



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

Efecto de las Acciones Antrópicas sobre la  
Estabilidad de Agregados del Suelo en  
zonas Semiáridas

D. Manuel Jesús Campoy Cervellera

**2015**



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura**

**CEBAS-CSIC**

**TESIS DOCTORAL**

**Efecto de las acciones antrópicas sobre la  
Estabilidad de Agregados del suelo en  
zonas semiáridas**

**MANUEL JESÚS CAMPOY CERVELLERA**

**MURCIA, 2015**



## Agradecimientos

Quiero agradecer con estas palabras a todos los que han ayudado, de una forma o de otra, a que este trabajo salga adelante.

En primer lugar al Dr. Antonio Roldán por confiar en mí y darme la oportunidad de hacer esta tesis. A él le debo no solo el resultado de este proyecto, sino toda mi carrera profesional. Mi agradecimiento a su continua paciencia, lealtad, respeto y generosidad.

A la Dra. Fuensanta Caravaca, ya que su colaboración ha sido indispensable en la elaboración de este trabajo. Por su ayuda y continuo ánimo. Gracias por ser un ejemplo de honestidad, trabajo y tesón.

A la Dra. Pura Marín del Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología de la Universidad de Murcia como tutora de este trabajo. Gracias por su disposición y colaboración.

Al Dr. Artemi Cerdá del Departamento de Geografía de la Universidad de Valencia, por dar todas las facilidades para realizar la experimentación en el Teularet.

A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio y han participado en éste trabajo. A Dino Figueroa por enseñarme con una paciencia infinita los entresijos del laboratorio. A María del Mar con la que hice mi primer doctorado. A Lucía y Josef con los que compartí horas de laboratorio, campo y amistad, os tengo siempre presentes. A Emma, por los años que formaste parte del equipo, gracias por demostrarme que un becario podía ser una persona normal. A Carmen, que me recordó que un becario es siempre un ser diferente y especial, espero que la ciencia te de todo lo que esperas de ella. A Asun, con la que he compartido y espero compartir muchas horas de poyata y confidencias. A Gema, que será la siguiente en la lista de doctores.

A aquellos que estuvieron de paso pero que dejaron mucho, Irma, Vicente, Diego, Ainhoa, Zenaida, Rosa Mary y Mauricio.

A las compañeras de La Universidad Miguel Hernández, Pilar, Gisela y Fuensanta por contribuir con su trabajo y amistad a enriquecer nuestro grupo.

A los compañeros del Departamento de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos del CEBAS, Rafa, Felipe, J. Alburquerque, Tania, Marian, José, André, Elena, Antonia, Elísabet, A. Zamora, Noelia, Eloísa, Carolina, Joris, Nacho y Elvira.

A los técnicos de laboratorio que hacen posible la investigación pública.

A todos los compañeros que trabajan por un mundo más justo basado en el conocimiento y defienden la ciencia pública como elemento transformador de la sociedad.

A mis padres, por darme todas las facilidades para mi formación. Como no siempre estuve a la altura, espero que este título compense todos sus desvelos. De manera especial, le quiero agradecer a mi padre sus buenos consejos y apoyo para sobrevivir en la selva del CEBAS.

A mi suegro, por su ejemplo y constante ánimo a seguir siempre formándome.

A mi hermana y mis cuñados. Por vuestro cariño y cercanía.

A mis tres hijos, Manuel, Carla y Pablo. Ellos han llegado durante la realización de esta tesis. Gracias por hacer que todo tenga sentido.

A Lara por acompañarme. Gracias por quererme y cuidarme.

Esta tesis se enmarca en los proyectos del Plan Nacional ref. AGL2009-12530-C02-01 y AGL2012-39057-C02-01.

*A Lara, Manuel, Carla y Pablo*



<b>JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES</b>	13
<b>1.1 Estructura y agregación del suelo</b>	14
<b>1.2 Mecanismos de agregación</b>	14
<b>1.3. Agentes de agregación</b>	16
1.3.1. <i>Tipo abiótico</i>	16
1.3.1.1. <i>Minerales de la arcilla</i>	16
1.3.1.2. <i>Cationes</i>	17
1.3.1.3. <i>Carbonatos</i>	18
1.3.2. <i>Tipo Biótico</i>	18
1.3.2.1. <i>Carbono orgánico</i>	18
1.3.2.1.1. <i>Materia orgánica particulada.</i>	19
1.3.2.1.2. <i>Carbohidratos.</i>	19
1.3.2.1.3. <i>Fenoles.</i>	19
1.3.2.1.4. <i>Lignina.</i>	19
1.3.2.1.5. <i>Lípidos.</i>	19
1.3.2.1.6. <i>Sustancias húmicas.</i>	20
1.3.2.2. <i>Plantas.</i>	20
1.3.2.3. <i>Raíces.</i>	20
1.3.2.4. <i>Microorganismos.</i>	21
1.3.2.5. <i>La fauna del suelo.</i>	22
<b>1.4. Factores que afectan a la agregación del suelo</b>	23
1.4.1. <i>Clima</i>	23
1.4.2. <i>Factores antrópicos</i>	24

1.4.2.1. Laboreo	24
1.4.2.2. Enmiendas orgánicas	24
1.4.2.2.1. Mulching (acolchado)	25
1.4.2.2.2. Residuos Urbanos	25
1.4.2.2.3. Residuos de la industria agroalimentaria	26
1.4.2.3. Inoculación micorrícica	27
<b>1.5. Relación entre estructura y calidad del suelo</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>Capítulo II Materiales y Métodos</b>	<b>31</b>

---

<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Descripción del área experimental</b>	<b>33</b>
2.1.1 Experimentos en condiciones de campo	33
Zona de estudio Coto de los Cuadros	33
Zona de estudio El Teularet	36
2.1.2 Experimentos en condiciones controladas	38
<b>2.2 Material biológico y condiciones de crecimiento</b>	<b>38</b>
<b>2.2.1 Especies vegetales utilizadas</b>	<b>38</b>
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	38
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop	40
<i>Avena sativa</i> L.	41
<b>2.2.2. Microorganismos seleccionados</b>	<b>41</b>
Hongos Micorrícicos Arbusculares (MA)	41
Hifomicetos	43

<b>2.2.3 Residuos orgánicos</b>	43
Residuo sólido urbano compostado	43
Lodo de depuradora compostado	44
Residuo de alperujo microbiológicamente tratado	46
<b>2.3. DISEÑO Y FACTORES EXPERIMENTALES</b>	46
<b>2.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN PLANTA</b>	47
<b>2.4.1. Crecimiento vegetal, estado nutricional y micorrización</b>	47
<i>Crecimiento de la planta</i>	47
<i>Nutrientes en hoja.</i>	47
<i>Porcentajes de micorrización</i>	47
<b>2.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN SUELO</b>	48
<b>2.5.1. Propiedades físico-químicas y físicas del suelo</b>	48
<i>pH</i>	48
<i>Conductividad eléctrica</i>	48
<i>Estabilidad de agregados</i>	48
<i>Análisis granulométrico</i>	49
<i>Potencial hídrico del suelo</i>	49
<i>Simulación de lluvias</i>	50
<b>2.5.2. Propiedades químicas del suelo</b>	50
<i>Carbono orgánico total</i>	50
<i>Carbono hidrosoluble</i>	50
<i>Carbohidratos hidrosolubles</i>	51
<i>Carbonatos totales</i>	51
<b>2.5.3. Concentración de nutrientes</b>	51
<i>Nitrógeno total</i>	51

<i>Fósforo asimilable</i>	51
<i>Potasio asimilable.</i>	52
<b>2.5.4. Propiedades biológicas</b>	53
<i>Carbono de la biomasa microbiana</i>	53
<i>Respiración Basal</i>	53
<i>Actividad deshidrogenasa</i>	53
<i>Actividad ureasa</i>	54
<i>Actividad proteasa-BAA</i>	55
<i>Actividad fosfatasa ácida</i>	55
<i>Actividad <math>\beta</math>-glucosidasa</i>	56
<i>Glomalina fácilmente extraíble</i>	57
<b>2.5.5. Análisis estadísticos</b>	58

<b>Capítulo III. Efecto de los hongos micorrícicos arbusculares y enmiendas orgánicas en la formación de agregados estables en el suelo rizosférico de <i>Juniperus oxycedrus</i></b>	61
---	----

---

<b>RESUMEN</b>	63
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>	64
<b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	66
<i>3.2.1. Selección de la planta huésped y los inóculos micorrícicos</i>	66
<i>3.2.2. Suelo experimental</i>	67
<i>3.2.3. Materiales</i>	67
<i>3.2.4. Diseño y factores experimentales</i>	67
<i>3.2.5. Análisis de parámetros en planta</i>	68

3.2.7. <i>Análisis estadístico</i>	69
<b>3.3. RESULTADOS</b>	69
3.3.1. <i>Propiedades físico-químicas y fracciones lábiles de C</i>	69
3.3.2. <i>Parámetros bioquímicos</i>	72
3.3.3. <i>Crecimiento y colonización micorrícica de J. oxycedrus</i>	73
<b>3.4. DISCUSIÓN</b>	76
3.4.1. <i>Eficacia de los tratamientos de inoculación micorrícica con respecto a la estructura del suelo</i>	76
3.4.2. <i>Efectividad de las enmiendas orgánicas con respecto a la estructura del suelo</i>	78
3.4.3. <i>Eficacia de los tratamientos con respecto al crecimiento de J. oxycedrus</i>	79
<b>Capítulo IV. Efecto de un ciclo de secado y humectación, la adición de una enmienda orgánica compostada y la inoculación con hongos micorrícicos, sobre la estabilidad de los agregados en la rizosfera de <i>Juniperus oxicedrus</i></b>	83
<hr/>	
<b>RESUMEN</b>	85
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	86
<b>4.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	88
4.2.1. <i>Materiales</i>	88
4.2.2. <i>Selección de la especie vegetal y los tratamientos de inoculación micorrícica</i>	88
4.2.3. <i>Tratamiento de secado y rehumectación</i>	89

4.2.4. <i>Potencial hídrico del suelo</i>	90
4.2.5. <i>Análisis en plantas</i>	90
4.2.6. <i>Análisis biológico, bioquímico y físico del suelo</i>	90
4.2.7. <i>Análisis estadístico</i>	91
<b>4.3. RESULTADOS</b>	91
4.3.1. <i>Crecimiento, asimilación de nutrientes y colonización micorrícica</i>	91
4.3.2. <i>Proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP) y estabilidad de agregados</i>	94
4.3.3. <i>Parámetros biológicos y bioquímicos</i>	96
<b>4.4. DISCUSIÓN</b>	99
4.4.1. <i>Efecto de los hongos micorrícicos y el residuo compostado en la estructura del suelo</i>	99
4.4.2. <i>Efecto de los hongos micorrícicos y del residuo compostado en el crecimiento de <i>Juniperus oxycedrus</i></i>	101
4.4.3. <i>Efecto del ciclo de secado-rehumectación sobre la estructura del suelo</i>	102
 <b>Capítulo V. Cambios en la actividad biológica y estabilidad estructural de un suelo mediterráneo degradado inducidos por la utilización de un alperujo tratado con microorganismos como enmienda orgánica sólida y hongos micorrícicos arbusculares</b>	 107
<hr/>	
<b>RESUMEN</b>	109
<b>5.1. INTRODUCCIÓN</b>	110
<b>5.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	112

5.2.1. Área de estudio	112
5.2.3. Inoculación micorrícica de las plántulas	112
5.2.4. Diseño y factores experimentales	113
5.2.5. Procedimiento de muestreo	114
5.2.6. Análisis de la planta	114
5.2.7. Análisis físico-químico, químico y bioquímico del suelo	115
5.2.8. Análisis físico	115
5.2.9. Análisis estadístico	115
<b>5.3. RESULTADOS</b>	116
5.3.1. Parámetros físico-químicos	116
5.3.2. Parámetros bioquímicos	118
5.3.3. Crecimiento y colonización micorrícica de <i>D. pentaphyllum</i>	121
<b>5.4. DISCUSIÓN</b>	124
5.4.1. Efecto del residuo DOC fermentado	124
5.4.2. Efecto de los tratamientos de inoculación micorrícica	126
5.4.3. Efecto del tratamiento combinado	126
<b>Capítulo VI. Efecto de diferentes prácticas agrícolas sobre la estabilidad estructural del suelo y la tasa de erosión en un agroecosistema mediterráneo semiárido</b>	129
<hr/>	
<b>RESUMEN</b>	131
<b>6.1. INTRODUCCIÓN</b>	132
<b>6.2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	134
6.2.1. Descripción del área experimental	134

<i>6.2.2. Diseño y factores experimentales</i>	134
<i>6.2.3. Muestreo de suelos y análisis</i>	135
<i>6.2.4. Análisis estadístico</i>	136
<b>6.3. RESULTADOS</b>	136
<b>6.4. DISCUSIÓN</b>	143
<b>6.5. CONCLUSIONES</b>	147
<b>Capítulo VII. Conclusiones</b>	149
<hr/>	
<b>Capítulo VIII. Bibliografía</b>	155





## **Introducción y objetivos**



## JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES

El suelo es uno de los recursos naturales más importantes, ya que actúa como soporte de las plantas y reservorio de agua y nutrientes esenciales para ellas, como hábitat de una amplia variedad de organismos, como regulador del flujo hídrico, además de funcionar como un sistema amortiguador frente a la contaminación, protegiendo la calidad del agua, el aire y otros recursos. El suelo no es un recurso renovable a escala de tiempo humano, y por ello, estamos obligados a conservarlo y recuperarlo priorizando un uso sostenible del mismo.

En condiciones naturales, el suelo tiende a un estado de equilibrio tras un lento proceso de formación denominado edafogénesis. En estas condiciones, el suelo se encuentra cubierto por vegetación que le aporta una cantidad progresiva de materia orgánica y nutrientes, produciendo una mejora en su estructura. El equilibrio que alcanzan los suelos puede verse perturbado por diversas acciones, entre las que destacamos las acciones antrópicas relativas al manejo. En zonas semiáridas, como la del sudeste español, con un régimen climático semiárido, la progresiva degradación que sufren sus suelos afecta de forma primordial a la vegetación que soportan los mismos. Si dicha vegetación desaparece, los suelos quedan entonces desprovistos de su principal barrera contra la degradación y la erosión. La destrucción de los agregados del suelo es el primer paso hacia el desarrollo de costras y sellado superficial, lo que da lugar a una reducción de la velocidad de infiltración del agua de lluvia, un aumento de las pérdidas por escorrentía y, en último término, a un incremento de los fenómenos de erosión (Albaladejo et al., 1996). Esta degradación puede terminar en muchos casos en procesos de desertificación, y afectar así gravemente al suelo disminuyendo su calidad, productividad y fertilidad.

La regeneración de las propiedades físicas de suelos degradados se plantea como necesidad para permitir o favorecer la implantación del componente vegetal, frenando de esta manera la erosión y el lixiviado de contaminantes. Esta mejora de la estructura provoca cambios positivos en aspectos como el drenaje y la capacidad de retención de agua, la difusión del oxígeno atmosférico, la respiración y penetración de las raíces. Asimismo, el mayor

grado de agregación de las partículas del suelo contribuye a mantener inmovilizado el C en los agregados del suelo, protegido del ataque microbiano, evitando así las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera (Beare et al., 1994; Lal, 2008).

## **1.1 Estructura y agregación del suelo**

La estructura de un suelo se define por la cantidad, tamaño, forma y distribución de los poros. A su vez, la distribución de partículas condiciona la existencia y las características de los poros definidos como la parte del suelo ocupada por agua y/o por la atmósfera del suelo. La estructura del suelo a menudo se expresa como el grado de estabilidad de los agregados, cuya medida se usa como un indicador de su calidad física, así como un indicador sensible de la degradación del suelo (Cerdá, 2000). En general, cuanto mayor sea el porcentaje de agregados estables, tanto menor será la erosionabilidad del suelo.

## **1.2 Mecanismos de agregación**

Está generalmente aceptado que la dinámica de formación de agregados sigue el modelo jerárquico de agregación del suelo propuesto por Tisdall y Oades (1982), según el cual los microagregados (<250 µm) se unen para formar macroagregados (>250 µm), siendo las fuerzas de cohesión intra-agregados mayores que las fuerzas inter-agregados (Edwards y Bremner, 1967).

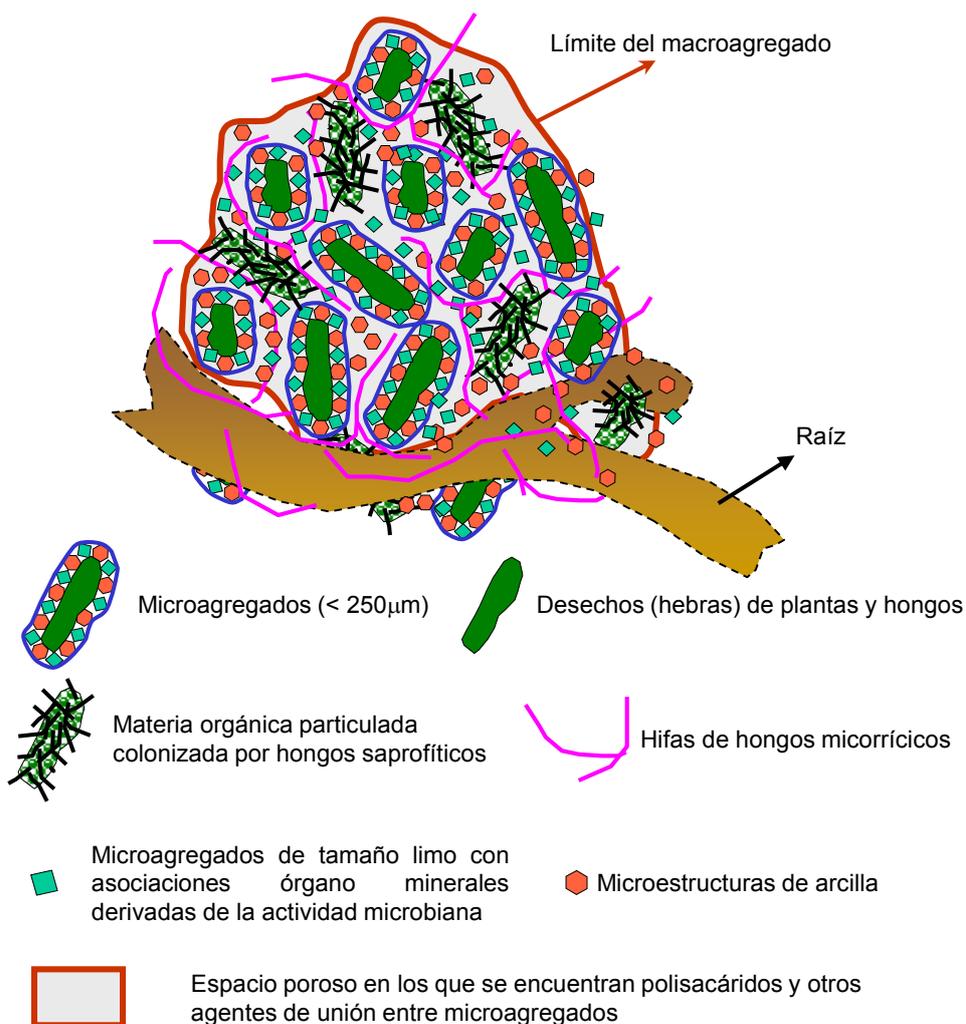
Los microagregados se forman por la unión de partículas de arcilla, moléculas de materia orgánica y cationes polivalentes. Estos componentes interaccionan formando coloides floculados que, a su vez, se unen a partículas de limo y arena fina. La estabilización de tales coloides está condicionada por los complejos orgánico-minerales, que se originan por la unión entre los componentes de las fracciones orgánica y mineral. Estos complejos se forman en dos etapas, primero debe haber un contacto y una mezcla entre ambas fracciones (orgánica y mineral), lo que se produce gracias a la acción de remoción de la fauna edáfica y al micelio de los hongos que tiende a agrupar las partículas. En una segunda etapa, se establecen enlaces químicos entre

sustancias orgánicas y minerales. Entre los complejos orgánico-minerales destacan por su estabilidad los complejos arcillo-húmicos (entre arcilla y ácidos húmicos). También pueden originarse complejos orgánico-metálicos entre compuestos orgánicos e iones metálicos como  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , etc. En los microagregados se forman colonias bacterianas cuyos exudados polisacáridos tienen una fuerte acción cementante.

La acción de las hifas de los hongos y las raíces contribuye a la formación de los macroagregados mediante la exudación de biopolímeros cementantes, especialmente polisacáridos. Asimismo, la red de raíces e hifas entrelazan físicamente unos agregados con otros, favoreciendo la formación de agregados estables en el suelo.

Los macroagregados estables se forman alrededor de la materia orgánica particulada (Figura 1), la cual incluye restos orgánicos apenas transformados, no humificados, bien por estar recién incorporados al suelo, bien por estar constituidos por compuestos difícilmente alterables como son las ligninas. Cuando la materia orgánica fresca es incorporada al suelo, es colonizada rápidamente por los microorganismos descomponedores. Las hifas de los hongos unen mecánicamente las partículas del suelo y la materia orgánica particulada y, por medio de polisacáridos extracelulares, las partículas minerales quedan unidas a bacterias y hongos. Además, los mucílagos secretados por las raíces también contribuyen a la agregación. Cuando se produce la descomposición de la materia orgánica incorporada, el crecimiento microbiano y la producción de biopolímeros disminuye, su acción agregante también disminuye y los macroagregados se vuelven menos estables. Se estima que los macroagregados que se forman de esta manera tienen un tiempo de permanencia en el suelo de unos pocos años (Puget et al., 2000).

Los factores abióticos, tales como los ciclos de sequía, humedad, congelamiento, etc. son capaces de orientar las partículas finas del suelo y atraerlas tan cerca unas a otras, que las fuerzas físicas entre ellas unen estas partículas muy firmemente.



**Figura 1.** Modelo conceptual de los diferentes niveles de organización entre micro y macroagregados del suelo, según Jastrow y Miller (1997), redibujado por José Álvarez Rogel.

### 1.3. Agentes de agregación

#### 1.3.1. Tipo abiótico

##### 1.3.1.1. Minerales de la arcilla

La agregación del suelo está fuertemente influenciada por los minerales de la fracción arcilla. Éstos condicionan de forma directa propiedades como el área superficial, la capacidad de cambio catiónico, la densidad de carga, la dispersividad y la capacidad de expansión, las cuales afectan a la agregación (Schulten y Leinweber, 2000). La interacción de la arcilla y el carbono orgánico se ve afectada por el pH del suelo, la capacidad de cambio catiónico y la presencia de iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), estando todos relacionados con la

cantidad y tipo de arcilla presente en el suelo (Amezqueta, 1999). Las arcillas de baja actividad tales como caolinita y haloisita están a menudo presentes en Alfisoles, Ultisoles y Oxisoles, mientras que las arcillas de alta actividad como esmectitas están presentes en Vertisoles.

