2173-2177.
- Rousk, J., Ald'en Demoling, L., Bahr, A., Bååth, E., 2008.** Examining the fungal and bacterial niche overlap using selective inhibitors in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 63:350–358.
- Rousk, J., Brookes P. C., Bååth E., 2010a.** The microbial PLFA composition as affected by pH in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42:516-520.
- Rousk, J., Brookes P. C., Bååth E., 2010b.** Investigating the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42:926-934.
- Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2009.** Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:1589-1596.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., & Lauber, C. L. 2010c.** Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 4:1340-1351.
- Rowell, M. J., Ladd, J. N. and Paul, E. A., 1973.** Enzymatically active complexes of proteases and humic acid analogues. *Soil Biology and Biochemistry*, 5:699-703.
- Ruiz, T. E. y Febles, G., 2004.** La desertificación y la sequía en el mundo. AIA Vol. 8-2 p.
- Ruiz, T. E. y Febles, G., 2004.** La desertificación y la sequía en el S.Y. Newell, R.D. Fallon. Toward a method for measuring instantaneous fungal growth rates in field samples. *Ecology*, 72:1547–1559.
- Samios, S., Kousouris, L., Tzoumerkas, P., Lekkas, T., Golfopoulos, S., Nikolaou, A., 2007.** A kinetics study of THMs formation in surface waters supplying Athens. *Desalination*, 213:253–262.
- Samios, S., Lekkas, T., Nikolaou, A., Golfopoulos, S., 2007.** Structural investigations of aquatic substances from different watershed. *Desalination*, 210:125–137.
- Sánchez-Martin, M. J., García-Delgado, M., Lorenzo, L. F., Rodríguez-Cruz, M. S., Arienzo, M., 2007.** Heavy metals in sewage sludge amended soils determined by sequential extractions as a function of incubation time of soils. *Geoderma*, 142:262–273.
- Sánchez-Monedero, M. A., Roig, A., Cegarra, J., Bernal, M. P., Paredes C., 2002.** Effects of HCl–HF purification treatment on chemical composition and structure of humic acids. *European Journal of Soil Science*, 53:375–381.
- Sarkar, J. M., and Burns, R. G., 1984.** Synthesis and properties of  $\beta$ -glucosidase-phenolic copolymers as analogues of soil humic-enzyme complexes. *Soil Biology and Biochemistry*, 16(6): 619 - 625.

- Sasal, C.; Andriulo, A.; Ulle, J.; Abrego, F. y Bueno, M., 2000.** Efecto de diferentes enmiendas sobre algunas propiedades edáficas, en sistemas de producción hortícola del centro norte de la región pampeana. *Ciencia del Suelo* 18 (2):95-104.
- Saviozzi, A., Bufalino P., Levi-Minzi R., and Riffaldi R., 2002.** Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study. *Biology and Fertility of Soils*, 35:96-101.
- Schimel, D. S., House, J. I., Hibbard, K. A., 2001.** Recent patterns and mechanisms of carbon exchange by terrestrial ecosystems. *Nature*, 414:169-72.
- Schimel, J. P. and Weintraub, M. N., 2003.** The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 549-563.
- Schlegel, A. J., 1992.** Effect of composted manure on soil chemical properties and nitrogen use by grain sorghum. *Journal of Applied Agricultural Economics*, 5:153-157.
- Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J. C., 2003.** Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture Ecosystem and Environment*, 98:255-262.
- Schnitzer, R. M., 1978.** Humic substances: Chemistry and reactions. In *Soil Organic Matter*. (eds M. Schnitzer and S. U. Khan), pp. 1-64. Elsevier.
- Schnürer, J., Clarholm, M. and Rosswall, T., 1985.** Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 17: 611-618.
- Schulten, H. R. and Schnitzer, M., 1998.** The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 26: 1-15.
- Schulze, E. D., and Freibauer, A., 2005.** Environmental science: Carbon unlocked from soils. *Nature*, 437(7056):205-206.
- Senesi, N., and Brunetti, G., 1996.** Chemical and physico-chemical parameters for quality evaluation of humic substances produced during composting. European Commission International Symposium. The Science of Composting. M. Bertoli, P. Sequi, B. Lemmes, T. Papi (Eds.), Chapman & Hall, pp. 195-212.
- Senesi, N., and Loffredo, E., 1999.** The chemistry of soil organic matter. In: *Soil Physical Chemistry*. D.L. Sparks (Ed.) CRC Press, pp.242-345.
- Senesi, N., Plaza, C., Brunetti, G., Polo, A., 2007.** A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances. *Soil Biology and Biochemistry*. 39:1244–1262.
- Seybold, C. A., Mausbach, M. J., Karlen, D. L., Rogers, H. H., 1998.** Quantification of soil quality. p. 387–404. In R. Lal et al. (ed.) *Soil processes and the carbon cycle*. Advan. soil science. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Shen, Y., Ström, L., Jonsson, J. and Tyler, G., 1996.** Low-molecular organic acids in the rhizosphere soil solution of beech forest (*Fagus sylvatica* L.) cambisols determined by ion chromatography using supported liquid membrane enrichment technique. *Soil Biology and Biochemistry*, 28:1163-1169.

- Sims, J.R. and Haby, V.A., 1971.** Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil Science* 112:137-141.
- Singer, M. J., and Ewing, S., 2000.** Soil Quality. *En Handbook of Soil Science. Chapter 11* (ed. Sumner, M. E.), 271-298, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Singh, R. P., and Agrawal, M., 2008.** Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Manage*, 28:347–358.
- Sinsabaugh, R. L., Antibus, R. K., Linkins, A. E., McClaugherty, C. A., Rayburn, L., Repert, D., Weiland, T., 1993.** Wood decomposition: nitrogen and phosphorus dynamics in relation to extracellular enzyme activity. *Ecology*, 74:1586-1593.
- Sinsabaugh, R. L., Carreiro, M. M., and Repert, D. A., 2002.** Allocation of extracellular enzymatic activity in relation to litter composition, N deposition, and mass loss. *Biogeochemistry*, 60:1-24.
- Six, J., and Jastrow, J. D., 2002.** Organic matter turnover. In: Lal R (ed) Encyclopedia of soil science. Marcel Dekker, New York, pp 936–942.
- Six, J., Elliott, E. T. and Paustian, K., 2000a.** Soil structure and soil organic matter: II. A normalized stability index and the effect of mineralogy. *Soil Science Society of America Journal*, 64:1042-1049.
- Six, J.; Paustian, K.; Elliott, E.T.; Combrink, C., 2000b.** Soil structure and organic matter: I. Distribution of aggregate-size classes and aggregate-associated carbon. *Soil Science Society of America Journal*, 64:681-689.
- Skjemstad, J. O., Clark, P., Golchin, A., Oades, J. M., 1997.** Characterization of soil organic matter by solid state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, in *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition*, edited by G. Cadisch and K. Giller, pp. 253– 271.
- Skujins, J., 1976.** Extracellular enzymes in soil. *Critical Reviews in Microbiology*, 4:383-421.
- Skujins, J., 1978.** History of Abiotic Soils Enzyme Research. En: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, London, pp. 1-49.
- Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W. T., Forney, L., 1998.** Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:1220–1225.
- Smith, J. L., Papendick, R. I., Bezdick, D. F., Lynch, J. M., 1993.** Soil organic matter dynamics and crop residue management. In: *Soil Microbial Ecology*. B. Meting (Ed.), Marcer Dekker, New York, pp. 65-95.
- Smith, S. E. and Read, D. J., 1997.** Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, Inc San Diego California. ISBN 0-12-652840-3.
- Söderberg, K. H., and Bååth, E., 1998.** Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 30:1259-1268.
- Söderberg, K. H., Olsson, P. A. and Bååth, E., 2002.** Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. *FEMS Microbiology Ecology*, 40:223-231.