Las arcillas aparecen como estructuras cristalinas en capas, o como minerales no cristalinos con estructura amorfa. En algunos suelos como los volcánicos, las arcillas no cristalinas son un importante factor de agregación, ya que el carbono orgánico se asocia con arcillas alofánicas. Minerales de arcilla no cristalinos como imogolita y alofano tienen áreas de superficie altas que generalmente aumentan la agregación (Powers y Schlesinger, 2002). Arcillas cristalinas no expansivas como la caolinita (1:1), tienen baja capacidad de cambio catiónico y área de superficie, que tienden a disminuir la estabilidad de los agregados. La agregación es generalmente más alta en esmectitas y otras arcillas 2:1 (Six et al., 2000; Caravaca et al., 2001). Sin embargo, la expansión de las esmectitas puede disminuir la agregación del suelo durante los ciclos de secado-húmedación.

#### 1.3.1.2. *Cationes*

La existencia de cargas negativas en la superficie de las partículas de arcilla y de una capa de cationes alrededor de ellas provoca que exista un equilibrio de atracción (por fuerzas de van der Waals) y repulsión (por fuerzas electrostáticas) entre los coloides. Las condiciones de dicho equilibrio van a determinar que las partículas de arcilla se agrupen (coloides floculados) o se repelan (coloides dispersos). Cuanto menor sea el espesor de esta doble capa, más intensas serán las fuerzas de atracción entre coloides. Los cationes de carga elevada como el  $\text{Ca}^{2+}$  facilitan que la doble capa se encuentre comprimida sobre la superficie de los coloides, de manera que la atracción entre coloides se verá favorecida y se producirá la floculación. Cuando predominen cationes de carga reducida (como el  $\text{Na}^+$ ) las capas difusas estarán más expandidas, existirá mayor solapamiento entre ellas y se originarán intensas fuerzas de repulsión, que pueden llevar a la dispersión de los coloides. Otro factor que influye sobre la predominancia de las fuerzas de atracción entre coloides es la concentración de la solución del suelo: cuanto más concentrada esté la solución más comprimidas estarán las capas difusas

y, por tanto, mayor tendencia a la atracción entre coloides. También el radio de hidratación de los diferentes cationes es importante, pues cuanto mayor sea éste, más se expandirán las dobles capas al humedecerse el suelo y mayor facilidad existirá para que los coloides se repelan. Según este factor, el  $\text{Na}^+$  inducirá una mayor repulsión entre coloides que el  $\text{Mg}^{2+}$  y éste que el  $\text{Ca}^{2+}$ .

### *1.3.1.3. Carbonatos*

El efecto de los carbonatos en la estructura del suelo está condicionado por la cantidad de carbono orgánico. Cuando la concentración de carbono orgánico es baja, la estabilidad de los macroagregados se ve reforzada por los carbonatos (Boix-Fayos et al., 2001). La alta concentración de carbonatos mejora la protección del carbono orgánico, probablemente a causa de la disminución de su mineralización y el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  (Clough y Skjemstad, 2000). Los carbonatos pueden aumentar la resistencia a la tracción de los agregados, pero disminuir la estabilidad de los microagregados (Schrader y Zhang, 1997; Boix-Fayos et al, 2001).

## *1.3.2. Tipo Biótico*

### *1.3.2.1. Carbono orgánico*

El carbono orgánico del suelo juega un papel destacado en la mejora de las características físicas de los suelos, debido a su capacidad para cementar las partículas inorgánicas contribuyendo a la formación de agregados. Un incremento en la cantidad de carbono orgánico en el suelo está generalmente asociado con un aumento en la estabilización de los agregados edáficos (Caravaca et al., 2003a). Asimismo, la velocidad de descomposición de la materia orgánica tiene una influencia directa sobre los agregados (Schulten y Leinweber, 2000). La materia orgánica más lábil o biodegradable se muestra muy eficaz en la formación de agregados estables, aunque este efecto es transitorio. Por el contrario, la materia orgánica más estable tiene un efecto menos notorio sobre la agregación, pero éste puede ser de mayor duración (Martens, 2000). La oclusión del carbono orgánico lábil dentro de los agregados aumenta su estabilidad y durabilidad, debido a la reducción de su descomposición por la microflora.

1.3.2.1.1. *Materia orgánica particulada*. Se compone de partículas de materia orgánica de diferentes tamaños (250-2000  $\mu\text{m}$ ). La fracción más fina de esta materia orgánica se asocia generalmente con la arcilla mediante cationes polivalentes (Jastrow, 1996), quedando ocluida y protegida frente a la biodegradación. La materia orgánica particulada gruesa más lábil, con mayor tasa de reciclado, puede actuar como núcleo para la formación de los agregados, resultando un agente muy importante en la unión de microagregados para formar los macroagregados. Esto se debe a la actuación de los microorganismos que al descomponer esta materia orgánica biodegradable producen polisacáridos extracelulares que actúan como agentes cementantes (Jastrow, 1996).

1.3.2.1.2. *Carbohidratos*. El papel de los carbohidratos en la mejora de la estructura del suelo depende tanto de su origen como de su naturaleza química. Los carbohidratos procedentes de las plantas son a menudo de mayor tamaño y aparecen en la fracción arena, mientras que los carbohidratos derivados de las actividades microbianas son más finos y están presentes en las fracciones arcilla y limo (Schulten y Leinweber, 2000). Los carbohidratos de origen microbiano tienden a ser más resistentes a la descomposición. Una reducción de la labranza (labranza de conservación o siembra directa), adiciones de enmiendas orgánicas y los cultivos de cobertura están asociados con un aumento de las concentraciones de carbohidratos y a la mejora de la estructura en el suelo (Shepherd et al, 2001; Debosz et al, 2002b; Roldán et al., 2005).

1.3.2.1.3. *Fenoles*. Las moléculas fenólicas pueden formar complejos con cationes mediante puentes catiónicos. Los fenoles y polifenoles son precursores de sustancias húmicas y aumentan la agregación. Los ácidos fenólicos aumentan las interacciones de agregación con productos microbianos (Martens, 2000).

1.3.2.1.4. *Lignina*. La baja tasa de descomposición de la lignina es considerada como un factor clave en el ciclo de los agregados (Palm y Rowland, 1997; Magill y Aber, 1998). Los mucílagos y otros compuestos de lignina contribuyen a la agregación del suelo (Caesar-Ton That, 2002).

1.3.2.1.5. *Lípidos*. En algunos suelos los lípidos pueden mejorar la estabilidad de los agregados debido a su naturaleza hidrofóbica evitando la dispersión de

las arcillas y el “slaking” o destrucción de macroagregados por humedecimiento rápido. La eficacia de los lípidos en la mejora de los agregados puede estar relacionada con la mineralogía de la arcilla, ya que éstos juegan un papel relevante en la unión de distintos minerales como las ilitas, esmectitas o caolinitas (Dinel et al., 1997).

*1.3.2.1.6. Sustancias húmicas.* El carácter recalcitrante de las sustancias húmicas es el resultado de su resistencia química y su asociación con la matriz del suelo, la cual le ofrece una protección física frente a la descomposición. Las sustancias húmicas incluyendo ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y humina contribuyen a la formación y estabilización de la estructura del suelo, favoreciendo la unión de partículas entre sí. Las sustancias húmicas pueden ser adsorbidas en las partículas de arcilla por cationes polivalentes evitando la dispersión de las mismas.

*1.3.2.2. Plantas.* La cantidad de residuos vegetales que se incorporan al suelo y los productos químicos liberados por las plantas afectan a la formación y renovación de los agregados. El tamaño, el diámetro y el peso medio de los agregados se correlacionan con la composición bioquímica de los residuos vegetales: fenoles, lignina, proteínas, polisacáridos etc. (Martens y Frankenberger, 1992; Martens, 2000). Los cultivos que aportan residuos ricos en fenoles aumentan la agregación respecto a otros con menor contenido.

*1.3.2.3. Raíces.* La rizosfera de la plantas ejerce numerosos efectos sobre la agregación del suelo. Las raíces tienden a realinear las partículas del suelo y liberar exudados, modificando las condiciones del suelo y afectando a la agregación. Ésta tiende a aumentar con el aumento de la densidad de raíces, las asociaciones microbianas y la glomalina (Rillig et al., 2002). La estabilidad de los agregados del suelo es mayor en la rizosfera de las plantas que en el suelo adyacente debido a la longitud, masa y distribución de las raíces y al crecimiento de las hifas (Caravaca et al., 2002b). La rizosfera alberga una gran población de microorganismos que contribuye al carbono orgánico del suelo y a la agregación. Las raíces mejoran la agregación mediante la liberación de una variedad de compuestos con efecto cementante sobre las partículas del suelo, como es el caso de los mucílagos. Asimismo las raíces modifican los ciclos de

secado-humectación respecto al suelo adyacente, pudiendo aumentar la estabilidad de los agregados en algunos casos y disminuyéndola en otros, dependiendo del tipo de arcilla que contenga el suelo (Angers y Caron, 1998). Otra forma de modificar el porcentaje de agregados estables por parte de las raíces es alterando el ciclo osmótico e iónico a través de la adsorción de nutrientes.

**1.3.2.4. Microorganismos.** Hongos y bacterias mejoran la agregación del suelo al segregar compuestos extracelulares que unen partículas entre sí. La actividad microbiana varía con el tamaño del agregado, la estación del año, el grado de humedad, el tipo de suelo y el manejo de éste (Mendes et al., 1999; Schutter y Dick, 2002). En consecuencia, la actividad bacteriana está predominantemente asociada al proceso de microagregación, mientras que la actividad fúngica participa fundamentalmente en la formación de macroagregados (Tisdall y Oades, 1982; Deneff et al., 2001; Schutter y Dick, 2002).



**Foto 1.** Detalle de los agregados formados por hifas fúngicas.

Los hongos micorrícicos arbusculares desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de los agregados del suelo, siendo el factor biótico más importante en dicho proceso (Rillig y Mummey, 2006; Leifheit et al., 2014; Rillig et al.,

2015). Los hongos micorrícicos favorecen la formación de agregados estables en el suelo mediante diversos mecanismos, tanto físicos, a través de la agregación física de las partículas mediante las hifas, así como químicos, debido a la secreción de polisacáridos y glicoproteínas adhesivas como la glomalina (Wright y Anderson, 2000; Caravaca et al., 2002b; Rillig et al., 2002). Los suelos con arcillas expansivas tienen más glomalina total que los que contienen arcillas de baja actividad. Es posible que la naturaleza hidrófoba y recalcitrante de la molécula de la glomalina pueda proteger a otros agentes de agregación (Wright y Upadhyaya, 1998). Los ciclos de secado y humectación pueden aumentar la polimerización e hidrofobicidad de la glomalina.



**Foto 2.** Vista microscópica de una raíz con esporas e hifas micorrícicas recubiertas por la glomalina, revelada por un colorante fluorescente (Foto de Sara Wright).

1.3.2.5. *La fauna del suelo.* Numerosos artrópodos, lombrices y nemátodos viven en el suelo y tienen una influencia importante en la estructura edáfica (Siddiky et al., 2012). Los efectos de esta fauna son diversos, ayudan a mejorar la aireación, la porosidad, infiltración, mezclan la arena, mejoran la estabilización de nitrógeno y carbono. Por el contrario, la actividad de la macro- y mesofauna puede provocar la degradación de las propiedades del suelo

mediante la eliminación del carbono orgánico, y la rotura de las uniones entre partículas durante la ingestión.

#### **1.4. Factores que afectan a la agregación del suelo**

Diferentes factores intervienen en la formación, equilibrio, renovación y destrucción de los agregados del suelo. Factores ambientales como el clima o antrópicos como el laboreo o la adición de materia orgánica son determinantes en la estructura del suelo (Barto et al., 2010).

##### *1.4.1. Clima*

El efecto del clima sobre la agregación del suelo está relacionado con los cambios de temperatura y humedad del suelo, que originan los ciclos de secado y humectación, congelación y descongelación (Singer et al., 1992). Estos cambios ambientales afectan directamente tanto a la actividad microbiana como a la velocidad de descomposición de la materia orgánica, lo cual, a su vez, influye sobre el estado de agregación del suelo. Las temperaturas altas elevan la tasa de respiración en suelos debido al incremento de la actividad microbológica, mientras que las temperaturas bajas incrementan el balance de carbono orgánico (Franzluebbers et al., 2001). Los suelos fríos y húmedos tienden a tener más carbono orgánico no disponible que los suelos cálidos y secos (Franzluebbers et al., 2001). En regiones húmedas y templadas, la agregación estructural del suelo se ve afectada por ciclos de congelación-descongelación (Dalal y Bridge, 1996).

En regiones áridas y semiáridas, la humedad del suelo experimenta continuos cambios, siendo los ciclos de secado y humectación altamente relevantes en la formación y estabilización de los agregados estructurales. Estos ciclos de humedad pueden provocar la ruptura de los agregados en suelos con arcillas expansivas, ya que al hincharse éstas se llegan a separar disminuyendo la estabilidad de los agregados (Singer et al., 1992). Por el contrario, estos ciclos de secado y humectación pueden llegar a ser positivos en suelos donde las arcillas no son hinchables, ya que durante la humectación las arcillas tienden a dispersarse y luego a formar puentes entre las capas durante el secado (Attou y Bruand, 1998). Algunos suelos de regiones áridas llegan a tener niveles más

altos de agregación y microagregados estables que los de las regiones húmedas del Mediterráneo (Boix-Fayos et al., 2001).

#### 1.4.2. Factores antrópicos

La acción antrópica tiene una gran importancia en la estructura y los agregados del suelo. Para mejorar la agregación hay que señalar a la producción vegetal ya que ésta va a determinar la cantidad de entrada de carbono al suelo. Asimismo, las técnicas de manejo del suelo para aumentar la agregación incluyen métodos de labranza, gestión de residuos, adición de enmiendas y la inoculación micorrícica.

##### 1.4.2.1. Laboreo

El laboreo continuado puede romper los agregados del suelo y destruir su estructura. Las condiciones del suelo como la temperatura, la humedad y la aireación cambian continuamente mediante la acción del arado llegando a incrementar la velocidad de descomposición de la materia orgánica, siendo el ciclo de los agregados más rápido. La fracción de carbono orgánico que se pierde por el laboreo es la que contribuye a mantener unidos los macroagregados (Puget et al., 2000; Roldán et al., 2002). En agroecosistemas bajo labranza cero o reducida, la tasa de carbono orgánico y de agregados estables es más alta que en sistemas con labranza convencional (Filho et al., 2002). El no laboreo o mínimo laboreo puede moderar el impacto de los ciclos de humectación y secado sobre la estructura edáfica (Roldán et al., 2003, 2005, 2007).

##### 1.4.2.2. Enmiendas orgánicas

La adición de enmiendas orgánicas al suelo es una estrategia muy utilizada a la hora de recuperar y mejorar la estructura del suelo. Esta metodología ha sido ensayada, fundamentalmente, en relación con sistemas agrícolas, pero también en sistemas naturales ha dado buenos resultados, favoreciendo el crecimiento y supervivencia de plantas de *Pinus halepensis* micorrizadas (Roldán y Albaladejo, 1994; Roldán et al., 1996; Querejeta et al., 1998, Martínez-Fernández et al., 1997, Caravaca et al., 2002a) y de especies arbustivas en suelos muy degradados (Caravaca et al., 2002b). Cuando el

suelo recibe un aporte de materia orgánica se desencadenan una serie de reacciones químicas, físico-químicas y procesos microbiológicos, que modifican las características del suelo. Entre las modificaciones producidas por tales enmiendas destacan el aumento de la capacidad de retención de agua, la infiltración, la porosidad y la estabilidad estructural (Roldán et al., 1996; Caravaca et al., 2001). La reactivación de las poblaciones microbianas, como consecuencia de la adición de los materiales orgánicos al suelo, se traduce en un incremento en los niveles de bacterias y poblaciones fúngicas, que son los principales responsables en la formación de agregados estables mayores de 0,2 mm (Caravaca et al., 2002b). Los tipos de enmendantes orgánicos más utilizados son: residuos de cosechas, residuos urbanos e industriales.

#### *1.4.2.2.1. Mulching (acolchado)*

Las coberturas con residuos de cosechas mejoran la estructura del suelo. La adición de un mantillo a la superficie del suelo disminuye la erosión, reduce la evaporación, protege contra el impacto de la lluvia y aumenta la estabilidad de agregados (Roldán et al., 2003; García-Orenes et al., 2010). La efectividad de esta práctica agrícola depende de la cantidad y calidad de estos residuos (Martens, 2000). Los residuos de cosechas más utilizados son las pajas de cereales debido a su alto contenido en hidratos de carbono.

#### *1.4.2.2.2. Residuos Urbanos*

La incorporación de residuos urbanos al suelo como enmendantes está avalada por la composición de su materia orgánica constituida por fracciones húmicas y fúlvicas, de gran eficacia en la agregación de partículas (Lax y García-Orenes 1993). Esta adición está condicionada por la relación C/N. Si esta relación es muy alta podría dar lugar a procesos rápidos de descomposición de la materia orgánica del residuo en el suelo, lo cual desequilibraría la actividad de las poblaciones microbianas e incluso podría favorecer la presencia de contaminantes biológicos o químicos. En sistemas naturales, se ha comprobado que los efectos de los materiales orgánicos ricos en compuestos fácilmente biodegradables sobre la estructura del suelo persisten durante años, incluso con una sola adición de este tipo de residuos frescos (Alguacil et al., 2009).

Una vía de conversión de los residuos orgánicos en productos aceptables para la utilización en el sector agrícola o forestal es compostarlos, con lo que se

consiguen varios beneficios: estabilizarlos a través de una descomposición parcial de su materia orgánica, convertir parte de los elementos nutrientes en formas asimilables, destruir los microorganismos patógenos y eliminar los malos olores. Sin embargo, la utilización de los residuos orgánicos compostados, a corto plazo, resulta menos efectiva que la de los residuos orgánicos frescos para mejorar la estructura de los suelos (Roldán et al., 1996; Caravaca et al., 2001). Esto es debido, fundamentalmente, a que durante el proceso de compostaje dichos residuos pierden la mayor parte de los componentes orgánicos, tales como los polisacáridos, con fuerte acción cementante sobre los agregados del suelo.

#### 1.4.2.2.3. Residuos de la industria agroalimentaria

El aprovechamiento de los subproductos agroindustriales para su aplicación al suelo como enmendantes orgánicos contribuye a incrementar el contenido de materia orgánica del mismo, además de favorecer su eliminación del medio ambiente. En particular, el alperujo es un subproducto de naturaleza lignocelulolósica, generado en la industria de la obtención del aceite de oliva. Estos residuos presentan una elevada carga contaminante, debido principalmente a su alto contenido en polifenoles y ácidos orgánicos, por lo que es necesario someterlos a un proceso previo de estabilización para evitar efectos nocivos sobre la planta y el suelo. Dentro de los métodos biológicos utilizados para la estabilización del alperujo destaca la fermentación biológica con hongos filamentosos, tales como *Aspergillus niger* (Vassilev et al., 1995; Vassileva et al., 2010) o afiloforales, tales como *Phanerochaete flavido-alba* (Linares et al., 2003) y *Phanerochaete chrysosporium* (Medina et al., 2010). Tales sistemas biológicos que involucran residuos agroindustriales y microorganismos, se han utilizado para la solubilización del fosfato de roca (RP) y la mejora del crecimiento de las plantas cultivadas y la nutrición en suelos agrícolas (Vassilev y Vassileva, 2003; Vassilev et al., 2006). La sincronización del proceso de mineralización de la materia orgánica y la solubilización de fosfato de roca constituye un atractivo procedimiento biológico de interés en las estrategias de recuperación de suelos degradados (Caravaca et al., 2004; Vassilev et al., 1995; Vassileva et al., 2010; Medina et al., 2010).

### 1.4.2.3. Inoculación micorrícica

La inoculación con hongos micorrícicos resulta una estrategia efectiva para mejorar la sostenibilidad del sistema suelo-planta. Su uso puede ser relevante, no solamente para la revegetación de tierras degradadas, sino para mejorar la estructura del suelo en terrenos agrícolas y forestales. Los hongos arbusculares son simbiontes obligados, su ciclo de vida depende de las raíces de las plantas, son componentes esenciales de la biota del suelo y se encuentran en todos los ecosistemas naturales. La simbiosis micorrícica incrementa el aporte de nutrientes a las plantas, las protegen contra estreses abióticos, incrementan la actividad fotosintética, mejoran el enraizamiento, favorecen la diversidad de las comunidades de plantas y la sucesión vegetal, ayudan al control integrado de patógenos y mejoran la estructura del suelo (Smith y Read, 2008). Como se ha mencionado anteriormente, las micorrizas son muy importantes para mantener la estructura del suelo debido al papel que juega el micelio en la formación de agregados estables (Caravaca et al., 2002b; Rillig et al., 2010; Daynes et al., 2013).

## 1.5. Relación entre estructura y calidad del suelo

Definimos la calidad de un suelo como la capacidad para mantener su productividad biológica y la calidad ambiental, promoviendo además la salud de los animales, las plantas, y del propio ser humano (Doran y Parkin, 1994).

Para determinar la calidad de un suelo tenemos que utilizar indicadores que nos describan el estado de ese suelo con el objetivo de llevar a cabo las acciones necesarias para su recuperación. Entre los parámetros utilizados para identificar el grado de calidad de un suelo se destacan los de tipo físico, químico, biológicos y bioquímicos.

Dentro de las propiedades físicas, la determinación de la estructura es fundamental en la valoración de la calidad de un suelo afectado por la erosión, sobre todo en un ambiente semiárido. Los suelos con una buena estructura y una buena agregación no requieren grandes aportes en el manejo para obtener buenas cosechas y mantener sus características; por el contrario, aquellos con una estructura deficiente requieren muchos cuidados para su manejo. Una buena estructura influye positivamente sobre propiedades clave como la

capacidad de retención del agua y la velocidad de infiltración, disminuyendo la escorrentía superficial, mejorando la aireación, la penetración de las raíces y reduciendo las emisiones de CO<sub>2</sub>.

## OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta Tesis es comprobar y cuantificar el efecto de diversas acciones antrópicas (prácticas de revegetación con arbustivas mediante el uso de hongos micorrícicos arbusculares y la aplicación al suelo de enmendantes orgánicos y prácticas de manejo agrícola) sobre la estructura y calidad del suelo.

La hipótesis de partida es que los efectos de las actuaciones antrópicas sobre la formación y estabilización de la estructura edáfica están principalmente relacionados con la actividad de la comunidad microbiana del suelo.

Los **objetivos específicos** son:

- Determinar la influencia de la inoculación micorrícica y la aplicación de enmiendas orgánicas sobre la estabilización de los agregados del suelo bajo condiciones controladas, así como determinar las relaciones entre los cambios físicos con las variaciones microbiológicas inducidas por estos tratamientos.
- Evaluar el efecto del secado-rehumectación del suelo, la inoculación con hongos MA y la adición de una enmienda orgánica sobre la formación y dinámica de agregación de la estructura del suelo.
- Comprobar la influencia del tratamiento combinado que implica la adición de un enmendante orgánico y la inoculación micorrícica, sobre la calidad estructural y biológica del suelo, así como su repercusión sobre el establecimiento de las plantas en un área mediterránea semiárida degradada.
- Determinar los efectos sobre la tasa de erosión y estabilidad estructural del suelo inducidos por diferentes prácticas agrícolas en un ambiente mediterráneo semiárido.



# **Materiales y Métodos**



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Descripción del área experimental



Figura 1. Mapa de zonas experimentales.

#### 2.1.1 Experimentos en condiciones de campo

##### Zona de estudio Coto de los Cuadros

El primer experimento de campo se llevó a cabo en el área experimental del Coto de los Cuadros en la provincia de Murcia ( $38^{\circ} 10'$  Norte;  $1^{\circ} 05'$  Oeste) en la ladera este de los Cabezos de Cueva Negra. Está situado al norte del municipio de Murcia en la pedanía del Esparragal. Al norte se encuentra el paisaje protegido de Ajauque y Rambla Salada, al este el embalse de Santomera cuyas aguas provienen de la Rambla Salada y al sur la huerta de Murcia. Este entorno está catalogado en el Plan General de Ordenación Urbana de Murcia como Espacio Natural de Alto Valor Ecológico y Paisajístico.

Se trata de una zona caracterizada por un relieve prelitoral con laderas medias y suaves, cubiertas con un extenso pinar fruto de un plan de repoblación llevado a cabo en los años 60, alternado con cuencas de incisión fluvial. Las altitudes oscilan entre los 100 y 200 metros.

El área de estudio está constituida por materiales cuaternarios de bloques, gravas, conglomerados y arcillas, formando terrazas y piedemontes como características litológicas y geomorfológicas más destacadas (ENADIMSA, 1972).

El área de estudio tiene un clima mediterráneo semiárido donde la precipitación media anual está por debajo de los 300 mm y tiene una temperatura media de 19,2° C; la evapotranspiración potencial es elevada alcanzando los 1000 mm al año, lo que supone un déficit hídrico importante de aproximadamente 700 mm. Las precipitaciones se reparten de una forma irregular siendo en ocasiones torrenciales. En la vegetación de la zona predomina el *Pinus halepensis* ya que esta fue la especie que se utilizó para la repoblación, aunque también se plantaron *Cupressus sempervivens*. En las zonas de solana predominan *Cistus albidus*, *Stipa tenacissima*, *Anthyllis cytisoides*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*; en las zonas de umbría encontramos *Pistacia lentiscus*, *Rhamnus lycioides* y una gran cantidad de *Chamaerops humilis*; en ramblas y barrancos habitan *Nerium oleander*, *Tamarix boveana* y *Phragmites australis*. El coto de los cuadros ha tenido una importante actividad ganadera durante siglos ya que por el pasan dos vías pecuarias y con anterioridad a la reforestación de los años 60 se llevaba a cabo una actividad agrícola de secano.. El suelo donde se desarrolló el estudio es un Haplocalcid típico (Soil Survey Staff, 2010) desarrollado a partir de sedimentos cuaternarios. Las características físicoquímicas y químicas del suelo se encuentran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características analíticas del suelo usado en el experimento (n= 6).

pH (H <sub>2</sub> O)	8,5±0,0 <sup>a</sup>
Conductividad eléctrica (1:5, $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	225±2
Textura	franca
C orgánico total ( $\text{g kg}^{-1}$ )	10,3±0,3
Carbohidratos totales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	552±20
C hidrosoluble ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	100±1
Carbohidratos hidrosolubles ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	8±0
N total ( $\text{g kg}^{-1}$ )	0,95±0,02
P disponible ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	7±0
K extraíble ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	222±4
C biomasa microbiana ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	396±11
Deshidrogenasa ( $\mu\text{g INTF g}^{-1}$ )	51±1
Ureasa ( $\mu\text{mol NH}_3 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,31±0,03
Proteasa-BAA ( $\mu\text{mol NH}_3 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,60±0,04
Fosfatasa ( $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,28±0,02
$\beta$ -Glucosidasa ( $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,46±0,01
Estabilidad de agregados (%)	11,5±0,4

<sup>a</sup>Media  $\pm$  error estándar .



**Figura 2.** Vista parcial de la zona de estudio Coto de los Cuadros.

### *Zona de estudio El Teularet*

El segundo estudio de campo se realizó en la estación experimental de El Teularet situada en la Sierra de Enguera (38° 50' Norte; 0° 42' Oeste), en el sureste de la provincia de Valencia a una altura de unos 760 metros sobre el nivel del mar.

La Sierra de Enguera es la alineación montañosa más meridional del Sistema Ibérico, y forma parte del Macizo del Caroig, delimitado al norte y al este por el Río Júcar, al este por el valle de Ayora y al sur por el Valle del Río Cañoles. Está formada por calizas del cretáceo predominando los procesos de karstificación.

El clima se caracteriza por una precipitación media anual de 479 mm, repartida de una forma muy irregular, teniendo una variabilidad estacional e interanual elevada y frecuentes periodos de sequía. La temperatura media es de 14 °C, la cual oscila entre los 23 °C de agosto y los 9 °C de enero. La vegetación climática es un encinar de *Quercus coccifera*, el cual fue sustituido por pinares destinados a la industria maderera. Los pinares sufrieron un rápido abandono

en los años 50 y 60, lo que finalmente facilitó la proliferación de incendios y el establecimiento del matorral. El paisaje vegetal más común es ahora el del matorral con algunos pinares, o bien matorrales en los que los pinos son cada vez más abundantes fruto de su recuperación natural o potenciada por las repoblaciones.

En la Sierra de Enguera, el matorral está compuesto básicamente por *Pistacia lentiscus*, *Quercus coccifera*, *Juniperus oxycedrus*, *Cistus albidus*, *Romarius officinalis* y *Ulex parviflorus*. En la Sierra Enguera han convivido diferentes usos del suelo a través de los años, al uso forestal y maderero hay que sumar el pastoreo así como el cultivo de secano predominando el cultivo de cereal, olivo y almendro. La zona utilizada para el estudio estaba dedicada al cultivo de secano. En esta zona los suelos han sido intensamente arados durante siglos. El suelo es un Xerorthent típico desarrollado sobre margas del Cretácico (Soil Survey Staff, 2010).

**Tabla 2.** Características analíticas del suelo usado en el experimento (n= 20).

Textura (%) <sup>a</sup>	39,38,23
pH (1:5, H <sub>2</sub> O)	8,30±0,02
Conductividad eléctrica (1:5, µS cm <sup>-1</sup> )	185±4
CaCO <sub>3</sub> (%)	60±3
C orgánico total (g kg <sup>-1</sup> )	12,5±0,1
C hidrosoluble (µg g <sup>-1</sup> )	74±1
C biomasa microbiana (µg g <sup>-1</sup> )	270±2
N total (g kg <sup>-1</sup> )	0,78±0,03
P disponible (mg kg <sup>-1</sup> )	2±0
K extraíble (mg kg <sup>-1</sup> )	303±12
Tasa de respiración basal (µg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	5,7±0,3
Media ± desviación estándar	

<sup>a</sup>Arena: 2-0,02mm, limo: 0,02-0,002 mm, arcilla: <0,002mm



**Figura 3.** Vista parcial de la zona de estudio El Teularet.

### **2.1.2 Experimentos en condiciones controladas**

Los experimentos bajo condiciones controladas se llevaron a cabo en las instalaciones del servicio de apoyo a la investigación (SAI), en la sección de experimentación agroforestal (SEAF) de la Universidad de Murcia, localizado en el Campus Universitario de Espinardo. Para los dos experimentos en maceta bajo condiciones controladas se utilizaron dos suelos, uno traído del Coto de los Cuadros cuyas características se han descrito con anterioridad y un suelo agrícola representativo de la huerta tradicional murciana, el cual se encuentra descrito detalladamente en el capítulo correspondiente.

## **2.2 Material biológico y condiciones de crecimiento**

### **2.2.1 Especies vegetales utilizadas**

*Juniperus oxycedrus* L.

Es un arbusto perennifolio que puede alcanzar los 4 m de altura con ramas penduladas y posee una copa muy tupida de forma cónica o aovada, acabando frecuentemente en forma puntiaguda. Tronco grueso y derecho, de corteza fibrosa, pardo grisácea, con hojas en posición helicoidal, estrechamente triangulares, puntiagudas, de 8 a 25 mm, con dos líneas blancas por el haz,

separadas por una verdosa más estrecha. Es una especie unisexual dioica, produce pies masculinos y femeninos. Florece al final del invierno y durante la primavera, madurando los gálbulos (frutos), al segundo año, los frutos son de forma globosa u ovoide, carnosas, abayadas, de un color verdoso al principio y posteriormente rojo o pardo-rojizo. Se encuentra sobre todo tipo de suelos, principalmente en los encinares y demás bosques mediterráneos, manteniéndose cuando éstos son talados y soportando muy bien los suelos pedregosos y poco profundos; desde el nivel del mar a los 1000 metros, donde empieza a escasear. Aguanta los climas secos.



**Figura 4.** Detalle de *Juniperus oxycedrus* L.

*Dorycnium pentaphyllum* Scop

Es un arbusto de 30 a 70 cm de altura, cuyos tallos y ramas son netamente leñosos, perteneciente a la familia de las leguminosas. Hojas sentadas con folíolos lineares, pilosos por ambas caras. Flores pequeñas en umbela. Cáliz piloso. Corola blanca. El fruto es una legumbre ovoide, globosa, de 3 a 5 mm y con 1 o 2 semillas. Florece en primavera y verano. Es una planta propia de matorrales, pastizales y pinares de repoblación, tolera todo tipo de suelos aunque es más frecuente en terrenos calizos, abiertos y secos, junto a salvias, espliegos y tomillos. Es típica del área mediterránea, abundante en la Península Ibérica y en Baleares.



Figura 5. *Dorycnium pentaphyllum* Scop

*Avena sativa L.*

Planta anual perteneciente a la familia de las gramíneas. Hojas de color verde intenso, muy anchas (2 cm), lígula grande y ovalada y aurículas ausentes. Ahijamiento abundante. Tallos gruesos, altura 2 metros. Inflorescencia en panícula abierta. Es poco exigente en cuanto a suelos, rebrota tras siega o pastoreo y se adapta bien al secano. Se siembra en cultivo puro o mezclado con alguna leguminosa de ciclo similar (guisante, veza...) o gramínea (centeno) en septiembre-octubre o bien en enero-febrero.

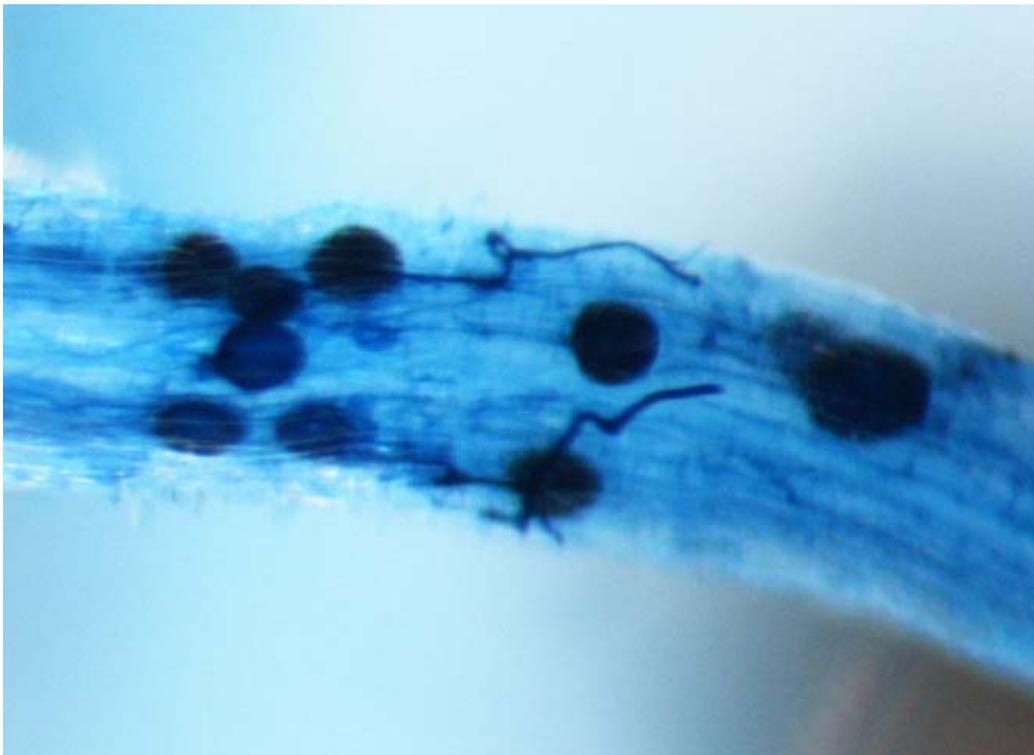


Figura 6. *Avena sativa L.*

**2.2.2. Microorganismos seleccionados****Hongos Micorrícicos Arbusculares (MA)**

Los hongos micorrícicos utilizados, *Glomus intraradices* Schenck y Smith (EEZ 1), *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss. y Menge) (EEZ 45) y *Glomus mosseae* (Nicol y Gerd.) Gerd. y Trappe (EEZ 43), se obtuvieron de la colección de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada. La nomenclatura

botánica actual reconoce estas denominaciones como sinónimos, sin embargo se ha preferido mantener la nomenclatura que coincide con los registros de la colección de procedencia. El género *Glomus* pertenece a la familia *Glomaceae*, dentro de la clase Glomeromicota. Tradicionalmente se adscribían al orden endogonales dentro de la clase de los Zigomicetos, pero investigaciones a nivel molecular mostraron que forman una propia clase filogenética (Schüßler *et al.*, 2001). Para la reproducción del inóculo se siguió el siguiente protocolo: se prepararon cultivos trampa utilizando como sustrato de crecimiento una mezcla de sepiolita:vermiculita (1:1, v/v) estéril y *Sorghum bicolor* L. como planta hospedadora. Las plántulas se inocularon con cada uno de los endófitos seleccionados, se fertilizaron con osmocote® de liberación lenta y se dejaron crecer bajo condiciones de invernadero durante 4 meses. El inóculo micorrícico resultante consiste en una mezcla de sustrato rizosférico que contiene esporas, hifas y fragmentos de raíces micorrizadas.



**Figura 7.** Detalle de una raíz colonizada por Hongos Micorrícicos Arbusculares.

## Hifomicetos

*Aspergillus niger* van Tiegh es una especie del género anamórfico *Aspergillus* perteneciente a los hifomicetos, que está caracterizado por una conidiogénesis enteroblástica con células fialídicas dispuestas en conidióforos densamente ramificados en su extremo. Si en el género *Aspergillus* existen teleomorfos, éstos pertenecen al orden eurotiales dentro de los ascomicetos.

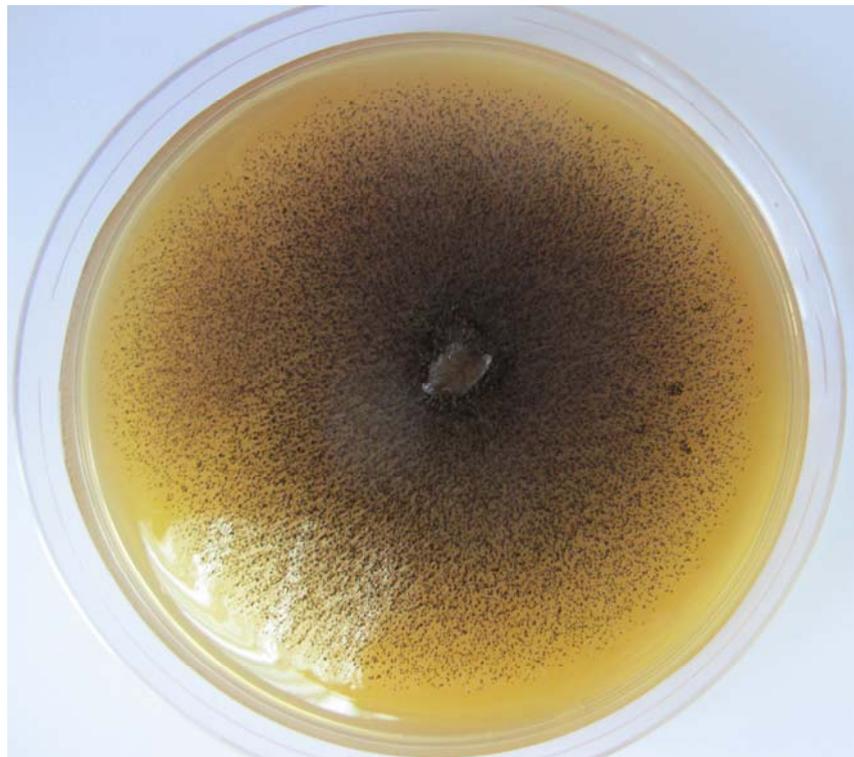


Figura 8. *Aspergillus niger* van Tiegh.

### 2.2.3 Residuos orgánicos

#### Residuo sólido urbano compostado

El residuo orgánico compostado procedió de una planta de tratamiento de residuos municipales de Murcia. El residuo fue producido por el sistema de pila al aire con volteos diarios (sistema Indora). Se trata de un proceso de fermentación rápida (60 días) de tipo aerobio en el que deben controlarse principalmente la humedad, la temperatura y la aireación. El compostaje basado en volteos es un sistema sencillo, eficaz y económico aconsejable para

residuos sólidos urbanos de las zonas del sureste español. En estas zonas los residuos orgánicos son muy biodegradables alcanzándose durante el proceso fermentativo temperaturas superiores a los 65°C, suficiente para la destrucción de los organismos patógenos y para la estabilización de la fracción orgánica de los residuos. Las determinaciones analíticas del residuo orgánico compostado se realizaron sobre el material secado al aire, molido y tamizado a 1 cm, siguiendo los métodos descritos por Page et al. (1982).

Los resultados del análisis del compost se recogen en la Tabla 3. Cabe destacar el alto contenido en carbono orgánico total, carbohidratos y nutrientes (nitrógeno y fósforo).

**Tabla 3.** Características analíticas del residuo sólido urbano compostado.

PH (1:5)	6,7
Conductividad eléctrica (1:5) ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	4700
Materia orgánica (%)	55,22
Carbono orgánico total (%)	27,6
Carbono hidrosoluble ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	1950
Carbohidratos hidrosolubles ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	76
Polifenoles ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (como ácido p-cumárico)	1972
Nitrógeno total (%)	1,45
Nitrógeno amónico ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	3350
C/N	19
Fósforo total (%)	0,38
Potasio total ( $^{\circ}/\text{Q}$ )	1,2
Ca (%)	9,21
Mg (%)	0,68
Na (%)	0,96
Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	146
Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	261
Ni ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	25

\*Media  $\pm$  error estándar (n=6).

### Lodo de depuradora compostado

El lodo digerido aerobicamente se obtuvo de una planta de tratamiento de aguas residuales en Murcia. Para la elaboración del compost, el lodo se mezcló

con virutas de madera (agente estructurante) en la proporción 1:1 (v:v). El proceso de compostaje fue el sistema de pila móvil, consistiendo en una primera fase de compostaje propiamente dicha, en la que las pilas de residuos se voltearon nueve veces durante 2 meses y una segunda fase de maduración, en la que los productos se dejaron reposar en bandejas durante 2 meses para que tuviera lugar la estabilización de la materia orgánica. A lo largo del proceso, los parámetros temperatura, aireación y humedad se controlaron minuciosamente. La temperatura alcanzada fue en todos los casos superiora los 65°C, suficiente para la destrucción de los organismos patógenos.

Las características analíticas del lodo de depuradora compostado, determinadas por métodos estándar (Page et al., 1982), se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Características analíticas del lodo de depuradora compostado utilizado en el experimento.

Cenizas (%)	18,6±0,1*
pH (1:5)	6,1±0,0
Conductividad eléctrica (1:5, $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	3095±48
Carbono orgánico total ( $\text{g kg}^{-1}$ )	380±4
Carbono hidrosoluble ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	7245±22
Carbohidratos hidrosolubles ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	590±53
Nitrógeno total ( $\text{g kg}^{-1}$ )	14,5±0,1
N-NH <sub>3</sub> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	312±13
N-NO <sub>3</sub> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	1967±49
P total ( $\text{g kg}^{-1}$ )	4,5±0,1
K total ( $\text{g kg}^{-1}$ )	2,3±0,1
Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	6562±165
Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	212±8
Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	588±30
Ni ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	44±3
B ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	85±2
Cd ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	9±1
Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	180±28
Porosidad (%)	78±1

\*Media ± error estándar (n=6).

### **Residuo de alperujo microbiológicamente tratado**

Para el proceso de fermentación se utilizó como sustrato el residuo de alperujo (DOC) un material lignocelulósico procedente de una almazara situada en Granada (España). Este residuo sólido se secó a 60 °C en el horno y después se molió en fragmentos de 2 mm. Para la preparación del fermentado, a cada matraz Erlenmeyer de 250 ml se le añadieron 5 g del residuo, junto con 50 ml de la solución mineral Czapek-Dox. Esta solución está descrita en el catálogo no. 70185 de Fluka Chemica y contiene (g l<sup>-1</sup> de agua desionizada). FeSO<sub>4</sub>, 0,01; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,5; KCl, 0,5; NaNO<sub>3</sub>, 3,0; sacarosa, 30; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0 y un pH final de 7,3±0,2. A los matraces se les añadió, 0,75 g de fosfato de roca (fluoroapatito procedente de Marruecos con un 12,8% de fósforo soluble y 1 mm de grosor). Tras autoclavarlos a 121 °C durante 30 minutos, se inocularon con 3 ml de una suspensión de esporas de *A. niger* (1,2 x 10<sup>7</sup> esporas). La cepa NB2 de *Aspergillus niger* utilizada en este estudio se mantuvo en placas de agar patata-dextrosa a 4 °C. Para la preparación del inóculo, se cultivó en placa a 30 °C durante 7 días. Con la ayuda de un asa de platino y de agua desionizada estéril se desprendieron las esporas del cultivo del hongo lignocelulolítico crecido en la placa, formándose una suspensión que se utilizó como inóculo. La fermentación se llevó a cabo mediante incubación en cultivo estático a 30 °C durante 20 días, periodo previamente seleccionado en estudios anteriores (Vassilev *et al.*, 1995; Vassilev *et al.*, 1996). Las características del DOC después de la fermentación fueron: pH 4,0; conductividad eléctrica (1:10), 1.231 μS cm<sup>-1</sup>, P total, 0,38 %; N total, 0,62 %; C orgánico total 22,2 % y C hidrosoluble 1.146 μg g<sup>-1</sup>.