- Sodhi, G. P. S., Beri, V., and Benbi, D. K., 2009.** Soil aggregation and distribution of carbon and nitrogen in different fractions under long-term application of compost in rice-wheat system. *Soil and Tillage Research*, 103:412-418.
- Soler, P., 1998.** Evaluación de impacto ambiental y riesgo de contaminación producidos por la aplicación agrícola de lodos de depuradora. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Soler P., Alonso N., Polo A. (1997). Destino de los lodos de depuradoras: un reto ante el siglo XXI. *Residuos* 38:16-20.
- Soler, P., Alonso, N., and Polo, A., 1997.** Destino de los lodos de depuradora: un reto ante el siglo XXI. *Residuos* 38, 16-20.
- Soler, P., García-Gil, J. C., and Polo, A. 1998.** Evaluación de tres tipos diferentes de lodos de depuradora en su aplicación agrícola. *Residuos*, 44:82-86.
- Solomon, D., Lehmann, J., and Zech, W., 2000.** Land use effects on soil organic matter properties of chromic Luvisols in semi-arid northern Tanzania: carbon, nitrogen, lignin and carbohydrates. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 78:203-213.
- Song, X. H, Polissar, A. V., Hopke, P. K., 2001.** Source of fine particle composition in the northeastern US. *Atmospheric Environment Journal*, 35:5277– 5286.
- Song, Z. P., Lu, B. R., Zhu, Y. G., Chen, J. K., 2001.** Changes of genetic structure in common wild rice (*Oryza rufipogon*) populations as referred to by RAPD markers. *Journal Genetics and Molecular Biology*, 12:78–84.
- Sowerby, A., Emmett, B. A., Beier, C., 2005.** Microbial community changes in heathland soil communities along a geographical gradient: *interaction with climate change manipulations*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:1805–1813.
- Sparke, S., Putwain, P. and Jones, J., 2011.** The development of soil physical properties and vegetation establishment on brownfield sites using manufactured soils. *Ecological Engineering*, 37(11):1700-1708.
- Stamatiadis, S., Doran, J. W. and Kettler, T., 1999.** Field and laboratory evaluation of soil quality changes resulting from injection of liquid sewage sludge. *Applied Soil Ecology*, 12:263-272.
- Steelink, C., 1985.** Implications of elemental characteristics of humic substances. In: Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L., MacCarthy, P. (Eds.), *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*. Wiley, New York, pp. 457–476.
- Steffens, M., Kölbl, A., Elfriede, S., Gschrey, B., Knabner, I. K., 2011.** Distribution of soil organic matter between fractions and aggregate size classes in grazed semiarid steppe soil profiles. *Plant and Soil*, 338:63–81.
- Steffens, M., Kölbl, A., Giese, M., Hoffmann, C., Totsche, K. U., Breuer, L., Kögel-Knabner, I., 2009.** Spatial variability of topsoils and vegetation in a grazed steppe ecosystem in Inner Mongolia (PR China). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(1):78-90.
- Stemmer, M., Gerzabek, M. H., and Kandeler, E., 1998.** Organic matter and enzyme activity in particle-size fractions of soils obtained after low-energy sonication. *Soil Biology and Biochemistry*, 30:9–17.

**Stevenson, F. J., 1982.** Humus chemistry: Genesis, Composition, Reactions. Wiley Interscience Publications. John Wiley and Sons, New York. Chapter 2, p. 26-54

**Stevenson, F. J., 1994.** Humus chemistry: Genesis, composition, reactions. John Wiley and Sons. New York, 512 p.

**Stevenson, F.J., Fitch, A., 1986.** Chemistry of complexation of metal ions with soil solution organics. In: S.S.S.A. \_Ed. Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes. Special publication n° 17, 29–58.

**Stewart, C. E., Paustian, K., Conant, R. T., Plante, A. F., Six, J., 2009:** Soil carbon saturation: Implications for measurable carbon pool dynamics in long-term incubations. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:357-366.

**Stewart, C. E., Paustian, K., Conant, R. T., Plante, A. F., Six, J., 2007.** Soil carbon saturation: concept, evidence and evaluation. *Biogeochemistry*, 86:19-31.

**Stoate, C., Boatman, N. D., Borralho, R. J., Rio Carvalho, C., de Snoo, G. R., Eden, P., 2001.** Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management*, 63:337–365.

**Stryer, L. 1995.** Biochemistry 4<sup>th</sup> edn. Freeman, New York.

**Suhadolc, M., Schroll, R., Hang, A., Dorfler, U., Schloter, M., Lobnik, F., 2010.** Single application of sewage sludge, impact on the quality of an alluvial agricultural soil. *Chemosphere*, 81(11):1536-43.

**Swift, R. 2001.** Sequestration of carbon by soil. *Soil Science*, 166:858-871.

**Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. and Zuberer, D. A. (eds.), 1998.** Principles and Applications of Soil Microbiology. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. 550p.

**Tabatabai, M. A., 1977.** Effects of trace elements on urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9:1–13.

**Tabatabai, M. A., 1982.** Page, A. L., Miller, R. H. and Keeney, D. R. (eds) Soil Enzymes. En: Methods of Soil Analysis. Chemical and Microbiological Properties Part 2: 903-947 2nd Ed. Agronomy 9, ASA-SSSA. Madison.

**Tabatabai, M. A., 1982.** Soil enzymes. En: Page, A.L. (Ed.). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2<sup>nd</sup> edition. Soil Science Society of America, Madison, pp. 903-947.

**Tabatabai, M. A., 1994.** Soil enzymes. En: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S., Bezdecek, D., Smith, S., Tabatabai, M.A., Wollum, A. (Eds.). Methods of soil analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties-SSSA Book Series, no. 5. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA. pp. 775--833.

**Tabatabai, M. A., and Bremner, J. M., 1969.** Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1:301-307.

**Tate, R. L., 2000.** Soil Microbiology. 2nd ed. John Wiley, New York.

**Tejada, M., and González, J. L., 2007.** Influence of organic amendments on soil structure and soil loss under simulated rain. *Soil and Tillage Research*, 93:197–205.

- Tejada, M., González, J. L., 2007.** Application of different organic wastes on soil properties and wheat yield. *Agronomy Journal*, 99:1597–1606.
- Tejada, M., Hernández, M. T., and García, C., 2006.** Application of two organic amendments on soil restoration: Effects on the soil biological properties. *Journal of Environmental Quality*, 35:1010-1017.
- Tejada, M., Hernández, T., and García, C., 2009.** Soil restoration using composted plant residues: Effects on soil properties. *Soil and Tillage Research*, 102:109-117.
- Tejada, M., Moreno, J. L., Hernández, M. T., García, C., 2007.** Application of two beet vinasse forms in soil restoration: effects on soil properties in an arid environment in southern Spain. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119:289–298.
- Terry, R., Nelson, D. and Sommers, L., 1979.** Descomposición of anaerobically digested sewage sludge as affected by soil environmental conditions. *Journal of Environmental Quality*, (8):3-12.
- Tester, C. F., 1990.** Organic amendment effects on physical and chemical properties of a sandy soil. *Soil Science Society of America Journal*, 54:827–831.
- Teuber, N., Salazar, F., Alfaro, M., Valdebenito, A., 2007.** Efecto de diferentes dosis de lodos de la crianza de salmones en el cultivo de papa y su efecto residual en ballica anual. *Agricultura Técnica (Chile)*, 67:393-400.
- Tibbles, B. J. and Harris, J. M., 1996.** Use of radiolabelled thymidine and leucine to estimate bacterial production in soils from continental Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:694-701.
- Tidwell, S.E., and Breslin, V.T., 1995.** Characterization and leaching of elements from municipal solid waste compost. *Journal of Environmental Quality*, 24, 827–833.
- Tiquia, S. M., 2002.** Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 764-775.
- Tisdall, J. M. and Oades, J.M., 1982.** Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Soil Science*, 62:141-163.
- Tognetti, C., Mazzarino, M. J. and Laos, F., 2008.** Compost of municipal organic waste: Effects of different management practices on degradability and nutrient release capacity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9):2290-2296.
- Tonelli, D., Seeber, R., Ciavatta, C., Gessa, C., 1997.** Extraction of humic acids from a natural matrix by alkaline pyrophosphate. Evaluation of the molecular weight of fractions obtained by ultrafiltration. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 359:555–560.
- Trasar Cepeda, C., Gil Sotres, F. y Leirós De La Peña, M. C., 2003.** Determinación de la actividad deshidrogenasa del suelo. En: GARCÍA, C.; GIL, F.; HERNÁNDEZ, T. and TRASAR, C. (Eds.). Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Ed. Mundi-Prensa, pp. 211-227.