### **2.3. DISEÑO Y FACTORES EXPERIMENTALES**

El diseño y los factores experimentales se exponen para cada caso particular en los capítulos correspondientes.

## 2.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN PLANTA

### 2.4.1. Crecimiento vegetal, estado nutricional y micorrización

#### ***Crecimiento de la planta***

El peso fresco de la parte aérea y radical se anota. Los pesos secos se determinan tras proceder al secado del material a 65 °C durante 24h.

#### ***Nutrientes en hoja.***

La determinación de los nutrientes foliares se realizó en el material seco y molido. Las medidas se llevaron a cabo en el servicio de ionómica del CEBAS en un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente ICP-OES (ICAP 6500 DUO) y en un analizador elemental CHN (LECO TruSpec).

#### ***Porcentajes de micorrización***

Se utilizaron las técnicas estándar para la visualización y cuantificación de hongos MA. Previamente a la cuantificación de la micorrización es necesario teñir las raíces con azul tripán siguiendo el método de Philips y Hayman (1970).

#### **Reactivos**

KOH 10 %

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 vol.

Azul tripán: 0,3 g azul tripán + 200 ml glicerol + 200 ml ácido láctico + 200 ml agua desionizada

Ácido láctico 50%

#### **Procedimiento:**

Primero se lavan los segmentos de raíz y se colocan en cajas histológicas. Se colocan así en KOH al 10% y se calientan a 90°C en baño maría durante aproximadamente media hora para emblandecerlas. Después se elimina el KOH lavando las raíces con agua. En el caso de raíces pigmentadas se sumergen en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 vol.) el tiempo necesario hasta que queden blancas. Se elimina el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se añade azul tripán y se tiñe durante 5 a 10 minutos a 90°C

en baño maría. Al final se elimina el colorante. Las raíces se conservan en ácido láctico (50%).

Para la cuantificación de las raíces micorrizadas se sigue el método descrito por Giovanetti y Mosse (1980):

Los fragmentos de raíces teñidas se distribuyen al azar en una placa reticulada. Se observan bajo estereomicroscopio (x 40 aumentos) las intersecciones de las raíces con el retículo, distinguiendo las raíces micorrizadas de las que no están. El porcentaje de micorrización viene dado por el cociente entre los números de raíces micorrizadas y el número total de intersecciones observadas (un mínimo de 100).

## **2.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN SUELO**

Tras el periodo de crecimiento las plantas se recolectan y se toman las muestras de suelo. Las muestras de suelo se dividen en dos alícuotas. Una de ellas se tamiza a 2 mm y se almacena a 4°C para análisis biológicos y fisico-químicos, mientras que otra fracción del suelo se tamiza entre 0,25 y 4 mm para la determinación de la estabilidad estructural del suelo.

### **2.5.1. Propiedades físico-químicas y físicas del suelo**

#### ***pH***

Se obtiene un extracto acuoso en la relación sólido líquido 1:5 por agitación mecánica durante dos horas. Sobre este extracto se realiza la medida de pH utilizando un pH-metro Crison PH25.

#### ***Conductividad eléctrica***

El extracto obtenido para la medida del pH se centrifuga y, sobre él, se lee directamente la conductividad con un conductímetro Crison, modelo 522.

#### ***Estabilidad de agregados***

Determinación de los agregados estables del suelo al impacto de una lluvia artificial de energía conocida de acuerdo a Roldán et al. (1994b), basado en el método de Benito et al. (1986).

#### **Equipo de análisis**

Tamiz de 0,25 mm de malla y de 7,5 cm de diámetro.

Vasija cilíndrica transparente de 6,6 cm de diámetro interior, abierta por la parte superior y cuyo fondo tiene 11 orificios distribuidos regularmente, en los que se insertan puntas estándar de pipeta de 0,1 ml.

### **Procedimiento**

Se pesan 4 g de suelo tamizados entre 0,25 y 4 mm. Se extienden sobre un tamiz de 0,25 mm. Se humedecen los agregados mediante pulverización.

Pasados 10 minutos se someten los agregados a una lluvia de 150 ml de agua desionizada proveniente de una vasija cilíndrica con 11 orificios elevada un metro sobre el tamiz. La fracción de suelo que pasa por el tamiz se desprecia (porque no son agregados estables). El suelo que queda en el tamiz se pasa, mediante chorro de agua desionizada, a una cápsula previamente tarada (T). Se seca en estufa a 105°C, se deja enfriar y se pesa ( $P_1$ ). A continuación el contenido de la cápsula se humedece y se deja dos horas. Los agregados de la cápsula se vuelven a pasar por el tamiz de 0,25 mm, esta vez ayudándose de una varilla y chorro de agua. Las partículas orgánicas y de arena que quedan sobre el tamiz, se colocan de nuevo en la cápsula se secan y se pesan ( $P_2$ ). El porcentaje de agregados estables a la lluvia respecto a los agregados totales de la fracción del suelo de 0,25–4 mm. El porcentaje de agregados estables a la lluvia se calcula de la siguiente manera:

$$\% E.A. = \frac{P_1 - P_2}{4 - P_2 + T} \cdot 100$$

### **Análisis granulométrico**

Tras una adecuada dispersión de la tierra fina, se utiliza para ello hexametáfosfato sódico, se determinan, combinando la extracción con la pipeta de Robinson y la tamización, los porcentajes de arcilla (<2  $\mu\text{m}$ ), limo fino (2-20  $\mu\text{m}$ ), limo grueso (20-50  $\mu\text{m}$ ) y la fracción de arena de 50-2000  $\mu\text{m}$ . A partir del porcentaje de arcilla, limo y arena obtenidos tras el análisis granulométrico y del triángulo de texturas propuesto por la Guía de descripción de suelos de la FAO (2006) es posible determinar la clase textural.

### **Potencial hídrico del suelo**

La determinación del potencial hídrico del suelo se calculó según el método de la membrana a presión de Richards (1941) para el rango pF entre 2,5 y 4,2. El

contenido hídrico se determinó por el método gravimétrico (110 °C, 24 h). Los datos del potencial hídrico se estimaron a partir de la curva de retención de humedad del suelo.

### ***Simulación de lluvias***

Se realizaron mediciones con lluvia simulada en parcelas de 1 m<sup>2</sup> para determinar la generación de escorrentía y el transporte de sedimentos bajo lluvia intensas con periodos de recurrencia de 5 años. El simulador de lluvia utilizado para las parcelas de 1 m<sup>2</sup> está basado en las boquillas Hardi-1553-12, con tres unidades funcionando al mismo tiempo desde 2 metros de altura. La intensidad de la lluvia simulada alcanzó los 55 mm durante una hora y se aplicó sobre una superficie de 1 m<sup>2</sup>, de los cuales una subparcela de forma circular de 0,25 m<sup>2</sup> quedó como zona de medición de la escorrentía y pérdida de suelo. Las tres boquillas funcionando al mismo tiempo, con agua destilada, presentaron un coeficiente de Christiansen de 85,7% bajo condiciones de laboratorio. El tamaño medio de las gotas fue de 2,68 mm con una velocidad de caída de 3,78 m s<sup>-1</sup> y una energía cinética de 9,34 J m<sup>-2</sup> mm<sup>-1</sup> con una presión de 1,75 Kg cm<sup>-2</sup>. Las parcelas se delimitaron con láminas metálicas de hierro galvanizado, y las escorrentías se recogieron en un colector de PVC de 800 mm de largo, 150 mm de ancho y 100 mm de profundidad. Se aplicaron lluvias simuladas de 1 hora de duración. Las escorrentías se midieron cada minuto, y las muestras tomadas (1 cada 5 minutos) se desecaron para determinar la concentración de sedimentos.

## **2.5.2. Propiedades químicas del suelo**

### ***Carbono orgánico total***

El contenido de carbono orgánico total en el servicio de ionómica del CEBAS-CSIC con un analizador elemental CHN modelo LECO TruSpec una vez tamizadas y molidas las muestras de suelo en mortero de ágata.

### ***Carbono hidrosoluble***

El carbono orgánico hidrosoluble se determinó en el extracto acuoso (1:5, p:v), mediante analizador de carbono para muestras líquidas Shimadzu TOC-5050A.

### **Carbohidratos hidrosolubles**

La determinación del contenido de carbohidratos hidrosolubles en el extracto acuoso (1:5, p:v) se realizó según el método de Brink *et al.* (1960).

#### **Reactivos**

Reactivo de antrona (0,2% en ácido sulfúrico 96%)

#### **Procedimiento**

A 1 ml del extracto acuoso se le añaden 4 ml del reactivo de antrona, se agita y se calienta en baño maría durante 10 minutos a 80°C. Después se enfría en hielo y se lee en espectrofotómetro a 630 nm. Se realiza una recta de calibrado utilizando distintas concentraciones de glucosa.

### **Carbonatos totales**

Medida del volumen de CO<sub>2</sub> desprendido por acción del ácido clorhídrico sobre la muestra en el calcímetro de Bernard (Guitian y Carballas, 1976).

#### **Reactivos**

Ácido clorhídrico 1:1

Carbonato cálcico

#### **Procedimiento**

Se calibra el calcímetro en relación a las condiciones ambientales, mediante la medida de CO<sub>2</sub> desprendido por un peso conocido de carbonato cálcico puro tratado con HCl. A partir de ese volumen se calcula el peso de suelo que es necesario poner en el matraz de reacción del calcímetro, de forma que la medida de CO<sub>2</sub> desprendido represente el % de CaCO<sub>3</sub> en el suelo.

## **2.5.3. Concentración de nutrientes**

### **Nitrógeno total**

El nitrógeno total del suelo se analizó en el servicio de ionómica del CEBAS-CSIC con un analizador elemental CHN modelo LECO TruSpec, una vez molidas las muestras de suelo.

### **Fósforo asimilable**

Se realiza mediante una medida espectrofotométrica según el método de Olsen *et al.* (1954).

### **Reactivos**

Carbón activo

Bicarbonato sódico 0,5 M a pH 8,5

Ácido sulfúrico 5 N

Molibdato amónico

Tartrato de antimonio III

Ácido ascórbico

Reactivo A: 12 g de Molibdato amónico en 250 ml de agua desionizada y a su vez 0,2908 g tartrato de antimonio III disuelto en 100 ml de agua desionizada.

Ambos se agregan a 1000 ml de ácido sulfúrico 5 N y se lleva todo a 2 L.

Reactivo B: Se disuelven 1,056 g de ácido ascórbico en 200 ml del reactivo A.

### **Procedimiento**

Se colocan en un frasco 5 g de suelo, 1 g de carbón activo y 100 ml de bicarbonato sódico 0,5 M a pH 8,5. A continuación, se agita mecánicamente durante media hora y se filtra (papel Whatman nº 40). Se toman 10 ml del filtrado y se llevan a un vaso de 25 ml. Se ajusta el pH a 5,0 mediante ácido sulfúrico 1,5 M en un valorador automático (Metrohm, SM Titrino). El contenido del vaso se pasa a un matraz de 50 ml, se añaden 8 ml de ácido ascórbico y se enrasa a 50 ml. Después de un reposo de 15 minutos se mide en espectrofotómetro a 880 nm. Paralelamente se realiza una curva patrón desde un patrón de fósforo de 100 mg l<sup>-1</sup>.

### ***Potasio asimilable.***

El potasio asimilable se extrajo por agitación mecánica, con una disolución de acetato de amonio 1 N a pH 7 (Knudsen y col., 1982) y posteriormente, se analiza por espectroscopía de plasma en un ICP-OES.

### **Reactivos**

Acido clorhídrico 1:1.

Acetato de amonio 1 N pH 7.

### **Procedimiento**

Se pesa, con precisión de 1 mg, 2 g de suelo seco al aire y tamizado a 2 mm, se introduce en un bote de plástico resistente de 50 mL. Se añaden 20 mL de disolución extractora de acetato de amonio 1 N y se agita durante treinta

minutos en un agitador rotativo. A continuación se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos y se filtra usando doble filtro.

#### **2.5.4. Propiedades biológicas**

##### **Carbono de la biomasa microbiana**

La biomasa microbiana se determina con el método de la fumigación-extracción con cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) según Vance *et al.* (1987).

##### **Reactivos**

Cloroformo lavado

Sulfato potásico 0,5 M

##### **Procedimiento**

10 g de suelo tamizado y humedecido al 60 % de su capacidad de retención hídrica se colocan en matraces Erlenmeyer de 150 cm<sup>3</sup> y se guardan en la oscuridad 24 horas, al cabo de las cuales se añaden 0,5 ml de cloroformo lavado y se mantienen cerrados durante 30 minutos. Seguidamente añadimos 40 ml de sulfato potásico 0,5 M y agitamos mecánicamente durante 1 hora. Centrifugamos a 10000 r.p.m. durante 10 minutos y filtramos. Paralelamente se preparan también controles sin cloroformo. Al extracto obtenido de las muestras, le pasamos gas de N<sub>2</sub> para eliminar el cloroformo y sobre dicho extracto se mide el carbono en un analizador de carbono para muestras líquidas Shimadzu TOC-5050A. Mediante el contenido del carbono del extracto medido se puede calcular el carbono de la biomasa:

$$C_{\text{biomasa}} = C_{\text{extracto}} \times 2,66$$

##### **Respiración Basal**

La respiración basal del suelo se midió con un respirómetro (Micro-Oxymax, Columbus, OH, USA)

##### **Actividad deshidrogenasa**

Se utiliza el método de Garcia *et al.* (1997). En presencia de INT como aceptor de electrones, se produce la formación de la correspondiente sal de formazano.

##### **Reactivos**

INT (Cloruro de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil 5-fenil tetrazolio) 0,4 %

N,N-dimetilformamida

Metanol

Iodonitrofenil formazano (INTF)

### **Procedimiento**

A 1 g de muestra se le añade 0,2 ml de INT (0,4 % p:v) y agua desionizada hasta alcanzar 60 % de su capacidad de retención hídrica. Paralelamente se preparan controles sin INT echándoles solamente agua desionizada. A continuación se deja en oscuridad, a 20 °C durante 20 horas. Se adicionan 10 ml de metanol y se agita vigorosamente en un agitador vortex durante 1 minuto. Después se filtra (Papel Whatman nº 40). El extracto se lee en espectrofotómetro a 490 nm, y se expresa como mg INTF g<sup>-1</sup> suelo. La recta patrón se realiza con INTF en distintas concentraciones.

### **Actividad ureasa**

La actividad ureasa se determina según Nannipieri *et al.* (1980).

### **Reactivos**

Urea 6,4 %

Tampón fosfato 0,1 M pH 7,0

Citrato sódico 0,3 M

Nitroprusiato sódico (1 g en 100 ml agua)

Reactivo A: 15,62 g salicilato sódico más 4 ml de nitroprusiato sódico enrasado a 200 ml con agua desionizada.

Reactivo B: 0,5 g dicloroisocianomurato de sodio más 4 g NaOH en 100 ml de agua desionizada.

### **Procedimiento**

A 0,5 g de suelo se le añaden 2 ml de tampón fosfato 0,1 M y 0,5 ml de disolución de urea 6,4 %. Para cada muestra se prepara un control al que no se añade urea. Se incuba en baño de agua con agitación a 30°C durante 1,5 horas, llevando a continuación el volumen hasta 10 ml con agua desionizada. Se centrifuga a 3400 r.p.m. durante 8 minutos. Luego se toma 1 ml del sobrenadante y se lleva a un volumen de 10 ml con 5,8 ml de H<sub>2</sub>O, 0,8 ml de citrato sódico, 1,6 ml de la mezcla A y 0,8 ml de la mezcla B. A continuación se guarda en oscuridad durante 45 minutos. La lectura se realiza en el espectrofotómetro a 660 nm.

**Actividad proteasa-BAA**

Determinación de la actividad proteasa hidrolizante de la N- $\alpha$ -benzoil-L-argininamida (BAA) por fundamento análogo al de la actividad ureásica (Nannipieri *et al.*, 1980).

**Reactivos**

N- $\alpha$ -benzoil-L-argininamida (BAA) 0,03 M

Tampón fosfato 0,1 M pH 7,0

Citrato sódico 0,3 M

Nitroprusiato sódico (1 g en 100 ml agua)

Reactivo A: 15,62 g Salicilato sódico más 4 ml de nitroprusiato sódico enrasado a 200 ml con agua desionizada.

Reactivo B: 0,5 g dicloroisocianomurato de sodio más 4 g NaOH en 100 ml de agua desionizada.

**Procedimiento**

A 0,5 g de suelo se le añaden 2 ml de tampón fosfato 0,1 M y 0,5 ml de BAA 0,03 M. Para cada muestra se prepara un control al que no se añade sustrato. Se incuba en baño de agua con agitación a 40°C durante 1,5 horas, llevando a continuación el volumen hasta 10 ml con agua desionizada. La técnica sigue igual que la descrita en el apartado anterior.

**Actividad fosfatasa ácida**

Utilización del método descrito por Tabatabai y Bremer (1969), basado en la determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado cuando se incuba el suelo a 37 °C con el sustrato artificial p-nitrofenil-fosfato (PNF). El método colorimétrico para medir el p-nitrofenol liberado se basa en el hecho de que las disoluciones de este compuesto tienen color amarillo (García *et al.*, 2003).

**Reactivos**

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

Disolución tampón MUB-HCl pH 6,5: tomar 200 ml de la disolución stock y llevar hasta pH 6,5 con HCl.

P-nitrofenil fosfato (PNF) 0,025 M.

P-nitrofenol: 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**

A 0,5 g de muestra de suelo se le añaden 0,5 ml de sustrato p-nitrofenil fosfato 0,025 M y 2 ml de tampón MUB pH 6,5. Paralelamente se prepara para cada muestra un control con 0,5 g de suelo y 2 ml de tampón MUB-HCl pH 6,5. Además, se prepara un blanco con 0,5 ml de sustrato y 2 ml de tampón MUB pH 6,5. Muestra, control y blanco, se incuban en baño termostático con agitación a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Terminado este período se añaden 0,5 ml de sustrato a los controles.

A continuación, todos los tubos se enfrían a  $4^\circ\text{C}$  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  $\text{CaCl}_2$  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 r.p.m. durante 10 minutos. 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.

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

Utilización del método descrito por Tabatabai (1982), 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 .

### **Reactivos**

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

Disolución Tampón MUB-HCl pH 6,5, igual que para la determinación de la actividad fosfatasa.

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

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

CaCl<sub>2</sub> 0,5 M.

Tampón tris-hidroximetil-aminometano (THAM) 0,1 M pH 12: Disolver 12,2 g de THAM en 800 ml de agua desionizada, ajustar el pH con NaOH 0,5 M y enrasar a 1000 ml con agua desionizada.

### **Procedimiento**

A 0,5 g de muestra de suelo se le añaden 0,5 ml de sustrato PNG (p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido) 0,025 M y 2 ml de tampón MUB-HCl de pH 6,5. 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.

A continuación, 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 CaCl<sub>2</sub> 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 r.p.m. durante 10 minutos. 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 CaCl<sub>2</sub> 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 alcalinizar la disolución del producto de reacción obtenido dándole color amarillo.

### ***Glomalina fácilmente extraíble***

Se determina la fracción de glomalina fácilmente extraíble por el método de Wright y Upadhyaya (1996).

### **Reactivos**

Patrón citrato 20 mM pH 7,0

Albúmina de suero bovino

Azul Coomassie G (Bio-Rad Protein Assay)

### **Procedimiento**

A 0,25 g de suelo se le adicionan 2 ml de solución citrato 20 mM pH 7,0 y se autoclava a 121°C durante 30 minutos, luego se centrifuga a 3000 r.p.m.

durante 15 minutos y en el sobrenadante se determina el contenido de proteínas por el método Bradford (1976) usando albúmina como estándar.

Se tomaron volúmenes de 20-100  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras y se mezcló con 200  $\mu\text{l}$  del reactivo Azul Coomassie G preparado previamente (Sandalio, 1987), y agua destilada hasta completar el volumen de 1 ml. La densidad óptica se midió a 595 nm.

Se empleó albúmina de suero bovino como patrón de calibración en un rango de concentraciones de 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{g}$  a partir de una disolución madre de albúmina de suero bovino de 1  $\text{mg ml}^{-1}$ .

### **2.5.5. Análisis estadísticos**

Para los análisis de la varianza de aquellas variables que presentan distribución log normal o heterogeneidad de varianzas se emplean datos transformados logarítmicamente. Para los datos de porcentaje de agregados estables y de micorrización se utiliza la transformación arcseno. Las comparaciones entre las medias de los diferentes tratamientos se realizaron mediante la prueba de Tukey con  $P < 0,05$ . El programa estadístico que se utiliza es SPSS 18.0 para Windows. Otros análisis estadísticos realizados de forma puntual se exponen para cada caso particular en los capítulos correspondientes.





**Efecto de los hongos micorrícicos arbusculares  
y enmiendas orgánicas en la formación de  
agregados estables en el suelo rizosférico de  
*Juniperus oxycedrus***



## RESUMEN

Se estudiaron los efectos de la inoculación con un hongo micorrícico arbuscular (MA) (*Glomus intraradices* Schenck y Smith) o con una mezcla de tres hongos MA (*G. intraradices*, *G. deserticola* (Trappe, Bloss. y Menge) y *G. mosseae* (Nicol y Gerd.) Gerd. y Trappe; y la adición de dos residuos: compost de lodo de depuradora y residuo de alperujo seco tratado con *Aspergillus niger* (DOC), sobre la estabilización de los agregados en la rizosfera de *Juniperus oxycedrus*, así como la influencia de las mejoras estructurales producidas sobre el establecimiento de las plantas. Seis meses después de la plantación, la inoculación con la mezcla de tres hongos MA y la combinación de *G. intraradices* con las dos enmiendas orgánicas había mejorado significativamente la estabilidad estructural del suelo. Los valores de carbono hidrosoluble y de carbohidratos se incrementaron sólo con la adición de los lodos de depuradora compostados o el residuo DOC fermentado. La adición de las dos enmiendas orgánicas, especialmente el DOC fermentado, disminuyó significativamente las actividades de las enzimas deshidrogenasa, ureasa, proteasa y  $\beta$ -glucosidasa. En el suelo rizosférico con los tratamientos con inoculación micorrícica, las actividades deshidrogenasa y  $\beta$ -glucosidasa fueron más altas que en el suelo control. Tanto la adición de enmiendas orgánicas como los tratamientos de inoculación micorrícica incrementaron significativamente la biomasa aérea de *J. oxycedrus*. Los tratamientos de inoculación fueron más eficaces para incrementar la biomasa aérea de las plantas que la adición de las enmiendas orgánicas, y no hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos de micorrización (en promedio, alrededor del 53 % de incremento con respecto a las plantas control y alrededor de un 18% superior con respecto a las plantas cultivadas en los suelos enmendados).

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Los programas de revegetación basados en la plantación de arbustos podrían ayudar a la conservación de la biodiversidad en áreas degradadas del Mediterráneo, y contribuir a la prevención de los procesos de erosión y desertificación en las zonas áridas y semiáridas (Caravaca et al., 2003b). La cubierta vegetal ayuda a evitar la pérdida de suelo, junto con la mejora de las propiedades físicas de éste. La mejora de la calidad del suelo debe ser un paso esencial en el establecimiento de la vegetación. Un método para revertir la degradación de la calidad del suelo es la adición de materiales ricos en carbono (Roldán et al., 1996; Nicolás et al., 2014). La utilización agronómica de residuos agroalimentarios de naturaleza lignocelulósica, como el alperujo (DOC), residuo procedente de la extracción de aceite de oliva, y de residuos orgánicos urbanos, tales como lodos de aguas residuales, ha aumentado considerablemente en los últimos años como una fuente de materia orgánica alternativa, y como un método aceptable para la eliminación de residuos (Alguacil et al., 2004; Albuquerque et al., 2006; Medina y Azcón, 2010; Karami et al., 2012). Sin embargo, se ha comprobado que el uso de DOC tiene un efecto perjudicial sobre la germinación de las semillas, el crecimiento de las plantas y la actividad microbiana (Martín et al., 2002; Albuquerque et al., 2006, 2009). De hecho, varios estudios han puesto de manifiesto la fitotoxicidad y efectos antimicrobianos de algunos residuos de almazara, debido a su alto contenido en ácidos fenólicos, ácidos orgánicos y ácidos grasos (Martín et al., 2002; Linares et al., 2003). Los esfuerzos para disminuir el impacto medioambiental de los desechos de almazara incluyen la fermentación biológica con hongos filamentosos, tales como *Aspergillus niger* (Vassilev et al., 1995) o afilofores (Linares et al., 2003). Tales sistemas biológicos, con la participación de residuos agroindustriales y microorganismos, se han utilizado para la solubilización del fosfato de roca (RP) mejorando el crecimiento y nutrición de las plantas en suelos agrícolas (Vassilev et al., 1996; Vassilev y Vassileva, 2003; Albuquerque et al., 2006; Vassilev et al., 2006).

Hay una evidencia creciente de que los parámetros biológicos y bioquímicos del suelo pueden tener un papel potencial como indicadores tempranos y

sensibles de la degradación y de la calidad del suelo, así como de la recuperación ecológica de ecosistemas (García et al., 2000). En particular, las actividades enzimáticas son especialmente significativas debido a su importante contribución a la capacidad del suelo para degradar materia orgánica. Se han realizado varias investigaciones sobre los efectos de los lodos de depuradora sobre los microorganismos del suelo. Entre los elementos potencialmente adversos asociados con la aplicación de los lodos de depuradora se incluyen los metales pesados y xenobióticos, cuya presencia en cantidades elevadas afecta gravemente a la biomasa microbiana del suelo. En respuesta a las enmiendas de lodos de aguas residuales, se han descrito tanto aumentos (Fließbach et al., 1994) como descensos (Chander y Brookes, 1993) en la actividad microbiológica del suelo, así como una falta de efecto (Johansson et al., 1999).

La inoculación con microorganismos simbióticos, especialmente hongos micorrícicos arbusculares (MA), es un método eficaz para mejorar tanto la capacidad de las plantas huésped para establecerse y hacer frente a situaciones de estrés, como la deficiencia de nutrientes, la sequía y la alteración del suelo. De hecho, varios autores han indicado que los hongos MA pueden mejorar el rendimiento de las plantas, mediante la estimulación de la absorción de agua (Auge, 2001) o el aumento de la absorción de nutrientes por la planta, particularmente nitrógeno y fósforo (Jeffries et al., 2003; Smith y Read, 2008; Barea et al., 2011), o por la mejora de la agregación en suelos erosionados (Caravaca et al., 2002b; Leifheit et al., 2014). Estudios recientes han indicado que los hongos MA producen glomalina; esta proteína ayuda a estabilizar los agregados del suelo (Wright y Anderson, 2000; Bedini et al., 2009; Spohn y Giani, 2010). Por lo tanto, los hongos MA son componentes esenciales de los ecosistemas, tanto para la revegetación de zonas degradadas como para el mantenimiento de la estructura del suelo, reduciendo así los riesgos de erosión y desertificación. Sin embargo, no hay datos sobre los efectos e interacciones del residuo DOC o los lodos de depuradora en la simbiosis micorrícica o sobre las propiedades del suelo, fundamentalmente su estructura, en los programas de revegetación.

Los objetivos de este estudio fueron: (1) determinar la influencia de la inoculación micorrícica, con un hongo MA o con una mezcla de tres hongos

MA, y la adición de lodos de depuradora compostados o residuo DOC tratado con *Aspergillus niger* sobre la estabilización de los agregados del suelo rizosférico de *Juniperus oxycedrus* L., así como determinar las relaciones entre los cambios físicos, las variaciones bioquímicas y microbiológicas inducidas por estos tratamientos y (2) evaluar la influencia de tales mejoras en el establecimiento de las plantas de *J. oxycedrus*.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Selección de la planta huésped y los inóculos micorrícicos

La planta utilizada para el experimento fue *Juniperus oxycedrus* L., es un árbol de crecimiento lento que alcanza una altura de 3 a 4 metros, aunque a menudo crece como un arbusto. Este arbusto tiene una distribución típica en el Mediterráneo y está bien adaptado a las condiciones de sequía, ya que puede prosperar con una precipitación media anual de menos de 230 mm y un período de sequía estival que puede extenderse por 4 meses (Amaral Franco, 1964). Sin embargo, el conocimiento de las estrategias de revegetación que involucran a *J. oxycedrus* es todavía muy limitado.

Los hongos micorrícicos utilizados en el experimento, *Glomus intraradices* Schenck y Smith, *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss . y Menge) y *Glomus mosseae* (Nicol y Gerd.) Gerd. y Trappe, . La nomenclatura botánica actual reconoce estas denominaciones como sinónimos, sin embargo se ha preferido mantener la nomenclatura que coincide con los registros de la colección de procedencia.

El inóculo micorrícico consistió en una mezcla de suelo rizosférico procedente de un cultivo trampa (*Sorghum* sp.) que contiene esporas, hifas y fragmentos de raíces micorrizadas (un promedio de 30 esporas g<sup>-1</sup> y raíces con un 75 % de colonización MA). Una vez germinadas, las plantas de *J. oxycedrus* fueron trasplantadas en un sustrato de crecimiento, formado por turba y fibra de coco (1:1, v/v) en envases de 120 ml. El correspondiente inóculo de micorrizas arbusculares se aplicó a razón del 5 % (v/v). Se añadió la misma cantidad de inóculo autoclavado a las plantas control, acompañados con un filtrado (< 20 μm) del mismo, para proporcionar las poblaciones microbianas que acompañan a los hongos micorrícicos. Plantas inoculadas y no inoculadas se cultivaron

durante 8 meses en condiciones de vivero sin ningún tratamiento de fertilización.

### 3.2.2. Suelo experimental

Se utilizó un suelo agrícola, dedicado al cultivo de cítricos cerca de Murcia (SE España). El clima es mediterráneo semiárido, con una precipitación media anual de 300 mm, una temperatura media anual de 19.2 °C y una evapotranspiración potencial anual de 1.000 mm.

Las principales características del suelo agrícola utilizado fueron: pH (1:5) 8,89; conductividad eléctrica 0,18 dS m<sup>-1</sup>, COT 1,80 %; N total 2,01 g kg<sup>-1</sup>; P asimilable 70 µg g<sup>-1</sup>; K extraíble 440 µg g<sup>-1</sup>; capacidad de intercambio catiónico 15 cmol kg<sup>-1</sup>.

### 3.2.3. Materiales

El lodo procedía de una planta de tratamiento de aguas residuales en Murcia. El lodo de depuradora mezclado con virutas de madera (1:1, v:v) se compostó siguiendo una modificación del sistema Indore, tal y como se detalla en el capítulo de “Materiales y Métodos”. Las características analíticas del lodo de depuradora compostado, determinadas por métodos estándar (Page et al., 1982), se muestran en el capítulo de “Materiales y Métodos” (Tabla 4).

El alperujo (DOC), un material lignocelulósico procedente de una almazara situada en Granada, se secó a 60° C en un horno y después se molió en fragmentos de 2 mm. El residuo de alperujo se sometió a un proceso de fermentación estática con *A. niger*, en presencia de fosfato de roca, de acuerdo a la biotecnología descrita en “Materiales y Métodos”. Las características del DOC después de la fermentación fueron: pH 4,0; conductividad eléctrica (1:10), 1.231 µS cm<sup>-1</sup>, P total, 0,38 %; N total, 0,62 %; C orgánico total 22,2 % y C hidrosoluble 1.146 µg g<sup>-1</sup>.

### 3.2.4. Diseño y factores experimentales

El experimento fue un ensayo en mesocosmos, cuyo diseño experimental correspondió a un factorial completamente al azar con dos factores. El primer factor tuvo tres niveles: adición o no de lodo de depuradora compostado o residuo fermentado DOC al suelo, y el segundo factor tuvo otros tres niveles: la

inoculación y no inoculación de las plantas de *J. oxycedrus*, ya sea con *G. intraradices* o con una mezcla de *G. intraradices*, *G. mosseae* y *G. deserticola*. Se establecieron cinco repeticiones por tratamiento, resultando un total de 45 mesocosmos.

En cada mesocosmos se utilizaron 400 gramos de suelo depositados en macetas de 600 ml. En febrero de 2012, las enmiendas (lodo de depuradora compostado o residuo DOC fermentado) se mezclaron manualmente con el suelo experimental en una proporción del 5 % (p/p). Las plantas de *J. oxycedrus* (inoculadas y no inoculadas) se trasplantaron en los mesocosmos (una por maceta). El experimento se llevó a cabo en el vivero de la Universidad de Murcia, sin ningún tratamiento de fertilización. Las plantas crecieron al aire libre y estuvieron bien regadas. Transcurridos seis meses desde la plantación, las plantas fueron cosechadas, tomándose muestras de suelo de las macetas. Las muestras de suelo se dividieron en dos submuestras. Una de ellas fue tamizada a 2 mm y almacenada a 2° C para determinaciones microbiológicas y la otra se secó al aire a temperatura ambiente. Una alícuota de esta submuestra se tamizó a 2 mm para el análisis físico-químico y químico del suelo, mientras otra alícuota se tamizó de 0,25 a 4 mm para determinar la estabilidad de agregados.

### 3.2.5. *Análisis de parámetros en planta*

Se registraron datos de la biomasa fresca y seca (65° C, 24h) de parte aérea y radicular. El porcentaje de colonización por hongos micorrícicos arbusculares fue calculado por el método de intersección de cuadrícula (Giovannetti y Mosse, 1980), descrito en el apartado de “Materiales y Métodos”.

### 3.2.6. *Análisis físico-químico, físico, químico y bioquímico del suelo*

El pH del suelo y la conductividad eléctrica se midieron en una solución acuosa 1:5 (p/v). En el mismo extracto acuoso del suelo se determinó el carbono hidrosoluble en un analizador de carbono para muestras líquidas Shimadzu TOC- 5050A. Los carbohidratos hidrosolubles se determinaron por el método de Brink et al. (1960). La estabilidad de los agregados estables al impacto de una lluvia artificial de energía conocida se determinó siguiendo el método descrito por Roldán et al. (1994b).

La actividad deshidrogenasa se midió mediante el método propuesto por García et al. (1997). Las actividades ureasa y proteasa se determinaron de acuerdo a la metodología de Nannipieri et al. (1980). La actividad  $\beta$ -glucosidasa se determinó usando el método descrito por Tabatabai (1982).

Todas las determinaciones enunciadas se llevaron a cabo según las metodologías descritas en el apartado de “Materiales y Métodos”.

### 3.2.7. Análisis estadístico

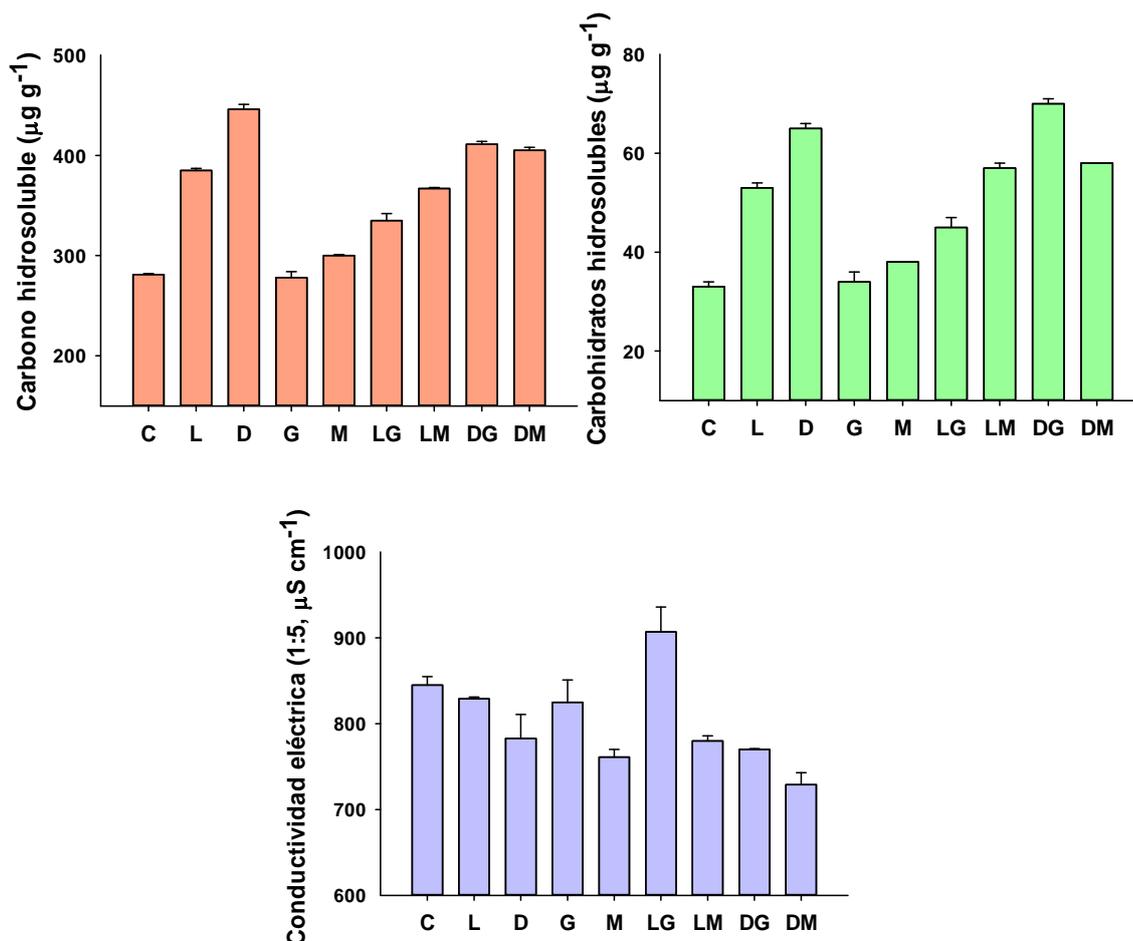
Los datos se transformaron logarítmicamente para ajustarlos a la normalidad. Para los datos de porcentaje de agregados estables y colonización micorrícica se utilizó la transformación arcsen. Los efectos de la adición de los residuos de lodo de depuradora y DOC, la inoculación con hongos micorrícicos, y sus interacciones, fueron determinados mediante un análisis de la varianza de dos vías, y las comparaciones entre las medias se realizaron mediante el test de Tukey calculado para  $P < 0,05$ . Los procedimientos estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 18.0 para Windows.

## 3.3. RESULTADOS

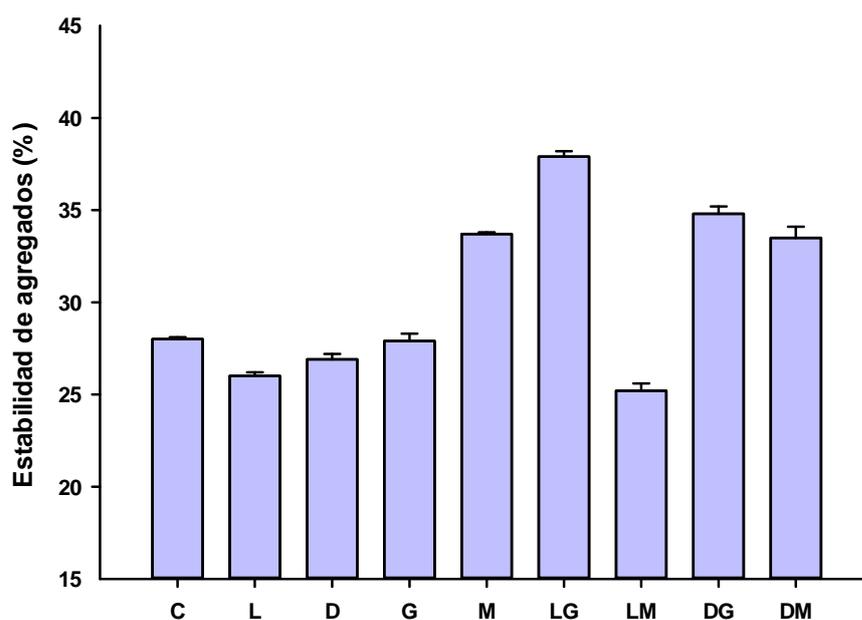
### 3.3.1. Propiedades físico-químicas y fracciones lábiles de C

Ninguno de los tratamientos ensayados ni su interacción tuvieron un efecto significativo sobre la conductividad eléctrica del suelo (Tabla 1).

Los valores de carbono y carbohidratos hidrosolubles se incrementaron sólo con la adición del lodo de depuradora compostado o el residuo DOC fermentado (Tabla 1 y Figura 1), los mayores incrementos se observaron en la fracción de carbohidratos hidrosolubles (aproximadamente 61 y 97 % respectivamente mayor que en el suelo no enmendado). La adición del residuo DOC fermentado fue más eficaz para aumentar ambas fracciones lábiles de carbono. La inoculación con la mezcla de tres hongos MA y la combinación de *G. intraradices* con ambas enmiendas orgánicas mejoraron de forma significativa la estabilidad estructural del suelo de la rizosfera de *J. oxycedrus* (Figura 2). El mayor incremento se registró en el tratamiento que combinó la inoculación micorrícica con *G. intraradices* y la adición del lodo compostado (aproximadamente un 35 % mayor, en comparación con el suelo control).



**Figura 1.** Efecto de la adición de los enmendantes orgánicos y los distintos tratamientos de inoculación micorrícica sobre la conductividad eléctrica y fracciones lábiles de carbono orgánico en la rizosfera de *J. oxycedrus*, seis meses después de la plantación (n=5). C= control; L= adición de lodo de depuradora compostado; D= adición de DOC fermentado; G= inoculación con *G. intraradices*; M= inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; LG= adición de lodo de depuradora compostado e inoculación con *G. intraradices*; LM= adición de lodo de depuradora compostado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; DG= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. intraradices*; DM= adición de DOC fermentado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos. Media (error estándar).



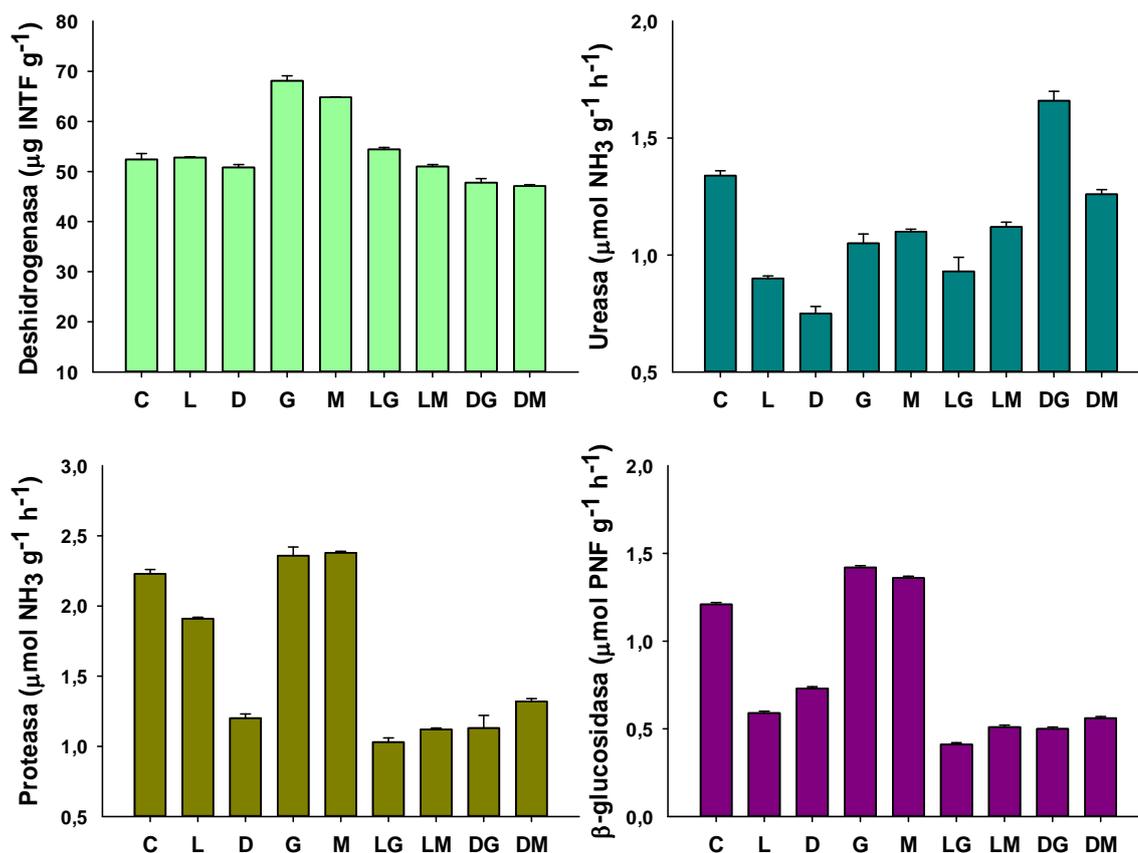
**Figura 2.** Efecto de la adición de los enmendantes orgánicos y los distintos tratamientos de inoculación micorrícica sobre la estabilidad de agregados en la rizosfera de *J. oxycedrus*, seis meses después de la plantación (n=5). C= control; L= adición de lodo de depuradora compostado; D= adición de DOC fermentado; G= inoculación con *G. intraradices*; M= inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; LG= adición de lodo de depuradora compostado e inoculación con *G. intraradices*; LM= adición de lodo de depuradora compostado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; DG= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. intraradices*; DM= adición de DOC fermentado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos. Media (error estándar).