- Trasar-Cepeda, C., Leiros, C., Gil-Sotres, F., Seoane, S., 1998.** Towards a biochemical quality index for soils: An expression relating several biological and biochemical properties. *Biology and Fertility of soils*, 26:100-106.
- Trevors, J. T., Mayfield, C. I., and Inniss, W. E., 1982.** Measurement of electron transport systems (ETS) activity in soil. *Microbial Ecology*, 8:163-168.
- Tscherko, D., Hammesfahr, U., Marx, M. C., Kandeler, E., 2004.** Shifts in rizosphere microbial communities and enzyme activity of *Poa alpine* across an alpine chronosequence. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1685-1698.
- Tscherko, D., Hammesfahr, U., Zeltner, G., Kandeler, E., Bocker, R. 2005.** Plant succession and rizosphere microbial communities in a recently deglaciated alpine terrain. *Basic and Applied Ecology*, 6, 367-383.
- Tunlid, A. and White, D. C., 1992.** Biochemical analysis of biomass community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. p. 229-262. In: Stotzky, D.G.; Bollag, J.M., eds. *Soil biochemistry*: Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Van Noordwijk, M., Schhonderbeek, D., and Kooistra, M. J., 1993.** Root-soil contact of grown winter wheat. *Geoderma*, 56:277–286.
- Van-Camp, L., Bujarrabal, B., Gentile, A. R., Jones, R. J. A., Montanarella, L., Olazabal, C., Selvaradjou, S. K., 2004.** Volume III – Organic matter and biodiversity. Reports of the Technical Working Groups established under the Thematic Strategy for Soil Protection. EUR 21319 EN/3, 872 pp. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Vance, E., Brookes, P., and Jenkinson, D., 1987.** An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19:703-707.
- Varnero, M. T., Faúndez, P., Santibáñez, C., Alvarado, P., 2004.** Evaluación de lodo fresco y compostado como materia prima para la elaboración de sustratos. En: M. Mora (ed). *Simposio Residuos Orgánicos y su Uso en Sistemas Agroforestales*. Universidad de la Frontera, Temuco, Chile, pp. 477-481.
- Velasco-Velasco, V. J., Figueroa, S. B., Ferrera, C. R., Trinidad, S. A., Gallegos, S. J., 2004.** CO<sub>2</sub> y dinámica de poblaciones microbianas en composta de estiércol y paja con aireación. *Terra Latinoamericana* 22:307-316.
- Vinten, A. J. A., Whitmore, A. P., Bloem, J., Howard, R., Wright, F., 2002.** Factors affecting N immobilisation/mineralisation kinetics for cellulose, glucose and straw-amended sandy soils. *Biology and Fertility of Soils*, 36:190-199.
- Von Mersi W., and Schinner F., 1991.** An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chloride. *Biology and Fertility of Soils*, 11:216-220.
- Wakelin, S. A., Anand, R. R., 2012.** Bacterial communities associated with a mineral weathering profile at a sulphidic mine tailings dump in arid Western Australia. *FEMS Microbiology Ecology*, 79 (2):298-311.
- Waldrop, M. P., Balsler, T. C. and Firestone, M. K., 2000.** Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32:1837-1846.

- Walter, L., 1992.** Contaminación por metales pesados de lodos de depuradoras. CSIC (Ed.). Madrid.
- Wang, K. H., McSorley, R., Marshall, A. J. and Gallaher, R. N., 2004.** Nematode community changes following decomposition of *Crotalaria juncea* amendment in litterbags. *Applied Soil Ecology*, 27:31-45.
- Wardle, D. A., 1992.** A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological Reviews*, 67:321–358.
- Wardle, D. A., and Ghani, A., 1995.** A critique to the microbial metabolic quotient ( $qCO_2$ ) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(12):1601-1610.
- Watanabe, A., Kawasaki, S., Kitamura, S., Yoshida, S., 2007.** Temporal changes in humic acids in cultivated soils with continuous manure application. *Soil Science and Plant Nutrition*, 53:535-544.
- Watanabe, S., Farias, T. M. B., Gennari, R. F., Ferraz, G. M., Kunzli, R., 2007.** Chemical Process to separate Iron Oxides Particles in Pottery Sample for EPR Dating, *Spectrochimica. Acta. Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 10:10-18.
- Weber, J., Karczewska, A., Drozd, J., Licznar, M., Licznar, S., Jamroz, E., Kocowicz, A., 2007.** Agricultural and ecological aspects of a sandy soil as affected by the application of municipal solid waste composts. *Soil Biology and Biochemistry*, 39:1294-1302.
- Weber, K. P. and Legge, R. L., 2009.** One-dimensional metric for tracking bacterial community divergence using sole carbon source utilization patterns. *Journal of Microbiological Methods*, 79 (1): 55-61.
- Webster, J., Hampton, G., Leach, F. 1984.** ATP in soil: a new extractant and extraction procedure. *Soil Biology and Biochemistry*, 16:335-342.
- Weete, J. and Gandhi, S., 1996.** Biochemistry and molecular biology of fungal sterols. In: *The Mycota*, vol. III. Springer-Verlag, Berlin, pp. 421-438
- Weimei, J., Guanmei, Y., Chulong, Z., Chenxin, F., 2011.** Species composition and molecular analysis of symbiotic fungi in roots of *Changnienia amoena* (Orchidaceae). *African Journal of Microbiology Research* 5(3):222-228.
- Whalen, J. K., Willms, W. D. and Dormaar, J. F., 2003.** Soil carbon, nitrogen and phosphorus in modified rangeland communities. *Journal of Rangeland Management*, 56: 665-672.
- Wheatley, R. E., Ritz, K., Crabb, D., Caul, S., 2001.** Temporal variations in potential nitrification dynamics in soil related to differences in rates and types of carbon and nitrogen inputs. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:2135-2144.
- White, B. R., 1979.** Soil transport by winds on Mars. *Journal of Geophysical Research*, 84:4643-4651, doi:10.1029/JB084iB09p04643.
- White, I., 1988.** Tillage practices and soil hydraulic properties: why quantify the obvious? In: Loveday J (ed) National Soil Conference Review Papers. Australian Society of Soil Science Inc., Canberra, ACT, pp 87–126.

- White, P. F., Oberthur, T., and Pheav, S., 1997.** The Soils Used for Rice Production in Cambodia. A Manual for their Recognition and Management. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, pp. 71.
- Widmer, F. A., Flieubach, E., Laczko, J. 2001.** Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog-analyses[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:1029-1036.
- Wienhold, B. J., Andrews, S. S., Karlen, D. L., 2004.** Soil quality: A review of the science and experiences in the USA. *Environmental Geochemistry and Health*, 26:89-95.
- Wilson, A. T., 1981.** Geochemistry and lake physics of the Antarctic dry areas. In: McGinnis LD (ed) Dry Valley Drilling project, Antarctic Research Series vol 33, AGU, Washington, DC, pp 185–192.
- Wu, H. R., Cui, Q. Y., Shu, Ye, G. Y., Wu, D. X., Gao, M. W., Xia, Y. W., 2000.** Inheritance, stability and expression of cry1Ab gene in progenies of the transgenic “Kemindao”. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 8:253–256.
- Yeomans, J., Bremner, J. M., 1989.** A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 19:1467-1476.
- Yu, X., 2012.** Effects of biochar amendment on soil quality, crop yield and greenhouse gas emission in a Chinese rice paddy: A field study of 2 consecutive rice growing cycles. *Field Crops Research* 127, 153-160.
- Zagal, E., Rodríguez, N., Vidal, I., Quezada, L., 2002.** Microbial activity in a volcanic ash soil under different agricultural management. *Agricultura Técnica*, 62:297-309.
- Zak, J. C., Willig, M. R., Moorhead, D. L., Wildman, H. G., 1994.** Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1101–1108.
- Zalidis, G., Stamatiadis, S., Takavaoglou, V., Eskridge, D., Misopolinos, N., 2002.** Impacts of agricultural practices on soil and water quality in the Mediterranean region and proposed assessment methodology. *Agric. Ecosystems and Environment*, 88:137–146.
- Zaongo, C. G. L., Wendt, C. W., Lascano, R. J., Juo, A. S. R., 1997.** Interactions of water, mulch and nitrogen on sorghum in Niger. *Plant and Soil*, 197:119-126.
- Zelles, L., 1999.** Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 29:111–129.
- Zhang, A., Bian, R., Pan, G., Cui, L., Hussain, Q., Li, L., Zheng, J., Zheng, J., Zhang, X., Han, X., Yu, X., 2012.** Effects of biochar amendment on soil quality, crop yield and greenhouse gas emission in a Chinese rice paddy: A field study of 2 consecutive rice growing cycles. *Field Crops Research*, 127:153-160.
- Zhang, A., Liu, Y., Pan, G., Hussain, Q., Li, L., Zheng, J. and Zhang X., 2011.** Effect of biochar amendment on maize yield and greenhouse gas EMISSIONS from a soil organic carbon poor calcareous loamy soil from Central China Plain. *Plant Soil*. DOI:10.1007/s11104-011-0957-x
- Zhong, Y., Zou, S., Lin, L., Luan, T. G., Qiu, R., Tam, N. F. Y., 2010.** Effects of pyrene and fluoranthene on the degradation characteristics of phenanthrene in the cometabolism process by *Sphingomonas* sp. strain PheB4 isolated from mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 60:2043–2049.