**Tabla 1.** ANOVA de dos factores (adición de DOC fermentado y compost de lodo de depuradora e I= inoculación micorrícica) para todos los parámetros estudiados en la rizosfera de las plantas de *J. oxycedrus*. Valores de significación (*P*).

	Adición enmendante (E)	Inoculación micorrícica (I)	Interacción (E x I)
Deshidrogenasa	<0,001	<0,001	<0,001
Ureasa	0,015	0,286	<0,001
Proteasa	<0,001	0,083	0,010
$\beta$ -glucosidasa	<0,001	0,042	<0,001
C hidrosoluble	<0,001	0,256	0,062
Carbohidratos hidrosolubles	<0,001	0,868	0,420
Conductividad eléctrica	0,546	0,303	0,480
Estabilidad de agregados	0,828	0,001	0,187
Biomasa aérea	0,001	<0,001	0,029
Colonización	0,010	<0,001	0,846

### 3.3.2. Parámetros bioquímicos

El suelo rizosférico en los tratamientos con inoculación micorrícica registró una actividad deshidrogenasa y  $\beta$ -glucosidasa significativamente mayor, y una menor actividad de ureasa, que el suelo control, pero no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de micorrización (Figura 3). La adición del lodo de depuradora compostado o DOC fermentado, especialmente este último, disminuyó significativamente la actividad de las enzimas deshidrogenasa, ureasa, proteasa y  $\beta$ -glucosidasa. La interacción negativa entre las enmiendas y los tratamientos de inoculación micorrícica afectaron a las actividades deshidrogenasa, proteasa y  $\beta$ -glucosidasa en un grado muy significativo ( $P \leq 0,01$ ). Sin embargo, hubo una interacción positiva, con respecto al aumento de la actividad ureasa, entre los tratamientos de inoculación micorrícica y la adición del residuo DOC fermentado.



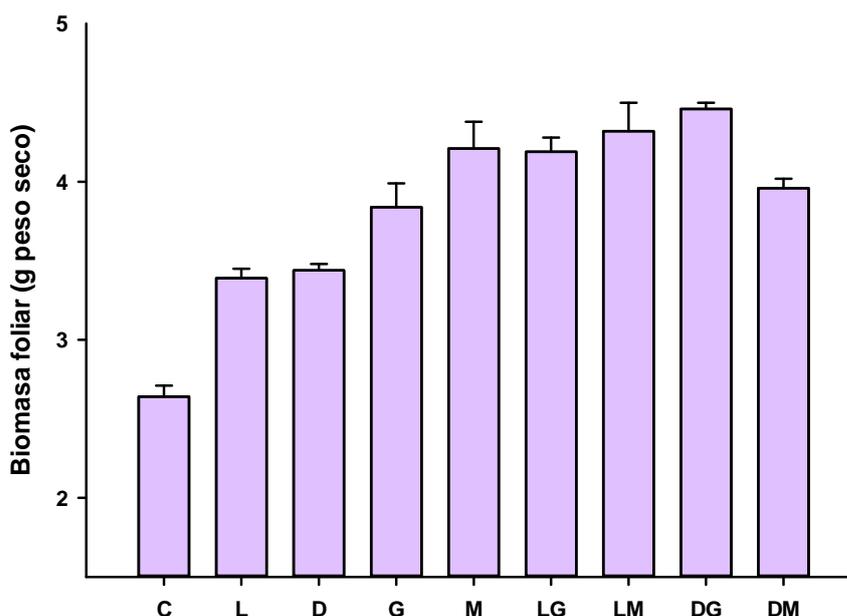
**Figura 3.** Efecto de la adición de los enmendantes orgánicos y los distintos tratamientos de inoculación micorrícica sobre las actividades enzimáticas en la rizosfera de *J. oxycedrus*, seis meses después de la plantación (n=5). C= control; L= adición de lodo de depuradora compostado; D= adición de DOC fermentado; G= inoculación con *G. intraradices*; M= inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; LG= adición de lodo de depuradora compostado e inoculación con *G. intraradices*; LM= adición de lodo de depuradora compostado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; DG= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. intraradices*; DM= adición de DOC fermentado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos. Media (error estándar).

### 3.3.3. Crecimiento y colonización micorrícica de *J. oxycedrus*

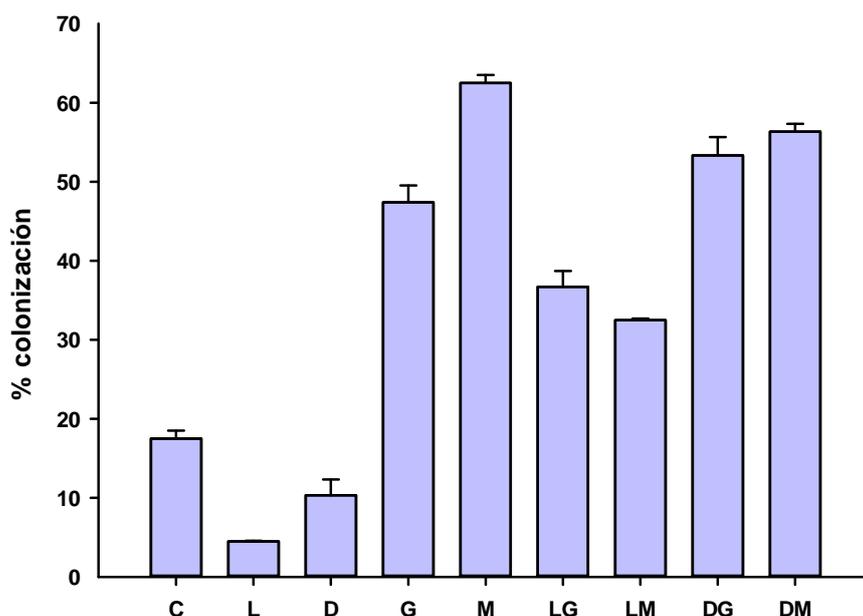
Seis meses después de la plantación, tanto la adición del lodo de depuradora compostado, como de la enmienda DOC fermentada y los tratamientos de inoculación micorrícica, habían aumentado significativamente el peso seco en la parte aérea de las plantas con respecto a las plantas control (Figura 4). Los tratamientos con inoculación micorrícica fueron más eficaces en lo que

respecta al incremento de la biomasa aérea que la adición de las enmiendas orgánicas solamente, y no hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos de micorrización (en promedio, alrededor de un 53 % superior con respecto al de las plantas control y alrededor de un 18 % más alto con respecto a las plantas cultivadas en el suelo enmendado). Los tratamientos combinados, que implicaron la inoculación micorrícica de las plantas con *G. intraradices* y la adición del lodo de depuradora compostado o DOC fermentado al suelo, aumentaron el crecimiento de las plantas en un grado superior a cada tratamiento aplicado por separado.

Las plantas de *J. oxycedrus* inoculadas tuvieron porcentajes de colonización en la raíz significativamente más altos que las plantas no inoculadas, en particular aquellas inoculadas con la mezcla de tres hongos MA (Figura 5). Los porcentajes de colonización de las raíces disminuyeron con la adición del lodo de depuradora compostado o DOC fermentado al suelo, alcanzando valores de 3,8 y 1,7 veces menor, respectivamente, que para las plantas control.



**Figura 4.** Efecto de la adición de los enmiendantes orgánicos y los distintos tratamientos de inoculación micorrícica sobre la biomasa aérea de *J. oxycedrus*, seis meses después de la plantación. C= control; S= adición de lodo de depuradora compostado; D= adición de DOC fermentado; G= inoculación con *G. intraradices*; M= inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; SG= adición de lodo de depuradora compostado e inoculación con *G. intraradices*; SM= adición de lodo de depuradora compostado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; DG= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. intraradices*; DM= adición de DOC fermentado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos. Las barras indican el error estándar de la media (n=5).



**Figura 5.** Efecto de la adición de los enmendantes orgánicos y los distintos tratamientos de inoculación micorrícica sobre el grado de micorrización de las raíces de *J. oxycedrus*, seis meses después de la plantación. C= control; S= adición de lodo de depuradora compostado; D= adición de DOC fermentado; G= inoculación con *G. intraradices*; M= inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; SG= adición de lodo de depuradora compostado e inoculación con *G. intraradices*; SM= adición de lodo de depuradora compostado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; DG= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. intraradices*; DM= adición de DOC fermentado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos. Las barras indican el error estándar de la media (n=5).

### 3.4. DISCUSIÓN

#### 3.4.1. Eficacia de los tratamientos de inoculación micorrícica con respecto a la estructura del suelo

La estructura del suelo determina en gran medida la calidad y fertilidad del mismo, la cual a su vez favorece la creación y viabilidad de una cubierta vegetal estable (Cerdá, 1998; Caravaca et al., 2003b). El presente estudio confirma la influencia de los tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos sobre la estabilidad de los agregados del suelo. Los tratamientos de inoculación micorrícica produjeron aumentos en la estabilidad de los

agregados, por si solos o en combinación con las dos enmiendas orgánicas. En particular, la inoculación con la mezcla de los tres hongos MA y la combinación de *G. intraradices* con ambas enmiendas orgánicas, mejoró de forma significativa la estabilidad estructural del suelo rizosférico de *J. oxycedrus*. La actividad biológica de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) juega un papel importante en la estructura del suelo y en la formación de agregados estables mediante diferentes mecanismos. Los hongos MA pueden favorecer la agregación del suelo debido al entrelazamiento de partículas del suelo por su propio micelio, así como mediante mecanismos bioquímicos tales como la exudación de biopolímeros cementantes, especialmente polisacáridos y glomalina (Wright y Anderson, 2000; Bearden y Petersen, 2000; Rillig y Mummey, 2006). Algunos autores describen que el efecto de unión de las hifas es de larga duración, que persiste por meses o años y es afectado por el manejo, mientras que el de los polisacáridos es transitorio, ya que se descomponen rápidamente por los microorganismos (Roldán et al., 1994b; Six et al., 2004). En nuestro trabajo, el porcentaje de colonización en la raíz de las plantas inoculadas con hongos MA fue significativamente mayor que en las plantas no inoculadas. La fracción de carbono hidrosoluble también es considerada como uno de los componentes lábiles clave de la materia orgánica responsables de la agregación del suelo (Puget et al., 1999). De hecho, las concentraciones de carbohidratos y carbono hidrosolubles fueron mayores en el suelo rizosférico de las plantas inoculadas con hongos MA y que crecieron en un suelo enmendado. El aumento de los niveles de agregados estables resultante de los tratamientos de inoculación con micorrizas, pueden atribuirse también a la mayor reactivación de las poblaciones microbianas en la rizosfera, y en particular a la proliferación del micelio fúngico (Roldán et al., 1994b; Jeffries y Barea, 2000). Esto se demuestra claramente en nuestro caso, ya que sólo los tratamientos de inoculación micorrícica aumentaron los niveles de la actividad deshidrogenasa, que está fuertemente relacionada con la actividad microbiana (Nannipieri, 1994). La actividad deshidrogenasa es un indicador de la actividad microbiológica global del suelo (Smith y Pugh, 1979; García et al., 1997; Quilchano et al., 2002), puesto que todos los sistemas deshidrogenasas son parte integral del metabolismo microbiano. La reactivación de las poblaciones microbianas dependió del tratamiento de inoculación micorrícica.

El inóculo con *G. intraradices* fue el más eficaz para el aumento de la actividad deshidrogenasa (aproximadamente un 30 % con respecto al control). También se reveló un incremento de la actividad biológica, por las variaciones en las actividades de hidrolasas tales como proteasa BAA y  $\beta$ -glucosidasa. La medición de estas hidrolasas proporciona una indicación temprana de los cambios en la fertilidad del suelo, ya que están relacionados con la mineralización de nutrientes importantes tales como nitrógeno y carbono (Alguacil et al., 2005). Las actividades enzimáticas también son lo suficientemente sensibles para indicar las perturbaciones causadas por la inoculación microbiana (Naseby y Lynch, 1997; Burns et al., 2013). Los aumentos observados en las actividades de las enzimas proteasa-BAA y  $\beta$ -glucosidasa pueden estar relacionados principalmente con la estimulación de las poblaciones microbianas en la rizosfera como consecuencia de los tratamientos de inoculación, ya que no existen evidencias en cuanto a la secreción de estas enzimas por los hongos MA.

#### *3.4.2. Efectividad de las enmiendas orgánicas con respecto a la estructura del suelo*

Los resultados de este estudio demuestran la eficacia limitada de la adición del lodo de depuradora compostado o el residuo DOC fermentado con respecto a la mejora de la estabilidad estructural del suelo. Hubo un aumento significativo en las fracciones lábiles del carbono, como el carbono y carbohidratos hidrosolubles, después de la adición de las enmiendas orgánicas al suelo, pero sólo los que tienen un origen microbiano parecen desempeñar un papel principal en la formación y estabilización estructural de los suelos (Albiach et al., 2001). Por lo tanto, esta falta de cambio en la estabilidad de los agregados del suelo puede atribuirse a que la adición de estas enmiendas orgánicas al suelo produjo disminuciones muy significativas en la actividad microbiana del sistema edáfico. Algunos autores han sugerido que las comunidades bacterianas, que restringen su acción a la estabilización de los agregados <500  $\mu\text{m}$ , son inhibidas por la adición del residuo DOC debido a su contenido en fenoles (Martínez et al., 1998). La presencia de metales pesados en los lodos de depuradora puede afectar negativamente a la población microbiana del suelo o a su actividad (Chander y Brookes, 1993; Martínez-Iñigo et al., 2009;

Nicolás et al., 2014). En nuestro estudio, hubo un claro efecto negativo de la adición de compost de lodos de aguas residuales en las actividades de las enzimas ureasa, proteasa-BAA y  $\beta$ -glucosidasa. El contenido en metales pesados de los lodos de depuradora compostados utilizados no superaron los niveles máximos autorizados por la legislación comunitaria (Directiva del Consejo Europeo de Comunidades, 86/278/CEE). En contraste, García-Gil et al. (2004) describieron un incremento en las actividades de la fosfatasa, ureasa, proteasa y  $\beta$ -glucosidasa 9 meses después de una sola aplicación de un lodo de depuradora ( $40 \text{ t ha}^{-1}$ ) en un suelo mediterráneo semiárido.

#### 3.4.3. Eficacia de los tratamientos con respecto al crecimiento de *J. oxycedrus*

La inoculación con un hongo MA o una mezcla de tres hongos MA estimuló significativamente la producción de biomasa de las plantas de *J. oxycedrus*. La micorrización inducida puede incrementar la absorción de nutrientes, especialmente de fósforo y nitrógeno, proporcionando una superficie de absorción mayor, favoreciendo el desarrollo del sistema radicular y produciendo sustancias que promueven el crecimiento de las plantas (Jeffries et al., 2003; Smith y Read, 2008). Ambos tratamientos de inoculación micorrízica ensayados mostraron la misma eficacia con respecto a la mejora del rendimiento de *J. oxycedrus*. Las mejoras en las condiciones físicas y biológicas del suelo promovidas por los inoculantes micorrízicos podrían haber favorecido el desarrollo y establecimiento de las plantas. Cabe señalar que las micorrizas jugaron un papel clave en la primera etapa de crecimiento en las plantas de *J. oxycedrus* (6 meses después de la plantación), que es el período más crítico para la revegetación, en particular en las zonas semiáridas mediterráneas. Además, los tratamientos de inoculación con los hongos MA fueron más eficaces en relación con el aumento de biomasa de las plantas que la adición de enmiendas orgánicas.

Se puede concluir que a corto plazo, la inoculación micorrízica fue el tratamiento más eficaz para mejorar la estabilidad estructural del suelo, posiblemente debido a una reactivación de las poblaciones microbianas, lo que llevó a un mayor crecimiento de las plantas. La incorporación de las enmiendas orgánicas por sí solas no fue suficiente para restaurar la estructura del suelo,

pero fue eficaz para mejorar el rendimiento de las plantas de *J. oxycedrus* durante las primeras etapas de la plantación.





**Efecto de un ciclo de secado y humectación, la adición de una enmienda orgánica compostada y la inoculación con hongos micorrícicos, sobre la estabilidad de los agregados en la rizosfera de *Juniperus oxicedrus***



## RESUMEN

Una adecuada estabilidad estructural del suelo favorece la creación y viabilidad de una cubierta vegetal estable, protegiendo al suelo contra la erosión en ambientes mediterráneos con riesgo de desertificación. Se estudió el efecto del secado-rehumectado del suelo, la inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos arbusculares exóticos (MA) (*Glomus intraradices* Schenck & Smith, *Glomus deserticola* Trappe, Bloss. & Menge y *Glomus mosseae* (Nicol & Gerd) Gerd. y Trappe) y la adición de un residuo orgánico compostado, sobre la estabilización de los agregados en el suelo rizosférico de *Juniperus oxycedrus*. Los hongos MA y el residuo compostado produjeron aumentos similares en el crecimiento de las plantas, independientemente de las condiciones de humedad del suelo. En condiciones de riego, los mayores porcentajes de agregados estables se registraron en el suelo enmendado, seguido por el suelo inoculado con hongos MA. Con excepción del carbono de la biomasa microbiana, el secado del suelo aumentó las fracciones de carbono lábiles (carbono hidrosoluble, carbohidratos totales e hidrosolubles), mientras que la rehumectación disminuyó significativamente tales fracciones de carbono. La desecación causó un aumento significativo de la estabilidad de los agregados del suelo en la rizosfera de todas las plantas; en particular en las plantas con la enmienda e inoculadas. En todos los tratamientos, los agregados formados después del secado del suelo fueron inestables, ya que después de la rehumectación éstos desaparecieron, alcanzando los niveles iniciales previos al secado. Los resultados sugieren que los mecanismos de agregación desarrollados por la comunidad microbiana en la rizosfera de las plantas enmendadas e inoculadas bajo estrés hídrico pueden ser particularmente relevantes en los suelos desertificados expuestos a períodos largos de desecación.

## 4.1. INTRODUCCIÓN

La estructura del suelo tiene un papel predominante en la capacidad de infiltración del suelo y en los procesos biogeoquímicos (Hamblin, 1985; Amézketa, 1999; Reynolds, 2001). De este modo una mejora de la estructura del suelo tiene como resultado un aumento de la retención hídrica, la absorción de nutrientes, drenaje, aireación y crecimiento de las raíces. La estabilidad de los agregados del suelo es una de las propiedades más importantes que controlan el crecimiento de las plantas en ambientes mediterráneos semiáridos, que a su vez, protegen el suelo frente a la erosión hídrica (Cerdá, 1998).

Los agentes responsables de la estabilidad de los agregados son principalmente orgánicos, y por lo tanto de origen biológico (Roldán et al., 1994b; Six et al., 2004; Rillig y Mummey, 2006). Diversos autores han subrayado la importancia de las poblaciones microbianas en los procesos de estabilización, ya sea como microorganismos de vida libre o asociados a las raíces de las plantas (Roldán et al., 1994b; Chenu y Consentino, 2011; Daynes et al., 2013). Además de la evidencia de entrelazamiento mecánico por las hifas, los polisacáridos extracelulares de hongos o bacterias producen un efecto cementante en los agregados de mayor tamaño (Cheshire y Hayes, 1990; Chenu, 1993; Puget et al., 1999; Kohler et al., 2006; Abiven et al., 2009). Algunos autores han señalado que los hongos micorrícicos arbusculares (MA) tienen un papel decisivo en la formación y la estabilización de los macroagregados (>250  $\mu\text{m}$ ) (Rillig et al., 2010; Daynes et al., 2013). En este sentido, los hongos MA pueden favorecer la agregación del suelo mediante el efecto mecánico de su red de hifas extrarradicales, entrelazando las partículas entre sí, así como a través de un efecto químico, debido a la secreción de sustancias orgánicas adhesivas (Miller y Jastrow., 2000). En particular, las hifas de los hongos micorrícicos arbusculares producen una glicoproteína llamada glomalina, que estabiliza los agregados del suelo (Wright y Anderson, 2000; Rillig y Mummey, 2006). Rillig et al. (2002) describieron los efectos indirectos significativos de la longitud de hifas fúngicas arbusculares sobre la estabilización de los agregados, atribuidos a la producción de las proteínas del suelo relacionada con la glomalina (GRSP) en un sistema de pastizal natural.

El clima mediterráneo expone el suelo a ciclos intensos de desecación intercalados con eventos rehumectantes relativamente rápidos y de escasa duración. El secado y la rehumectación del suelo representan un estrés fisiológico común para las comunidades microbianas que viven en la capa superficial del suelo. Un ciclo de secado-rehumectación puede inducir la lisis en una proporción muy importante de la biomasa microbiana (Fierer et al., 2003). Esta disminución en la microbiota del suelo depende en gran medida de su estabilización física en la matriz del suelo o de su capacidad para sobrevivir en condiciones de déficit hídrico. Los efectos de la desecación y rehumectación sobre la biomasa y la actividad microbiana han sido ampliamente estudiados (Rosacker y Kieft, 1990; Kohler et al., 2009; Hueso et al., 2012). La actividad microbiana del suelo ha sido evaluada con frecuencia a través de parámetros biológicos y bioquímicos, como el carbono de la biomasa y las actividades enzimáticas. Las enzimas han sido utilizadas como indicadores de los cambios causados por la inoculación microbiana y otros tratamientos del suelo, incluida la aplicación de un estrés hídrico sobre el funcionamiento del sistema suelo-planta (Naseby y Lynch, 1997; Burns et al., 2013). Sin embargo, ningún estudio ha examinado los efectos de los ciclos de secado-hidratación del suelo sobre la interacción entre la población microbiana natural y las especies introducidas de micorrizas, en relación con la estabilidad de los agregados del suelo.

La adición de materia orgánica en forma de residuo urbano compostado aumenta la proliferación del micelio de los hongos micorrícicos (Douds et al., 1997) y la diversidad de hongos (MA) en el suelo (Jacquot-Plumey et al., 2001; Alguacil et al., 2009) aunque también se han observado efectos negativos (Roldán y Albaladejo, 1993). El papel beneficioso de la materia orgánica puede estar relacionado con una mejora de las propiedades físicas, tales como el aumento de la estabilidad de los agregados del suelo, y/o el aumento en la actividad microbiana (Caravaca et al., 2002b). Hasta donde sabemos, no existen estudios sobre el efecto de una enmienda orgánica y hongos MA sobre la estabilidad de agregados en condiciones de desecación-rehumectación del suelo.