**Zimmerman, A. R., Chorover, J., Goynes, K. W., Brantley, S. L., 2004.** Protection of mesopore-adsorbed organic matter from enzymatic degradation. *Environmental Science and Technology*, 38, 4542–4548.

**Zogg, C. P., Zak, D. R., Mac Donald, D. B., Pregitzer, K. S., White, D. C., 1997.** Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Sci Society of America journal* 61:474-481.

**Zornoza, R., Mataix-Solera, J., Guerrero, C., Arcenegui, V., Mayoral, A.M., Morales, J., Mataix-Beneyto, J. 2007.** Soil properties under natural forest in the Alicante Province of Spain. *Geoderma, Amsterdam*, 142(3/4):334-341.

**Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Scow, K. M., Arcenegui, V., Mataix-Beneyto, J., 2009.** Changes in soil microbial community structure following the abandonment of agricultural terraces in mountainous areas of Eastern Spain. *Applied Soil Ecology*, 42:315-332.

**Zou, M.Y., Ran, Y., Gong, J., Mai, B. X., Zheng, E., 2007.** Polybrominated diphenyl ethers in watershed soils of the Pearl River Delta, China: occurrence, inventory, and fate. *Environment Science Technology* 41:8262–8267.

---

# ANEXOS

---



---

## **ANEXO I**

# **TABLAS DE DATOS Y ESTADISTICA CORRESPONDIENTES A LAS FIGURAS DEL CAPÍTULO 4.1**

---



## Nomenclatura utilizada en todas las tablas de datos y estadística correspondientes a las figuras del capítulo 4.1

Nomenclatura	Tratamiento
S+RF 0%	Suelos control sin adición de enmiendas
S+RF 1%	Suelos con residuo orgánico fresco a dosis equivalente a 30 t ha <sup>-1</sup>
S+RF 2%	Suelos con residuo orgánico fresco a dosis equivalente a 60 t ha <sup>-1</sup>
S+RF 3%	Suelos con residuo orgánico fresco a dosis equivalente a 90 t ha <sup>-1</sup>
S+RF 5%	Suelos con residuo orgánico fresco a dosis equivalente a 150 t ha <sup>-1</sup>
S+RF 8%	Suelos con residuo orgánico fresco a dosis equivalente a 240 t ha <sup>-1</sup>
S+RF 15%	Suelos con residuo orgánico fresco a dosis equivalente a 450 t ha <sup>-1</sup>
S+RF 20%	Suelos con residuo orgánico fresco a dosis equivalente a 600 t ha <sup>-1</sup>

Nomenclatura	Tratamiento
S+RC 0%	Suelos control sin adición de enmiendas
S+RC 1%	Suelos con compost de residuo orgánico a dosis equivalente a 30 t ha <sup>-1</sup>
S+RC 2%	Suelos con compost de residuo orgánico a dosis equivalente a 60 t ha <sup>-1</sup>
S+RC 3%	Suelos con compost de residuo orgánico a dosis equivalente a 90 t ha <sup>-1</sup>
S+RC 5%	Suelos con compost de residuo orgánico a dosis equivalente a 150 t ha <sup>-1</sup>
S+RC 8%	Suelos con compost de residuo orgánico a dosis equivalente a 240 t ha <sup>-1</sup>
S+RC 15%	Suelos con compost de residuo orgánico a dosis equivalente a 450 t ha <sup>-1</sup>
S+RC 20%	Suelos con compost de residuo orgánico a dosis equivalente a 600 t ha <sup>-1</sup>

Nomenclatura	Tiempos de muestreo
T0	Suelos tras 2 horas de la incorporación de la enmienda
T1	Suelos tras 1 mes de la incorporación de la enmienda
T2	Suelos tras 2 mes de la incorporación de la enmienda



**Tabla I.1. Evolución de los valores de pH y conductividad eléctrica (CE) en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación (correspondiente a la Figura 4.1.1).**

pH	T0	T1	T2	pH	T0	T1	T2
S+RF 0%	8,04bcB	8,61cC	7,93abA	S+RC 0%	8,54cB	8,62bC	8,00cA
S+RF 1%	8,12cB	8,57cC	7,96abA	S+RC 1%	8,38bcA	8,60bB	7,82bcC
S+RF 2%	8,04bcA	8,52cB	7,99bA	S+RC 2%	8,56cA	8,50bA	7,74abB
S+RF 3%	7,91abcA	8,50cC	7,97abB	S+RC 3%	8,51cB	8,45bA	7,60abC
S+RF 5%	8,01bcA	8,46cB	7,97abA	S+RC 5%	8,47bcC	8,25aB	7,70abA
S+RF 8%	7,89abA	8,42bcB	7,90abA	S+RC 8%	8,17abC	8,13aB	7,62abA
S+RF 15%	7,87abA	8,24abB	7,87aA	S+RC 15%	7,96aB	8,15aC	7,51aA
S+RF 20%	7,71aA	8,12aC	7,91abB	S+RC 20%	7,92aB	8,13aC	7,54aA

CE	T0	T1	T2	CE	T0	T1	T2
S+RF 0%	584,00aB	549,00aA	640,33aC	S+RC 0%	682,00aB	520,00aA	714,33aC
S+RF 1%	579,66aA	617,00abB	795,00aC	S+RC 1%	799,66abA	810,66bB	854,33abC
S+RF 2%	803,66bA	823,33bcB	795,66aA	S+RC 2%	795,33abA	796,00bA	998,33abcB
S+RF 3%	838,66bB	841,66cdB	795,66aA	S+RC 3%	852,00abA	873,33bB	1126,66cC
S+RF 5%	877,66bB	718,66abcA	997,66bC	S+RC 5%	925,66bA	926,33bA	1207,33dB
S+RF 8%	1105,00cB	1051,66dA	1273,66cC	S+RC 8%	1313,66cA	1325,66cC	1537,00deB
S+RF 15%	1383,33dB	1275,33eA	1517,00dC	S+RC 15%	1776,66dB	1700,00dA	1921,33eC
S+RF 20%	1686,66eC	1644,00fB	1619,33dA	S+RC 20%	1911,00dB	1863,00cA	1934,33eC

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA I.2.- Evolución del contenido de carbono orgánico total en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación (correspondiente a la Figura 4.1.2).**

C <sub>org</sub>	T0	T1	T2	C <sub>O,T</sub>	T0	T1	T2
S+RF 0%	1,28aB	1,39aC	0,90abA	S+RC 0%	1,26aC	1,09abB	0,87aA
S+RF 1%	1,36aC	1,29aB	0,86aA	S+RC 1%	1,54abC	1,23bB	1,16bA
S+RF 2%	1,65aC	1,34aB	1,06aA	S+RC 2%	1,76bC	1,19abA	1,26bB
S+RF 3%	1,70aC	1,28aB	1,00abA	S+RC 3%	1,62abC	0,91aA	1,22bB
S+RF 5%	1,88abC	1,21aB	0,99abA	S+RC 5%	2,32bC	1,55cA	1,84cB
S+RF 8%	1,79aB	1,33aA	1,32cA	S+RC 8%	2,97cB	1,92dA	1,83cA
S+RF 15%	2,71bcC	2,00bB	1,84dA	S+RC 15%	3,46dC	1,94dA	2,13dB
S+RF 20%	2,84cC	2,76cB	2,23eA	S+RC 20%	4,56eC	2,67eA	3,07eB

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA I.3.- Evolución del contenido de carbono hidrosoluble en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación (correspondiente a la Figura 4.1.3).**

C. hidrosoluble	T0	T1	T2	C. hidrosoluble	T0	T1	T2
S+RF 0%	47,93abB	70,76abC	32,11aA	S+RC 0%	35,32aA	51,58aC	48,83aB
S+RF 1%	44,79aA	73,89abB	36,75aA	S+RC 1%	81,64abB	68,23aA	62,66aA
S+RF 2%	51,97abB	61,69aC	45,18aA	S+RC 2%	160,34bB	74,19aA	79,64abA
S+RF 3%	67,81bcB	82,45abC	47,28aA	S+RC 3%	229,95bcB	89,79aA	93,47bA
S+RF 5%	89,82cB	100,15bC	67,51bA	S+RC 5%	386,64cB	124,01abA	125,57bA
S+RF 8%	142,52dC	125,37bB	108,10cA	S+RC 8%	668,41dC	262,67bB	211,82cA
S+RF 15%	194,39eB	290,70cC	177,30dA	S+RC 15%	826,88eC	284,23bA	355,94dB
S+RF 20%	313,63fB	466,28dC	275,50eA	S+RC 20%	939,35eC	695,70cB	412,96eA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA I.4.- Evolución del contenido de carbohidratos y polifenoles hidrosolubles en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación (correspondiente a la Figura 4.1.4).**

Carbohidratos H.	T0	T1	T2	Carbohidratos H.	T0	T1	T2
S+RF 0%	9,83aB	23,39bC	3,99aA	S+RC 0%	37,20abC	8,49aB	5,00aA
S+RF 1%	7,11aA	11,56aB	20,47cdC	S+RC 1%	18,78aC	11,84aB	5,95aA
S+RF 2%	10,15aA	10,33aA	10,26bA	S+RC 2%	24,92aC	10,60aA	14,49bB
S+RF 3%	5,76aA	10,92aB	18,80cdC	S+RC 3%	32,95abC	11,01aA	16,47bB
S+RF 5%	11,18aA	14,80abB	15,19cB	S+RC 5%	60,49bC	15,43aA	18,06bB
S+RF 8%	18,35bA	23,35bB	16,48cA	S+RC 8%	112,16cC	37,05bA	45,28cB
S+RF 15%	36,61cB	35,52cB	23,89cdA	S+RC 15%	235,91dC	38,18bA	57,94dB
S+RF 20%	51,30dB	58,24dC	44,71dA	S+RC 20%	348,06eC	37,45bA	73,48eB

Polifenoles	T0	T1	T2	Polifenoles	T0	T1	T2
S+RF 0%	1,48aB	12,88aC	0,00aA	S+RC 0%	2,46aB	0,00aA	3,26aC
S+RF 1%	3,32abB	11,37aC	0,00aA	S+RC 1%	8,42bC	0,00aA	2,99aB
S+RF 2%	6,51bB	12,09aC	1,12aA	S+RC 2%	12,98bC	1,23aA	5,24abB
S+RF 3%	8,77bB	13,34aC	1,70aA	S+RC 3%	18,42bC	2,75aA	5,67abB
S+RF 5%	12,78cB	17,38abC	3,34bA	S+RC 5%	15,53bcB	12,25bB	7,89bA
S+RF 8%	21,37dB	26,74bC	11,88cA	S+RC 8%	70,21cC	22,09cB	16,97cA
S+RF 15%	33,12eB	53,97cC	22,69dA	S+RC 15%	118,69dC	26,96cA	32,37dB
S+RF 20%	48,80fB	108,71dC	29,38eA	S+RC 20%	161,12eB	187,57bcC	46,78eA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA I.5.- Evolución de la respiración basal de los suelos enmendados y control durante el periodo de incubación (correspondiente a la Figura 4.1.6).**

Respiración basal	T0	T1	T2	Respiración basal	T0	T1	T2
S+RF 0%	0,00aA	0,00aA	0,00a	S+RC 0%	0,70aA	9,71aC	7,77aB
S+RF 1%	10,90bA	35,01bC	21,22bB	S+RC 1%	8,25bA	33,25bC	22,72bB
S+RF 2%	33,51cA	62,25cB	33,76bA	S+RC 2%	34,63cB	49,15bC	27,79bA
S+RF 3%	40,35cA	97,70cdB	45,18bA	S+RC 3%	35,34cA	68,29bcB	34,55bcA
S+RF 5%	65,08cdB	122,49dC	53,42bcA	S+RC 5%	50,88cdA	93,93cB	55,29cA
S+RF 8%	85,13dB	164,18dC	66,01bcA	S+RC 8%	79,70dB	133,42dC	63,05cA
S+RF 15%	194,30eB	307,00eC	103,55cA	S+RC 15%	126,33eC	222,46eB	82,88cdA
S+RF 20%	205,53fB	385,72eC	132,97dA	S+RC 20%	165,78eB	239,19eC	103,49dA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA I.6.- Evolución del contenido de ATP en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación (correspondiente a la Figura 4.1.7).**

ATP	T0	T1	T2	ATP	T0	T1	T2
S+RF 0%	105,72aA	298,88aC	189,26aB	S+RC 0%	159,86aA	283,16aC	214,59aB
S+RF 1%	151,94aA	357,20abC	218,84abB	S+RC 1%	153,63aA	339,68abB	383,29bcC
S+RF 2%	132,13aA	562,50bcC	292,63bcB	S+RC 2%	243,70abA	515,97cC	311,71abB
S+RF 3%	166,51aA	605,50cC	366,29cB	S+RC 3%	288,72bA	465,20bcB	289,04abA
S+RF 5%	185,44aA	773,66cdC	321,12bcB	S+RC 5%	363,77bA	593,84cC	390,951bcB
S+RF 8%	351,50bA	911,98dC	554,88dB	S+RC 8%	545,64cB	581,86cB	442,44cA
S+RF 15%	614,055cA	1141,71eC	804,12eB	S+RC 15%	1037,23dB	1301,75dC	622,46dA
S+RF 20%	593,00cA	1402,00fC	698,81fB	S+RC 20%	1413,29eC	1285,37dB	825,62eA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA I.7.- Evolución de la actividad deshidrogenasa en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación (correspondiente a la Figura 4.1.8).**

Act. Deshidrogenasa	T0	T1	T2	Act. Deshidrogenasa	T0	T1	T2
S+RF 0%	0,009aA	0,008aA	0,006aA	S+RC 0%	0,009aA	0,009aA	0,007aA
S+RF 1%	0,017abC	0,013abB	0,004aA	S+RC 1%	0,014abB	0,012abB	0,005aA
S+RF 2%	0,029bcB	0,023bcB	0,007aA	S+RC 2%	0,014abB	0,017bcC	0,008aA
S+RF 3%	0,051bcC	0,026cB	0,007abA	S+RC 3%	0,021bcC	0,018cB	0,009abA
S+RF 5%	0,029bcC	0,004aA	0,011bcB	S+RC 5%	0,028cB	0,024dB	0,011abA
S+RF 8%	0,034cB	0,029cB	0,013cA	S+RC 8%	0,046dB	0,015bA	0,016bA
S+RF 15%	0,054dC	0,033cB	0,021dA	S+RC 15%	0,065eC	0,045eB	0,025cA
S+RF 20%	0,071eC	0,047dB	0,021dA	S+RC 20%	0,095fC	0,056fB	0,025dA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA I.8.- Actividad ureasa en el suelo control y en los suelos enmendados durante el periodo de incubación (correspondiente a la Figura 4.1.9).**