El propósito de este estudio fue determinar la influencia de un ciclo de secado-rehumectación del suelo, la inoculación con una mezcla de hongos MA y la adición de un residuo compostado en la agregación del suelo rizosférico de

*Juniperus oxycedrus*, y sus consecuencias para el crecimiento de la planta. Partimos de la hipótesis de que la comunidad microbiana nativa, la cual está bien adaptada a los ecosistemas mediterráneos amenazados por la desertificación en el sureste de España, sería en parte responsable del desarrollo de los procesos de agregación bajo estrés hídrico.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Materiales

El suelo experimental procede de Los Cuadros, en la provincia de Murcia (SE España) (coordenadas: 38°10'N y 1°05'O). El clima es mediterráneo semiárido, con una precipitación media anual de 300 mm, así como una temperatura media anual de 17,2 °C, siendo la evapotranspiración potencial elevada (1000 mm / año). El suelo utilizado se clasificó como Haplocalcid típico (Soil Survey Staff, 2010) desarrollado a partir de sedimentos cuaternarios con una textura franca. Las principales características de los suelos utilizados fueron: pH (1:5) 8,50; conductividad eléctrica 0.225 dSm<sup>-1</sup>; carbono orgánico total 1,03 %; nitrógeno total 0,95 g kg<sup>-1</sup>, fósforo disponible 7 µg g<sup>-1</sup>; potasio extraíble 222 µg g<sup>-1</sup>.

Se utilizó como residuo orgánico compostado, la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos obtenido de una planta de tratamiento de residuos municipales de Murcia. El residuo compostado fue producido mecánicamente por fermentación rápida (60 días), mezclando la pila de residuos diariamente bajo condiciones aeróbicas. Las principales características del residuo compostado utilizado fueron: pH (1:5) 6,7; carbono orgánico total 276,0 g kg<sup>-1</sup>; carbono hidrosoluble 1.950 µg g<sup>-1</sup>; carbohidratos hidrosolubles 76 µg g<sup>-1</sup>; nitrógeno total 14,5 g kg<sup>-1</sup>; fósforo total 3,8 g kg<sup>-1</sup>.

### 4.2.2. Selección de la especie vegetal y los tratamientos de inoculación micorrícica

La planta utilizada para el experimento, *Juniperus oxycedrus* L., es un árbol de crecimiento lento que alcanza una altura de 3-4 metros, aunque a menudo crece como un arbusto. Este arbusto se encuentra ampliamente distribuido en el área mediterránea y está bien adaptado a las condiciones de sequía. Las

plantas se cultivaron durante 6 meses en sustrato de turba en condiciones de vivero, sin ningún tratamiento de fertilización.

El inóculo micorrícico utilizado en el experimento consistió en una mezcla de *Glomus intraradices* Schenck y Smith, *G. deserticola* (Trappe, Bloss. & Menge) y *G. mosseae* (Nicol y Gerd.) Gerd. & Trappe. El inóculo fúngico MA consistió en una mezcla de suelo rizosférico obtenido con cultivos trampa (*Sorghum* sp.) que contiene esporas, hifas y fragmentos de raíz micorrizada.

#### 4.2.3. Tratamiento de secado y rehumectación

A principios de febrero de 2004, macetas de 1.500 ml de capacidad (13 cm de diámetro, 11,3 cm de altura) se llenaron con el suelo experimental. El residuo compostado se mezcló manualmente con el suelo en una proporción del 5% (v/v). El inóculo MA se aplicó en la misma proporción que el residuo (5% v/v). Se añadió la misma cantidad de inóculo autoclavado a las plantas control, acompañada con un filtrado (Whatman n.º.1 de papel) del cultivo micorrícico para proporcionar las poblaciones microbianas que acompañan a los hongos micorrícicos. Una plántula de *Juniperus oxycedrus* fue trasplantada en cada maceta. Se establecieron dieciséis repeticiones por tratamiento, lo que originó un total de 64 plantas. Se regaron regularmente con agua descalcificada durante 14 meses, manteniendo el suelo con una humedad continua correspondiente al 70 % de la capacidad de retención hídrica (coincidiendo con un potencial hídrico del suelo de -0,2 MPa). Transcurrido este período, el riego se interrumpió y se dejó secar el suelo durante 12 días hasta que el contenido de agua gravitacional alcanzó aproximadamente el 5% (coincidiendo con un potencial hídrico del suelo de -1,2 MPa). Después del período de secado del suelo, las plantas fueron rehumectadas (coincidiendo con un potencial hídrico del suelo de -0,2 MPa) y se mantuvieron a este potencial durante una semana. El contenido de agua del suelo de cada maceta se ajustó a diario con agua descalcificada, que se añadió por pulverización sobre la superficie del suelo y por acción capilar desde la parte inferior. El experimento se realizó en un invernadero, ubicado en el Campus de Espinardo (Murcia). Durante el experimento, la temperatura varió de 11° C a 34° C, y la humedad relativa se mantuvo entre 40 % y 80 %. La radiación fotosintética activa (PAR) registró un promedio de 260  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

#### 4.2.4. *Potencial hídrico del suelo*

El potencial hídrico del suelo se determinó mediante el método de la membrana de presión de Richards (Richards, 1941). Una curva característica de humedad del suelo fue construida y utilizada para correlacionar el contenido de agua del suelo y el potencial hídrico del suelo ( $\Psi$ ), mediante la medición gravimétrica del contenido de agua del suelo en las macetas (110° C, 24h).

#### 4.2.5. *Análisis en plantas*

Previo al período de secado, a la mitad y al final de éste (que corresponde con un potencial hídrico del suelo de -0.6MPa y -1,2 MPa, respectivamente), y al final del ciclo de secado-rehumectación, se cosecharon cinco plantas por tratamiento. Para recolectar el suelo rizosférico, las raíces con suelo adherido se introdujeron en una bolsa de plástico, se agitaron, separando el suelo de la rizosfera del sistema radicular.

Se registraron los pesos fresco y seco de la parte aérea de la planta (65° C, 24h). Los contenidos foliares de fósforo se determinaron por espectroscopía de plasma óptico de acoplamiento inducido (ICP-OES, modelo ICAP 6500 DUO). El porcentaje de raíces colonizadas por hongos MA se calculó por el método de intersección de cuadrícula (Giovannetti y Mosse, 1980) después de una tinción con azul tripán (Phillips y Hayman, 1970).

#### 4.2.6. *Análisis biológico, bioquímico y físico del suelo*

El carbono hidrosoluble se determinó en el extracto 1/5 (suelo/agua) con un analizador de carbono automático para muestras líquidas (Shimadzu TOC-5050A). Los carbohidratos hidrosolubles se midieron en el extracto 1/5 (suelo/agua) por el método de Brink et al. (1960).

El carbono de la biomasa microbiana se determinó usando el método de fumigación-extracción (Vance et al., 1987). La actividad deshidrogenasa se determinó de acuerdo con el método descrito por García et al. (1997). La actividad fosfatasa ácida se determinó utilizando p-nitrofenil fosfato disódico como sustrato (Tabatabai y Bremner, 1969).

La estabilidad de agregados se midió según el método descrito por Roldán et al. (1994b), basado en la determinación de los agregados estables al impacto de una lluvia artificial de energía conocida (Benito et al., 1986).

Se determinó la fracción de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP) por el método de Wright y Upadhyaya (1996).

La metodología empleada aparece detallada en el capítulo “Materiales y Métodos”.

#### *4.2.7. Análisis estadístico*

Los datos fueron transformados logarítmicamente para lograr la normalidad. Para los datos de porcentaje de agregados estables y colonización micorrícica se utilizó la transformación arco seno. Los efectos de la adición del residuo compostado, la inoculación con hongos micorrícicos, el estrés hídrico, y sus interacciones, fueron determinados con un análisis de la varianza de tres vías, y las comparaciones entre las medias se hicieron mediante el test de Tukey calculado para  $P < 0,05$ . Los procedimientos estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 18.0 para Windows.

### **4.3. RESULTADOS**

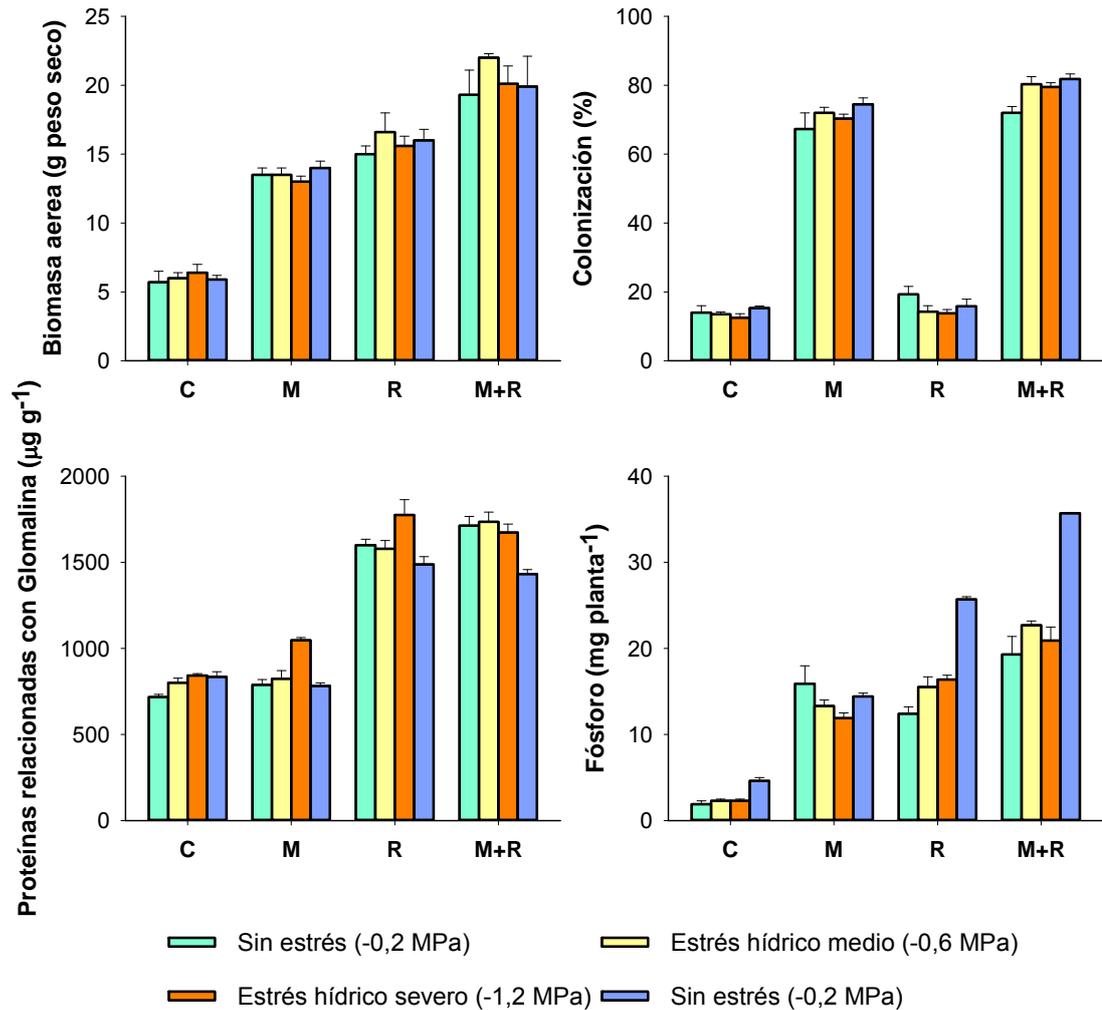
#### *4.3.1. Crecimiento, asimilación de nutrientes y colonización micorrícica*

La inoculación con los hongos micorrícicos alóctonos y la adición del residuo compostado aumentaron significativamente la biomasa seca del tallo de las plantas con respecto a las control, aunque la combinación de ambos tratamientos produjo valores incluso más altos (Tabla 1 y Figura 1). Antes del secado del suelo, la mezcla de los hongos MA y del residuo compostado produjo aumentos similares en el crecimiento de las plantas, llegando a producir aumentos del 150% con respecto a las plantas control. La desecación del suelo no tuvo efecto sobre el crecimiento de las plantas (Tabla 1). En conclusión, los aumentos producidos por la inoculación micorrícica y el residuo compostado al final del período de secado del suelo, fueron similares a los observados para las plantas no sometidas a condiciones de déficit hídrico. Este efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de la planta también se observó después de 1 semana de rehidratación. Los mayores incrementos en la

biomasa seca de las plantas de *J. oxycedrus* se registraron en el tratamiento que combina la adición del residuo compostado y la inoculación micorrícica (aproximadamente 3,4 veces mayor que las plantas control), independientemente del potencial hídrico del suelo.

Los mayores contenidos de fósforo foliar se observaron en las plantas inoculadas con la mezcla de hongos MA y con la adición del residuo orgánico, independientemente del régimen de humedad (Figura 1). Del mismo modo, tras el periodo de secado no se observaron diferencias significativas en el P foliar de las plantas de *J. oxycedrus* (Tabla 1). Sin embargo, el contenido de fósforo foliar en las plantas rehidratadas fue superior al registrado en las plantas antes y después del secado del suelo, sobre todo para las plantas inoculadas y enmendadas con el residuo compostado.

Sólo el tratamiento con la inoculación micorrícica tuvo un efecto significativo sobre el nivel de colonización en las raíces de *J. oxycedrus* ( $P < 0,001$ , Tabla 1). Antes y al final del período de secado, las raíces de las plantas inoculadas con la mezcla de especies alóctonas de hongos MA presentaron un nivel similar de colonización micorrícica. Las plantas con colonización natural, con o sin la adición de residuo compostado mostraron aproximadamente un 15% de colonización en la raíz. La rehidratación no afectó significativamente la colonización micorrícica, tanto en las plantas inoculadas como en las no inoculadas.



**Figura 1.** Efecto de la adición de un residuo compostado y la inoculación micorrícica sobre la biomasa aérea, el contenido de P foliar, la colonización micorrícica y la concentración de proteínas del suelo relacionadas con glomalina en la rizosfera de *J. oxycedrus* durante un ciclo de secado-rehumectación (n=5). C=control; M= inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; R= adición de un residuo compostado; M+R= adición de un residuo compostado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos. Las barras indican el error estándar de la media.

**Tabla 1.** ANOVA de tres factores (inoculación micorrícica, adición de residuo compostado y estrés hídrico) para todos los parámetros estudiados en la rizosfera y en las plantas de *J. oxycedrus*. Valores de significación (*P*).

	Inoculación micorrícica (M)	Adición residuo (R)	Estrés hídrico (E)	Interacciones			
				M x R	M x E	R x E	M x R x E
Biomasa aérea	<0,001	<0,001	0,776	<0,001	0,939	0,896	0,900
P foliar	<0,001	<0,001	0,629	<0,001	0,200	0,628	0,693
Colonización	<0,001	0,064	0,334	0,569	0,087	0,245	0,182
Glomalina	0,105	<0,001	0,057	0,551	0,898	0,227	0,325
pH	0,620	<0,001	0,055	0,349	0,833	0,305	0,364
CE	0,495	0,733	0,695	0,684	0,832	0,887	0,879
EA	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,277	<0,001	0,047
CS	0,256	<0,001	0,044	0,538	0,048	0,133	0,172
CH totales	0,030	<0,001	<0,001	0,098	0,073	0,001	0,120
CH hidrosolubles	<0,001	<0,001	<0,001	0,048	0,742	<0,001	<0,001
C biomasa	<0,001	<0,001	0,282	0,505	0,732	0,352	0,664
Deshidrogenasa	<0,001	<0,001	0,071	0,150	0,045	0,023	0,044
Fosfatasa	<0,001	<0,001	<0,001	0,434	0,021	0,047	0,247

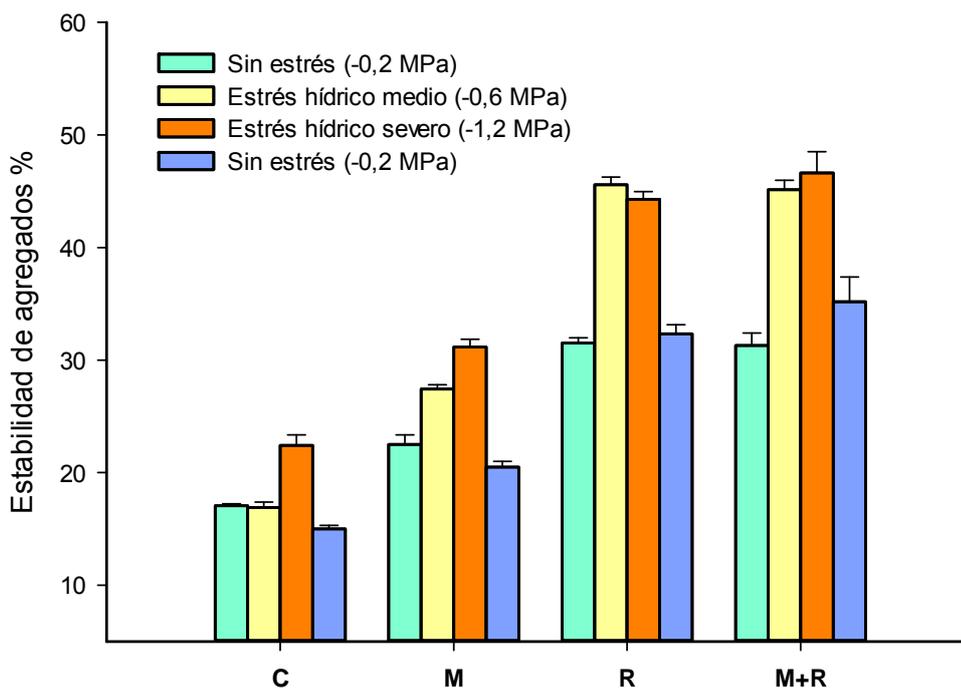
CE= conductividad eléctrica; EA= estabilidad de agregados; CS= carbono hidrosoluble; CH= carbohidratos.

#### 4.3.2. Proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP) y estabilidad de agregados

La inoculación micorrícica no tuvo ningún efecto significativo sobre la concentración de las proteínas relacionadas con la glomalina en el suelo rizosférico de *J. oxycedrus* (Tabla 1). Por el contrario, el efecto de la adición del residuo orgánico compostado afectó al contenido de GRSP en un grado muy significativo ( $P < 0,001$ ), tanto en condiciones de riego como de estrés hídrico. Las concentraciones de GRSP no variaron con el secado del suelo. Al final del período de rehumectación, la concentración de proteínas relacionadas con la glomalina en el suelo rizosférico fue similar a la registrada después del secado (Figura 1).

Tanto la inoculación con la mezcla de hongos MA alóctonos como la adición del residuo compostado mejoró de forma significativa la estabilidad estructural del

suelo rizosférico de *J. oxycedrus* (Figura 2). El mayor incremento se registró con la adición de la enmienda orgánica (aproximadamente 85% mayor, en comparación con el suelo control en condiciones de riego). La desecación causó un aumento significativo en la estabilidad de los agregados del suelo rizosférico de todas las plantas, en particular en el suelo enmendado.



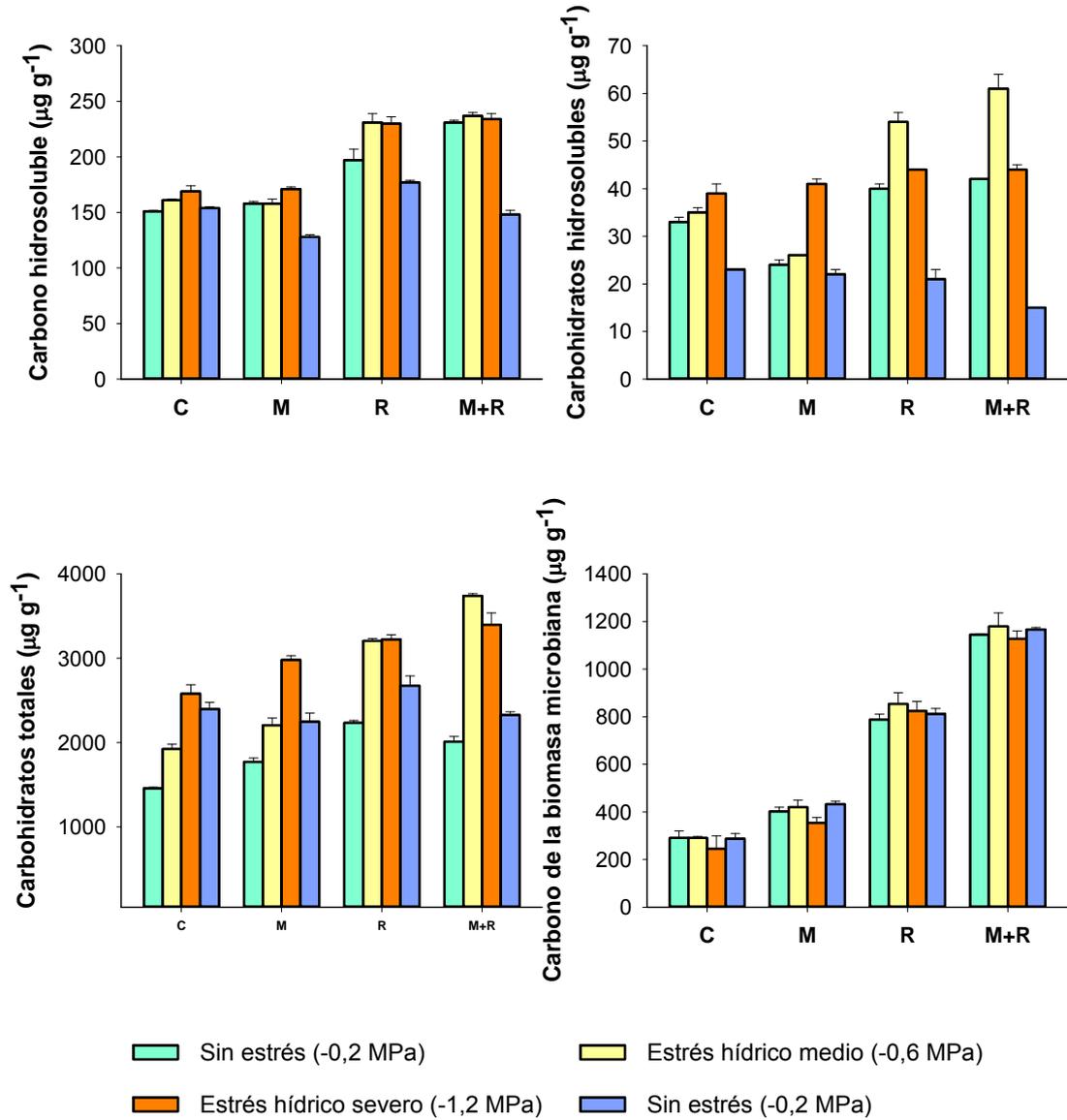
**Figura 2.** Efecto de la adición de un residuo compostado y la inoculación micorrícica sobre el porcentaje de agregados estables en la rizosfera de *J. oxycedrus* durante un ciclo de secado-rehumectación (n=5). C=control; M= inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; R= adición de un residuo compostado; M+R= adición de un residuo compostado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos. Las barras indican el error estándar de la media.