Act. Ureasa	T0	T1	T2	Act. Ureasa	T0	T1	T2
S+RF 0%	0,85bcA	1,20abB	1,20cdB	S+RC 0%	0,72cdA	1,00cdB	1,20cC
S+RF 1%	0,86bcA	1,15aB	1,144bcC	S+RC 1%	0,58bcA	0,99bcB	1,25cdC
S+RF 2%	0,87bcA	1,42abC	1,15cdB	S+RC 2%	0,48aA	1,01cdB	1,36dC
S+RF 3%	0,97cA	1,55abC	1,37dB	S+RC 3%	0,55abA	1,00cdB	1,24cdC
S+RF 5%	0,75abA	2,01abC	1,18bcB	S+RC 5%	0,86dA	0,87cdA	1,25cdB
S+RF 8%	0,80abA	2,49cdC	1,01bB	S+RC 8%	1,01eB	0,80cA	1,15cC
S+RF 15%	0,74aA	1,87bcC	0,92bB	S+RC 15%	0,84deA	1,12dC	0,96bB
S+RF 20%	0,72aB	3,08dC	0,40aA	S+RC 20%	0,67abcC	0,56aB	0,42aA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA I.9.- Evolución de la actividad fosfatasa alcalina en los suelos enmendados y el control durante el periodo de incubación (correspondiente a la Figura 4.1.10).**

Act. Fosfatasa	T0	T1	T2	Act. Fosfatasa	T0	T1	T2
S+RF 0%	3,36aA	5,37aB	6,87aB	S+RC 0%	4,24aA	5,81aC	5,01abB
S+RF 1%	4,35abA	9,99bB	8,49aB	S+RC 1%	4,09aA	6,22aB	4,45aA
S+RF 2%	7,17cdA	11,90bcB	7,44aA	S+RC 2%	4,70aA	6,93abC	5,36abB
S+RF 3%	5,94bcA	12,73cB	10,62bB	S+RC 3%	4,98aA	8,57bC	6,91cdB
S+RF 5%	8,30dA	16,89dC	14,62cB	S+RC 5%	8,37abB	8,03bB	5,99cA
S+RF 8%	11,25eA	24,16eB	12,75cA	S+RC 8%	9,93abC	8,57bB	7,24dA
S+RF 15%	14,22fA	27,00fB	16,87dA	S+RC 15%	9,18abA	17,77cC	11,15eB
S+RF 20%	15,79fA	25,87fB	24,83eB	S+RC 20%	14,68bA	19,21cC	16,19fB

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA I.10.- Actividad  $\beta$ -glucosidasa en el suelo control y en los suelos enmendados durante el periodo de incubación (correspondiente a la Figura 4.1.11).**

Act. Glucosidasa	T0	T1	T2	Act. Glucosidasa	T0	T1	T2
S+RF 0%	0,76aA	1,22aB	1,56aC	S+RC 0%	1,14aA	1,63aB	1,17aA
S+RF 1%	1,33bA	1,46abB	1,40aB	S+RC 1%	1,32aA	1,69abB	1,21aA
S+RF 2%	1,32bA	1,89abC	1,45aB	S+RC 2%	1,26aA	2,21cA	1,25aA
S+RF 3%	1,29bA	1,96abC	1,53aB	S+RC 3%	1,46aB	2,17bcC	1,17aA
S+RF 5%	1,48bcA	2,28bcC	1,66aB	S+RC 5%	1,51aB	2,03bC	1,24aA
S+RF 8%	1,81cdA	3,04cC	2,13bB	S+RC 8%	3,14bC	2,07bB	1,37abA
S+RF 15%	1,94dA	5,26dC	2,37bB	S+RC 15%	5,64cB	5,32dB	1,84bA
S+RF 20%	2,54eA	5,60dB	2,93cA	S+RC 20%	6,57dC	4,57eB	2,03bA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



---

## **ANEXO II**

# **TABLAS DE DATOS Y ESTADISTICA CORRESPONDIENTES A LAS FIGURAS DEL CAPÍTULO 4.2**

---



## Nomenclatura utilizada en todas las tablas de datos y estadística correspondientes a las figuras del capítulo 4.2

Nomenclatura	Materiales
Suelo control	Suelo control degradado
S+RCd1	Suelo con adición de 1% de C <sub>org</sub> de compost
S+RCd2	Suelo con adición de 3% de C <sub>org</sub> de compost
S+RFd1	Suelo con adición de 1% de C <sub>org</sub> de residuo orgánico fresco
S+RFd2	Suelo con adición de 3% de C <sub>org</sub> de residuo orgánico fresco
S+RCd1M	Suelo con adición de 1% de C <sub>org</sub> de compost en mulching
S+RCd2M	Suelo con adición de 3% de C <sub>org</sub> de compost en mulching
S+RFd1M	Suelo con adición de 1% de C <sub>org</sub> de residuo orgánico fresco en mulching
S+RFd2M	Suelo con adición de 3% de C <sub>org</sub> de residuo orgánico fresco en mulching

Nomenclatura	Tiempos de muestreo
P0	Suelos tras 7 días de la incorporación de la enmienda
P6	Suelos tras 6 meses de la incorporación de la enmienda
P12	Suelos tras 12 meses de la incorporación de la enmienda
P18	Suelos tras 18 meses de la incorporación de la enmienda
P36	Suelos tras 36 meses de la incorporación de la enmienda
P60	Suelos tras 60 meses de la incorporación de la enmienda



**TABLA II.1.- Evolución del contenido de N total en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.5).**

Nitrógeno Total	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	0,14aBC	0,16aC	0,12aAB	0,15aBC	0,12aAB	0,10aA
S+RCd1	0,26aA	0,28bA	0,31bA	0,32bA	0,22bA	0,29abA
S+RCd2	0,54bA	0,49cA	0,55cA	0,53cA	0,46cA	0,54cA
S+RFd1	0,22aAB	0,29bAB	0,26abAB	0,33bB	0,24bAB	0,21abA
S+RFd2	0,26aA	0,25abA	0,36bAB	0,45bcB	0,46cB	0,34bAB

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.2.- Evolución en el amonio en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.6).**

Amonio	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	4,66 aABC	9,03aC	6,10aBC	3,50aAB	2,43aAB	1,40aA
S+RCd1	103,15bC	10,83aA	28,80bB	8,50aA	4,90aA	2,10abA
S+RCd2	326,30dB	61,20bA	62,83cA	15,80bA	11,33bA	8,10cA
S+RFd1	85,20abB	8,50aA	7,20aA	6,20aA	7,13abA	2,60aA
S+RFd2	186,60cC	67,20bB	8,26aA	7,50aA	11,33bA	4,83bcA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA III.3.- Evolución en los nitratos en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.7).**

Nitratos	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	41,40cA	57,93aA	32,80aA	64,73aAB	37,43aA	122,83aB
S+RCd1	21,56aA	36,10aA	261,33aB	143,33abAB	31,40aA	407,90aC
S+RCd2	17,65aA	250,30bA	1108,33bBC	1596,33cC	118,83aA	862,90bB
S+RFd1	30,63bA	1041,45cC	2241,66cD	646,66bBC	278,33bAB	391,90aAB
S+RFd2	34,56bcA	1618,70dC	2296,66cD	1684,33cC	118,83aA	750,20bB

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.4.- Evolución del contenido de fósforo total en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.11).**

Fósforo Total	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	164,85aAB	226,26aB	119,40aA	146,40aA	168,16aAB	166,46aAB
S+RCd1	1124,10cAB	1540,16bAB	1815,76cB	963,93bA	1138,83cAB	1098,86bAB
S+RCd2	1454,96dA	2969,45cAB	3678,80dAB	3012,96aAB	4173,80bB	3638,63aAB
S+RFd1	416,95abA	547,60aBC	397,63aA	412,70aA	581,06abC	427,60aAB
S+RFd2	489,95bA	390,40aA	1065,50bBC	666,06aAB	1304,10bC	685,23aAB

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.5.- Evolución del contenido de fósforo extraíble en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.12).**

Fósforo extraíble	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	14,20aAB	13,20aAB	10,13aA	9,13aA	21,86aB	21,86aB
S+RCd1	243,16cABC	332,90bC	316,66dBC	184,33cA	218,13cAB	218,13cAB
S+RCd2	275,20cA	289,35bA	401,20eBC	301,33dAB	422,63dC	422,63dC
S+RFd1	81,30abA	117,35aAB	94,43bAB	97,63bAB	119,50bB	119,50bB
S+RFd2	96,80bA	95,85aA	231,20cBC	133,46bcAB	261,83cC	261,83cC

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.6.- Evolución del contenido de potasio total en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.14).**

Potasio Total	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	0,083aA	0,22aAB	0,25aBC	0,37aC	0,40aC	0,37aBC
S+RCd1	0,17abA	0,20aAB	0,35abBC	0,37aC	0,37aC	0,31aABC
S+RCd2	0,26bABC	0,25aAB	0,39abC	0,37aBC	0,34aABC	0,22aA
S+RFd1	0,13abA	0,24aAB	0,35abC	0,39aC	0,33aBC	0,30aBC
S+RFd2	0,25bA	0,24aA	0,46bB	0,45aB	0,39aAB	0,28aA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.7.- Evolución del contenido de potasio extraíble en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.15).**

Potasio extraíble	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	1,12aA	0,30aA	0,44aA	0,67aA	0,54aA	0,58aA
S+RCd1	2,21abD	0,67abA	1,47bC	1,13aB	1,04abB	1,46bC
S+RCd2	5,65cB	1,42bA	2,26cA	1,96abA	1,55bcA	1,91cA
S+Rd1	1,63abAB	1,43bA	2,03bcB	1,52aAB	1,45abcA	1,18bA
S+Rd2	3,10bA	2,81cA	3,78dA	3,60bA	2,40cA	1,87cA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.8.- Evolución del carbono orgánico total en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.17).**

C <sub>org</sub>	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	1,13aA	1,10aA	1,09aA	1,06aA	1,06aA	1,15aA
S+RCd1	3,31bB	2,92bAB	2,93bAB	2,76bcAB	2,30bA	2,80bAB
S+RCd2	7,80cA	5,08cB	4,60cB	4,93dB	4,11cB	4,73cB
S+RFd1	2,63bA	2,43bA	2,06abA	2,41bA	2,47bA	2,32bA
S+RFd2	6,40cA	3,26bA	2,56bA	3,54cA	3,79cA	3,99cA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.9.- Evolución del contenido de carbohidratos y carbonos hidrosolubles en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.18).**

C.hidrosoluble	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	134,24aBC	78,00aA	117,87aB	65,03aA	146,70aBC	163,44aC
S+RCd1	2086,45bB	311,67bA	328,86bA	189,11aA	285,71bA	299,02bcA
S+RCd2	5991,71cB	629,02cA	751,32cA	584,76bA	511,20cA	470,36dA
S+RFd1	2115,11bC	456,24bcB	294,42bA	230,16aA	273,41bA	231,57abA
S+RFd2	4693,46cD	1222,40dC	697,14cB	626,46bAB	731,21dB	330,75cA

Carbohidratos	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	29,49aBC	26,78aA	25,48aB	23,77aA	32,60aBC	36,99aC
S+RCd1	285,44bB	43,25bA	48,44bA	41,89aA	57,55bA	75,90bcA
S+RCd2	796,59dB	55,70cA	108,46cA	68,05bA	86,78cA	94,46dA
S+RFd1	163,97bC	52,45bcB	63,99bA	44,87aA	55,15bA	64,31abA
S+RFd2	619,55cD	89,00dC	58,10cB	82,67bAB	101,04dB	82,11cA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.10.- Evolución del carbono de la biomasa microbiana en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.20).**

C. Biomasa	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	320,95aA	348,25aA	335,32aA	364,19aA	291,47aA	486,36aB
S+RCd1	696,28bA	750,91bA	769,35bA	607,38bA	658,23bA	1079,90bB
S+RCd2	1062,18cB	1066,73bB	867,68bAB	733,19bA	800,02bAB	975,87bAB
S+RFd1	1132,03cC	1025,51bBC	800,23bA	755,69bAB	726,73bAB	1017,83bBC
S+RFd2	889,61bcB	995,20bB	981,95bA	810,66bB	826,08bB	928,55bB

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.11.- Evolución de la respiración basal en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.21).**

R. Basal	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	16,32aA	13,20aA	16,16aA	13,09aA	10,00aA	16,04aA
S+RCd1	183,48bC	57,61bBC	61,38bB	29,21bA	20,62bA	21,96abA
S+RCd2	286,10cC	63,63bcAB	86,46cB	51,34cAB	31,64cA	29,95cA
S+RFd1	142,79bC	51,77bB	23,76aA	29,07bAB	30,19cAB	26,56bcAB
S+RFd2	147,17bC	71,68cB	19,17aA	30,73bA	37,92dA	21,07abA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.12.- Evolución del contenido de ATP y actividad deshidrogenasa en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.22).**

ATP	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	155,97aA	249,45aB	103,82aA	143,40aA	138,07aA	137,40aA
S+RCd1	334,38cA	1167,47cdB	249,61abA	268,70aA	174,06abA	177,93bcA
S+RCd2	288,65bcAB	598,36bC	236,27aA	492,69bBC	197,44bcA	180,21bcA
S+RFd1	474,42dB	1171,25dC	403,04bcAB	493,46bB	158,22abA	160,82abA
S+RFd2	194,22abA	824,50bcC	505,14cB	553,21bB	235,20cA	202,48cA
A.Deshidrogenasa	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	10,38aC	10,14aC	6,87aAB	8,55aBC	4,35aA	5,97aAB
S+RCd1	21,95bB	19,20bB	10,07aA	10,50aA	6,79bA	8,79bA
S+RCd2	14,64aB	23,94bC	9,06aA	13,34aB	7,02bA	7,48abA
S+RFd1	29,29cD	19,68bC	8,42aAB	9,59aB	5,89abA	8,28bAB
S+RFd2	13,83aB	23,46bC	9,44aAB	9,03aAB	6,07abA	6,74abA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.13.- Evolución en las actividades fosfatasa alcalina y  $\beta$ -glucosidasa en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.24).**

A. Glucosidasa	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	1,04aA	1,02aA	1,05aA	0,95aA	0,91aA	1,10aA
S+RCd1	1,90bA	6,57cC	3,28cAB	3,89cB	2,75bAB	2,96bAB
S+RCd2	2,72cA	4,85bB	2,34bA	3,15bcA	3,25bA	3,06bA
S+RFd1	1,54abA	2,62aB	1,51aA	2,50bcA	3,16bB	3,34bB
S+RFd2	2,07bcB	4,64bC	1,15aA	1,30bAB	1,72aAB	1,13aA
A. Fosfatasa	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	2,40aA	2,70aA	2,35aA	2,62aA	2,33aA	2,64aA
S+RCd1	7,08bAB	8,99bBC	9,62bC	9,43bBC	4,69aA	5,08bcA
S+RCd2	14,18cC	22,78cD	13,59bcBC	17,19cC	9,54bAB	6,72dA
S+RFd1	20,79dD	23,29cD	14,11bcC	15,43cC	7,69bB	4,59bA
S+RFd2	19,51dBC	22,47cC	16,27cB	20,86dBC	9,01bA	5,49cA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA II.14.- Evolución en la actividad ureasa en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.2.25.).**

A. Ureasa	P0	P6	P12	P18	P36	P60
Suelo control	1,15cA	0,95abcA	1,22dA	1,22cA	1,11abA	1,68bcB
S+RCd1	0,47aA	1,16cC	0,66bA	1,05bcBC	0,92aB	1,64bD
S+RCd2	0,88bAB	1,13bcB	0,77bcA	0,77bA	0,92aAB	0,69aA
S+RFd1	0,46aA	0,80aAB	0,97cdBC	1,34cCD	1,43bD	2,08cE
S+RFd2	0,41aA	0,90abB	0,21aA	0,26aA	1,34abC	1,67bcD

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



---

## **ANEXO III**

# **TABLAS DE DATOS Y ESTADISTICA CORRESPONDIENTES A LAS FIGURAS DEL CAPÍTULO 4.3**

---



## Nomenclatura utilizada en todas las tablas de datos y estadística correspondientes a las figuras del capítulo 4.3

Nomenclatura	Tratamientos
Suelo control	Suelo control degradado
S+ RCd1	Suelo con compost maduro a dosis equivalente a 1% de C orgánico
S+ RCd2	Suelo con compost maduro a dosis equivalente a 3% de C orgánico
S+ RFd1	Suelo con residuo fresco a dosis equivalente a 1% de C orgánico
S+ RFd2	Suelo con residuo fresco a dosis equivalente a 3% de C orgánico

Nomenclatura	Tiempos de muestreo
T7	Suelos tras 7 días de la incorporación de la enmienda
T90	Suelos tras 90 días de la incorporación de la enmienda
T180	Suelos tras 180 días de la incorporación de la enmienda
T270	Suelos tras 270 días de la incorporación de la enmienda



**TABLA III.1.- Evolución con el tiempo del contenido de carbono orgánico en los suelos enmendados y en el control (correspondiente a la Figura 4.3.1).**

C. orgánico	T7	T90	T180	T270
Suelo control	0,87aB	0,82aAB	0,78aAB	0,73aA
S+RCd1	1,62bB	1,43bAB	1,35bA	1,28bA
S+RCd2	3,41cB	2,29cA	2,17cA	2,08dA
S+RFd1	1,63bB	1,33bA	1,24bA	1,23bA
S+RFd2	3,29cC	2,35cB	2,03cA	1,84cA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA III.2.- Evolución del contenido de C hidrosoluble en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.3.2).**

C. Hidrosoluble	T7	T90	T180	T270
Suelo control	51,08 aC	82,10 aD	49,60 aB	48,56 aA
S+RCd1	492,52 cD	293,31 cC	180,55 cB	130,59 cA
S+RCd2	1699,21 eD	1028,38 eC	664,76 eB	438,48 eA
S+RFd1	422,34 bD	190,49 bC	117,36 bB	96,74 bA
S+RFd2	1061,57 dD	699,48 dC	351,72 dB	267,85 dA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA III.3.- Evolución del contenido de carbohidratos hidrosolubles en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.3.3).**

Carbohidratos Hidr.	T7	T90	T180	T270
Suelo control	19,09 aA	17,76 aA	32,83 aB	15,45 aA
S+RCd1	61,10 bC	25,53 abA	37,89 abB	24,13 aA
S+RCd2	270,24 dB	105,90 dA	81,91 dA	73,65 cA
S+RFd1	53,44 bD	30,23 bA	44,43 bC	37,71 bB
S+RFd2	151,68 cC	85,48 cB	68,46 cB	43,89 bA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA III.4.- Evolución del contenido de carbono de sustancias húmicas y de ácidos húmicos en el suelo control y en los suelos enmendados (correspondiente a la Figura 4.3.4).**

C. sustancias húmicas	T7	T90	T180	T270
Suelo control	468.37aA	465.40aA	399.65aA	379.95aA
S+RCd1	1039.07cC	956.56cC	751.90cB	605.20cA
S+RCd2	2043.54eC	1527.87eB	1385.96dB	1132.54eA
S+RFd1	922.81bD	760.30bC	577.71bB	458.41bA
S+RFd2	1440.86dD	1123.11dC	881.88cB	726.64dA
C. ácidos húmicos	T7	T90	T180	T270
Suelo control	60,57aB	88,65aD	20,24aA	62,62aC
S+RCd1	381,77dC	392,39cD	282,12cB	172,52cA
S+RCd2	766,79eD	655,46eB	679,76eC	548,69eA
S+RFd1	218,51bC	259,09bD	170,81bB	92,81bA
S+RFd2	368,73cB	423,37dD	385,25dC	326,36dA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA III.5.- Cambios con el tiempo del contenido de C orgánico ( $C_{org}$ ) en las diferentes fracciones del suelo (correspondiente a la Figura 4.3.5).**

	> 250 $\mu$ m		250-63 $\mu$ m		63-2 $\mu$ m		2-0,1 $\mu$ m	
	T7	T270	T7	T270	T7	T270	T7	T270
Suelo control	aB	aA	aA	aA	aB	aB	aC	aC
S+RCd1	bcC	bB	bA	cA	bA	bA	bB	bB
S+RCd2	dC	dC	dA	dA	dA	cA	dB	dB
S+RFd1	bD	bB	bA	bA	abB	abA	bC	bB
S+RFd2	cdB	cC	cA	cA	cA	bA	cA	cB

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA III.6.- Cambios con el tiempo del contenido de N en las diferentes fracciones del suelo (correspondiente a la Figura 4.3.6).**

	> 250 $\mu$ m		250-63 $\mu$ m		63-2 $\mu$ m		2-0,1 $\mu$ m	
	T7	T270	T7	T270	T7	T270	T7	T270
Suelo control	aA	aA	aA	aA	aB	aB	aC	aC
S+RCd1	abB	abAB	abA	abA	aA	aA	bB	aB
S+RCd2	abB	abB	abA	abA	abA	aA	bB	bB
S+RFd1	bB	bBC	bA	bA	bcA	bAB	cB	cC
S+RFd2	cC	cB	bA	cA	cA	bA	dB	cB

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA III.7.- Cambios con el tiempo la actividad  $\beta$ -glucosidasa en las diferentes fracciones del suelo (correspondiente a la Figura 4.3.8).**

	> 250 $\mu$ m		250-63 $\mu$ m		63-2 $\mu$ m		2-0,1 $\mu$ m	
	T7	T270	T7	T270	T7	T270	T7	T270
Suelo control	aB	aA	aA	aA	aC	aB	aA	aA
S+RCd1	bB	aA	abA	bA	abAB	bB	abB	bAB
S+RCd2	bAB	bB	bcA	bA	abA	cB	abB	cB
S+RFd1	bcB	bB	abcA	cB	abAB	cB	bAB	bA
S+RFd2	cB	bAB	cA	cA	bA	cBC	bC	cC

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA III.8.- Cambios con el tiempo la actividad glicina aminopeptidasa en las diferentes fracciones del suelo (correspondiente a la Figura 4.3.9).**

	> 250 $\mu$ m		250-63 $\mu$ m		63-2 $\mu$ m		2-0,1 $\mu$ m	
	T7	T270	T7	T270	T7	T270	T7	T270
Suelo control	aAB	aAB	aA	aA	bB	aBC	aC	aC
S+RCd1	aB	aA	aA	abA	abAB	aA	aC	abB
S+RCd2	aB	bB	aA	abA	aA	aB	aC	bcC
S+RFd1	bB	bB	aA	bA	abA	aAB	aB	bcC
S+RFd2	cC	cB	bA	cA	abA	bAB	aB	cC

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLA III.9.- Cambios con el tiempo la actividad polifenol oxidasa en las diferentes fracciones del suelo (correspondiente a la Figura 4.3.10).**

	> 250 $\mu$ m		250-63 $\mu$ m		63-2 $\mu$ m		2-0,1 $\mu$ m	
	T7	T270	T7	T270	T7	T270	T7	T270
Suelo control	aA	aA	aA	aA	cB	bB	bB	dB
S+RCd1	cAB	abA	bcA	bAB	bcB	abB	aA	cC
S+RCd2	cA	cC	cA	bB	aA	aAB	aA	aA
S+RFd1	bcAB	bA	bA	bA	abAB	aA	aB	bcA
S+RFd2	bA	bA	bcA	bA	abA	aA	aA	abA

Para cada parámetro y tipo de enmienda, la letra minúscula indica diferencias entre tratamientos a un tiempo dado y la letra mayúscula diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento. La misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).