El secado del suelo hasta un potencial hídrico de -0,6 MPa, afectó la estabilidad de los agregados en las plantas inoculadas y enmendadas. Hubo una interacción positiva, aumentando el porcentaje de agregados estables, entre el secado del suelo y la adición del residuo compostado (Tabla 1). Al final del período de secado, el porcentaje de agregados estables en las plantas enmendadas fue de un 40 % superior a las que estuvieron bajo condiciones de

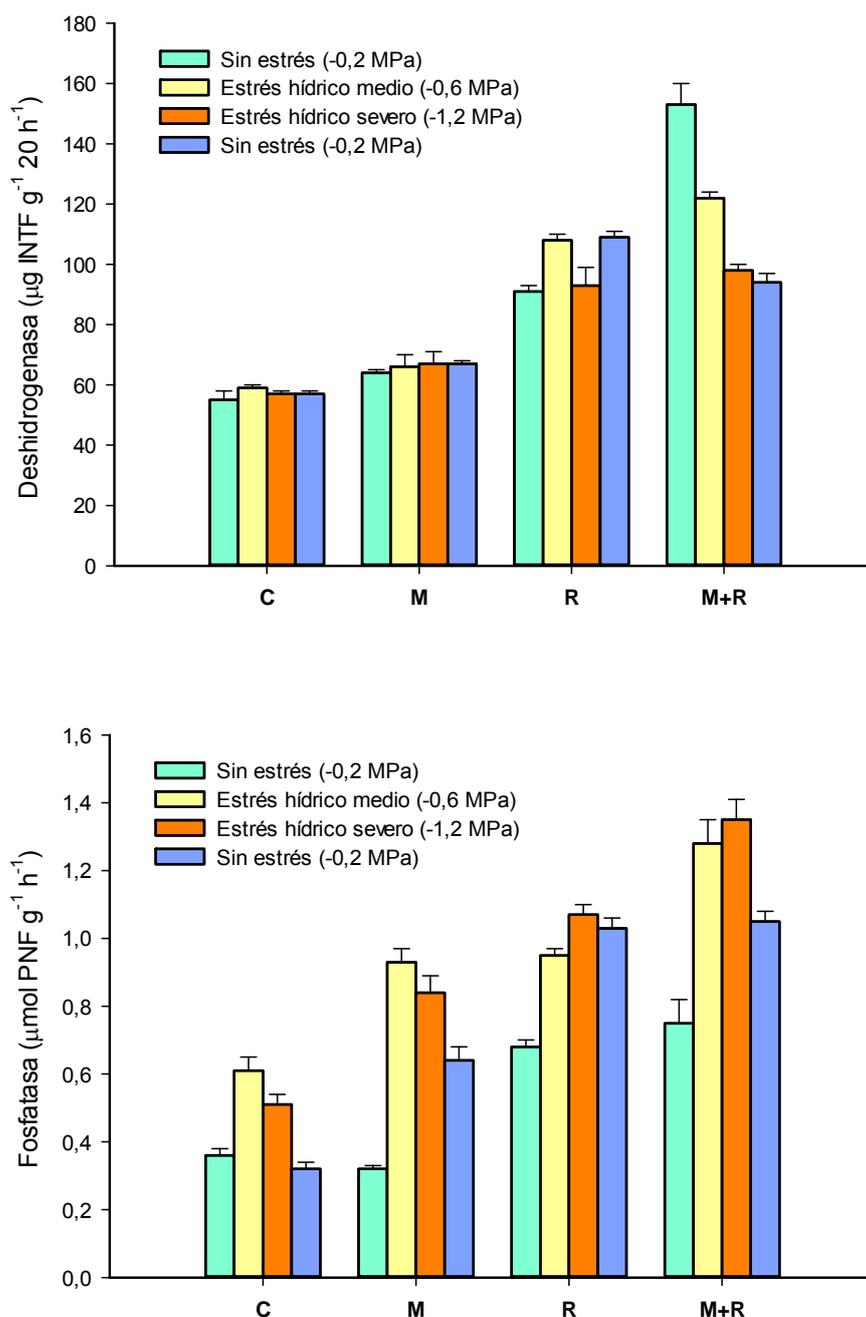
riego. Después de 1 semana de rehidratación, la estabilidad de los agregados del suelo rizosférico de todas las plantas disminuyó considerablemente, alcanzando valores similares a los observados en las plantas bajo condiciones de riego permanente. También se observó que la disminución de los porcentajes de agregados estables debido a la rehidratación fue menos pronunciada en el suelo tratado con el residuo compostado.

#### *4.3.3. Parámetros biológicos y bioquímicos*

Los valores de carbono hidrosoluble y de carbohidratos hidrosolubles se incrementaron sólo con la adición del residuo compostado durante el periodo de secado (Tabla 1 y Figura 3), en particular cuando el potencial hídrico del suelo fue de  $-0.6\text{MPa}$ . El suelo rizosférico de las plantas inoculadas presentó contenidos de carbohidratos hidrosolubles menores que el suelo rizosférico de las plantas control bajo condiciones de riego y con un potencial hídrico de  $-0.6\text{MPa}$ . Hubo una interacción positiva entre la inoculación micorrícica y la adición del residuo compostado con respecto al aumento de los carbohidratos hidrosolubles, coincidiendo con un potencial hídrico de  $-0.6\text{MPa}$  (Figura 3). Tanto la inoculación micorrícica como la adición del residuo compostado aumentaron significativamente los valores de carbohidratos totales y el carbono de la biomasa (Figura 3), los mayores incrementos se observaron en la fracción de carbono de la biomasa (alrededor de un 38 % y 171 % respectivamente mayor que en el suelo control). La adición del residuo compostado fue el tratamiento más eficaz para aumentar ambas fracciones de carbono. Excepto para el carbono de la biomasa, las condiciones de secado tuvieron un efecto significativo en las fracciones lábiles de carbono, produciendo un aumento de éstas. Por contra, la rehidratación de las plantas disminuyó significativamente tales fracciones de carbono (excepto el carbono de la biomasa), alcanzando valores incluso inferiores a los registrados en condiciones de riego.



**Figura 3.** Efecto de la adición de un residuo compostado y la inoculación micorrícica sobre las fracciones de carbono orgánico en la rizosfera de *J. oxycedrus* durante un ciclo de secado-rehumectación (n=5). C=control; M= inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; R= adición de un residuo compostado; M+R= adición de un residuo compostado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos. Las barras indican el error estándar de la media.



**Figura 4.** Efecto de la adición de un residuo compostado y la inoculación micorrícica sobre las actividades enzimáticas en la rizosfera de *J. oxycedrus* durante un ciclo de secado-rehumectación (n=5). C=control; M= inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos; R= adición de un residuo compostado; M+R= adición de un residuo compostado e inoculación con una mezcla de tres hongos micorrícicos. Las barras indican el error estándar de la media.

Tanto en el suelo de las plantas inoculadas como en el suelo enmendado con el residuo compostado se registró un incremento significativo de la actividad deshidrogenasa respecto al suelo control (Figura 4). Esta enzima no mostró diferencias significativas en el periodo de secado (Tabla 1)

La adición del residuo compostado y el secado aumentaron significativamente la actividad fosfatasa en el suelo rizosférico (Figura 4). Así, la actividad fosfatasa fue mayor en el suelo rizosférico de las plantas estresadas que en el de las no estresadas. La interacción entre la enmienda y la inoculación micorrícica con el secado, promovió un efecto positivo sobre la actividad fosfatasa. La rehidratación no tuvo casi ningún efecto sobre la actividad deshidrogenasa excepto en el suelo enmendado, donde se redujo esta actividad.

#### 4.4. DISCUSIÓN

##### 4.4.1. Efecto de los hongos micorrícicos y el residuo compostado en la estructura del suelo

Nuestros datos confirman la influencia de la inoculación con una mezcla de hongos MA sobre la estabilidad de los agregados del suelo rizosférico de *Juniperus oxycedrus*. Los mecanismos implicados en la formación y estabilización de los agregados se basan en el entrelazamiento de las partículas del suelo por hifas y raíces; y en el efecto cementante de los polisacáridos exudados por raíces y microorganismos (Bearden y Petersen, 2000; Daynes et al., 2013). En este ensayo las concentraciones de carbohidratos totales fueron mayores en el suelo rizosférico de las plantas inoculadas con hongos MA que en el de las plantas control. Según Roldán et al. (1994b), el efecto de unión de las raíces y las hifas es de larga duración, mientras que el de los polisacáridos es transitorio, ya que se descomponen rápidamente por los microorganismos. Según lo sugerido por Bearden y Petersen (2000), la simbiosis entre hongos MA y las plantas habría incrementado la estabilidad de los agregados del suelo. El porcentaje de colonización radicular en las plantas inoculadas con hongos MA fue significativamente mayor que el de las plantas no inoculadas. Estudios recientes han indicado también que los hongos MA producen una glicoproteína

llamada glomalina, que actúa como un agente cementante insoluble en la estabilización de los agregados (Wright y Anderson, 2000; Spohn y Giani, 2010; Fokom et al., 2012). En este estudio, no hubo evidencia de una mayor participación de la glomalina producida por los hongos micorrícicos introducidos con respecto a la producida por los hongos MA autóctonos del suelo en la mejora de la estabilidad estructural del suelo. Se pudo observar una reactivación de la actividad microbiana en la rizosfera, ya que el tratamiento de la inoculación con hongos MA incrementó la actividad deshidrogenasa. Esta actividad enzimática está fuertemente relacionada con la actividad microbiana (Nannipieri, 1994) y con el carbono de la biomasa en el suelo rizosférico. Las oxidorreductasas, como es el caso de la deshidrogenasa, están involucradas en los procesos oxidativos en los suelos, y su actividad depende principalmente del estado metabólico de la biota del suelo, por lo que son consideradas como buenos indicadores de la actividad microbiana del suelo en zonas semiáridas (García et al., 1997).

La adición de un residuo orgánico compostado aumentó el porcentaje de agregados estables en mayor medida que la inoculación con una mezcla de hongos MA alóctonos. Es importante destacar que el tratamiento combinado de la inoculación micorrícica y la enmienda orgánica produjo un incremento similar en la estabilidad de agregados que el residuo solo. La enmienda orgánica tiene un efecto sobre la estabilidad de los agregados debido a los polisacáridos presentes (Lax y García-Orenes, 1993; Wu et al., 2012) y a la reactivación de las poblaciones microbianas, como consecuencia del aporte de materia orgánica biodegradable y la incorporación de nutrientes importantes como el nitrógeno y el fósforo (Caravaca et al., 2003a). De hecho, los niveles de las fracciones solubles del carbono (carbono hidrosoluble, carbohidratos totales e hidrosolubles) fueron mayores en el suelo de las plantas enmendadas con el residuo compostado que en el suelo de las plantas inoculadas. El estudio de las fracciones solubles del carbono es importante puesto que son determinantes de la actividad microbiana en el suelo (Ghani et al., 2003; García-Orenes et al., 2010). En efecto, estas fracciones pueden ser utilizadas como fuentes de carbono y de energía por la microflora del suelo y también pueden participar en la agregación del suelo (Caravaca et al., 2002b). Como se observó para las fracciones solubles del carbono, la actividad deshidrogenasa y

el carbono de la biomasa microbiana también registraron un aumento con la adición del residuo compostado, a un mayor grado que con la inoculación micorrícica. También se observó un incremento de la actividad microbiológica del suelo atribuible al aumento en la actividad fosfatasa. Las fosfatasas son enzimas con una especificidad relativamente amplia, capaces de hidrolizar varios ésteres de fosfato, orgánicos e inorgánicos; y están involucrados en el ciclo del P. El mayor aumento en la actividad fosfatasa se registró en el suelo rizosférico enmendado con el residuo compostado, lo que podría indicar que esta enmienda contenía compuestos orgánicos de fósforo capaces de activar la síntesis de esta enzima. Por otro lado, la alta concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina en el tratamiento con la enmienda orgánica sin inóculo, podría indicar que una parte significativa de proteínas procedentes del residuo compostado no se eliminaron durante el proceso de extracción de GRSP, interfiriendo en su determinación. En concordancia con estos resultados, Rosier y col. (2006) llegaron a la conclusión de que el uso del método de Bradford para evaluar contenidos de GRSP puede no ser útil cuando se producen adiciones de materia orgánica.

#### *4.4.2. Efecto de los hongos micorrícicos y del residuo compostado en el crecimiento de *Juniperus oxycedrus**

El residuo compostado y los hongos MA alóctonos produjeron aumentos similares en la biomasa aérea de las plantas de *J. oxycedrus*. La mejora de la estabilidad de los agregados pudo haber contribuido positivamente al desarrollo de las plantas de *J. oxycedrus*. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, no es posible demostrar el efecto que tuvo la estructura del suelo sobre el crecimiento de la planta. Las micorrizas aumentan la absorción de nutrientes, especialmente de P, proporcionando una mayor superficie de absorción, favoreciendo el desarrollo del sistema radicular y produciendo compuestos que promueven el crecimiento de las plantas (Jeffries et al. 2003; Smith y Read, 2008). El grado de infección micorrícica es importante en el estudio de la influencia de los hongos MA sobre la planta huésped. Existió una amplia diferencia en el porcentaje de colonización micorrícica entre plantas no inoculadas y las inoculadas con hongos MA alóctonos, manteniéndose esta diferencia durante todo el experimento de secado-rehumectación; mientras que

los hongos MA autóctonos mostraron poca capacidad para colonizar las raíces de *Juniperus* en el suelo enmendado con el residuo compostado. La comunidad de hongos MA autóctonos del suelo experimental fue mucho menos eficaz que el inóculo de *Glomus* añadido, con respecto a la estimulación del crecimiento de la planta huésped. Los arbustos inoculados con las especies de hongos MA alóctonos alcanzaron un tamaño comparable a los tratados con el residuo compostado. Este resultado podría indicar que el residuo orgánico contribuyó positivamente al suministro de nutrientes disponibles en el suelo. Diversos autores han demostrado que el uso de enmiendas en el suelo puede mejorar la productividad del mismo, aumentando la fertilidad de éste con los aportes de algunos elementos limitantes, tales como N y P (Cox et al., 2001; Caravaca et al., 2003a; Tejada et al., 2007). En nuestro estudio, las plantas cultivadas en el suelo enmendado tuvieron contenidos de P mayores que las plantas en el suelo no enmendado. Del mismo modo, se observaron diferencias en el contenido de P foliar entre las plantas inoculadas con hongos MA alóctonos en comparación con las colonizadas con hongos MA nativos del suelo. Esta tendencia se registró antes y después del secado.

#### *4.4.3. Efecto del ciclo de secado-rehumectación sobre la estructura del suelo*

El efecto positivo de los hongos MA alóctonos y del residuo compostado sobre la estabilidad estructural del suelo fue más pronunciado después del secado del suelo, sobre todo en el suelo enmendado. Del mismo modo, la desecación del suelo produjo una mejora de la estabilidad de los agregados del suelo en la rizosfera de las plantas control. Algunos estudios han mostrado que el secado del suelo puede representar un estrés significativo para la microbiota del suelo, provocando una pérdida sustancial de su biomasa y de su actividad (Rosacker y Kieft, 1990; Sardans and Peñuelas, 2005; Kohler et al., 2009; Hueso et al., 2012). La disminución del contenido de agua del suelo restringe la difusión de nutrientes a los microorganismos (Harris, 1981). En el presente experimento, ni el carbono de la biomasa ni la actividad deshidrogenasa se vieron afectados por el secado del suelo. Una posible explicación de esta observación es que las comunidades nativas del suelo están fisiológica y genéticamente adaptadas a los ambientes de escasez de agua. En estos ambientes los microorganismos del suelo han desarrollado diversos mecanismos para sobrevivir a la

desección. Por ejemplo, en bacterias se han observado cambios en la estructura de sus membranas, así como en la síntesis de exopolisacáridos con el fin de aumentar su supervivencia durante los períodos de bajo potencial hídrico. Los polisacáridos son higroscópicos y por lo tanto pueden mantener un mayor contenido de agua en el microambiente de las colonias de microorganismos del suelo a medida que disminuye el grado de humedad. Este aumento en el contenido de agua útil podría aumentar la disponibilidad de nutrientes dentro de la colonia bacteriana. De este modo, se ha demostrado que una cepa de *Pseudomonas sp.* aislada del suelo aumentó su producción de exopolisacáridos durante un periodo de desecación (Roberson y Firestone, 1992). Los polisacáridos extracelulares de las bacterias pueden formar con las partículas minerales una envoltura órgano-mineral que rodea a la célula y la protege frente a la deshidratación (Chenu, 1993; Nocker et al., 2012), lo que a su vez conduce a un aumento en los macroagregados como un efecto adicional indirecto. En este estudio, el hecho de que las grandes diferencias en carbohidratos totales e hidrosolubles entre las plantas regadas y las estresadas, estuviera acompañado de un aumento en la estabilidad de los agregados después del secado del suelo, podría apoyar esta hipótesis. Cabe señalar que la existencia de este tipo de mecanismo, desarrollado por la comunidad microbiana nativa para aumentar la estabilidad estructural durante el secado del suelo, tiene una gran importancia ecológica en los suelos desertificados altamente susceptibles a la erosión hídrica, y expuestos a períodos largos de déficit hídrico. La mejora sustancial de los niveles de agregados estables durante el secado en el suelo enmendado y el micorrizado respecto al control, podría indicar que la biomasa microbiana añadida fue más eficaz que la nativa en el desarrollo de este efecto protector contra la sequía. Estos resultados también apoyan la hipótesis de que la biomasa microbiana nativa pudiera estar demasiado degradada como para ser efectiva, por lo que fue necesario reactivarla con la inoculación de una mezcla de hongos MA y la adición de una enmienda orgánica. La posible contribución de las hifas de los hongos MA en la formación de agregados estables durante el secado del suelo no se pudo demostrar en este estudio, debido a la ausencia de variaciones en la colonización de las raíces y en la concentración de GRSP con el potencial hídrico del suelo. Por otra parte, los agregados formados durante el secado del

suelo fueron relativamente inestables, ya que los porcentajes de los agregados del suelo rizosférico de plantas rehumectadas fueron menores que los registradas después del período de secado. Esto podría ser debido a que la materia orgánica implicada en la formación de los agregados estables durante el secado del suelo fue una fracción lábil, fácilmente utilizable como fuente de carbono y de energía por los microorganismos del suelo cuando los agregados se encuentran saturados en agua. De hecho, después del período de rehumectación, los niveles de carbono hidrosoluble, carbohidratos hidrosolubles y totales, disminuyeron notablemente con respecto a los observados después del período de secado. Los agregados del suelo enmendado fueron más resistentes a la desagregación producida por la rehidratación que los del suelo control y el inoculado.

Se puede concluir que la desecación mejoró la estabilidad de los agregados en un suelo degradado, produciendo los mayores incrementos en el suelo con el residuo compostado y con plantas micorrizadas. Los mecanismos implicados en la formación de agregados durante el secado del suelo fueron de tipo biológico, principalmente por la secreción de exopolisacáridos. Los agregados formados durante la desecación del suelo fueron inestables, como evidencia el hecho de su rotura durante la humectación del suelo, alcanzando los niveles iniciales antes del secado del suelo. La importancia de este proceso físico es evidente, ya que se lleva a cabo en los suelos desertificados altamente susceptibles a la erosión hídrica. Por ello, se considera primordial la realización de investigaciones adicionales encaminadas a dilucidar la implicación ecológica de este proceso en ambientes semiáridos.





**Cambios en la actividad biológica y estabilidad estructural de un suelo mediterráneo degradado inducidos por la utilización de un alperujo tratado con microorganismos como enmienda orgánica sólida y hongos micorrícicos arbusculares**



## RESUMEN

Se llevó a cabo un experimento de campo para evaluar el efecto de un tratamiento combinado que implicó la adición de residuo de alperujo (DOC) tratado con *Aspergillus niger* en presencia de fosfato de roca, más la inoculación pre-trasplante de plántulas con hongos micorrícicos arbusculares (MA) *Glomus intraradices*, *Glomus deserticola* o *Glomus mosseae*, sobre el establecimiento de *Dorycnium pentaphyllum* L., en una zona mediterránea semiárida degradada. También se cuantificaron los cambios en las fracciones lábiles del carbono en el suelo, actividades enzimáticas y estabilidad de agregados. Un año después de la plantación, el tratamiento combinado de la adición del residuo fermentado DOC y la inoculación con *G. mosseae*, resultó ser más efectivo para incrementar la biomasa aérea de las plantas de *D. pentaphyllum* (en promedio un 328% mayor que las plantas control). Sólo la adición del DOC aumentó el fósforo asimilable, nitrógeno total y estabilidad de los agregados, registrando el mayor incremento en el contenido de fósforo asimilable en el suelo (cerca de cuatro veces más alto que en el suelo no enmendado). Tanto la adición del residuo DOC fermentado como los tratamientos de inoculación micorrícica incrementaron significativamente las actividades enzimáticas del suelo rizosférico (deshidrogenasa, proteasa-BAA, fosfatasa ácida y  $\beta$ -glucosidasa). El DOC tratado resultó ser una enmienda efectiva para mejorar la calidad del suelo, que a su vez, mejoró el éxito de la revegetación con las plantas de *D. pentaphyllum* micorrizadas.

## 5.1. INTRODUCCIÓN

Las principales áreas de producción de aceite de oliva se concentran en los países de la cuenca mediterránea, siendo España el mayor productor mundial (aproximadamente 990.400 toneladas anuales). El principal sistema de extracción de aceite de oliva utilizado en España (sistema de centrifugación de dos fases) genera grandes cantidades de un residuo sólido llamado orujo de oliva de dos fases (DOC) o "alperujo". El alperujo es un residuo rico en materia orgánica, fundamentalmente lignina y celulosa, que ha sido ampliamente usado como una fuente alternativa de materia orgánica y nutrientes con fines agrícolas. Estudios recientes han puesto de relieve que la biodegradación de estos residuos agroindustriales mediante hongos lignocelulósicos y solubilizadores de fosfato es una biotecnología efectiva para su valorización como enmiendas y fertilizantes en agroecosistemas (Vassilev y Vassileva, 2003; Vassilev et al., 2006; Vassileva et al., 2010; Medina et al., 2010). En particular el residuo DOC fermentado con *Aspergillus niger* en presencia de fosfato de roca constituye una enmienda orgánica rica en fósforo disponible y polisacáridos, que puede mejorar la calidad física y biológica, así como la productividad de los suelos en áreas degradadas de zonas mediterráneas semiáridas. El empleo de DOC tratado microbiológicamente como enmienda orgánica del suelo, en presencia de fosfato de roca, puede ser una forma de mejorar la calidad y la productividad de los suelos en áreas degradadas de zonas mediterráneas semiáridas. Sin embargo, no hay información disponible sobre el uso de tales materiales en programas de revegetación.

Las leguminosas leñosas son útiles para la revegetación de los ecosistemas semiáridos que tienen una baja disponibilidad de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes, debido a su capacidad para desarrollar asociaciones simbióticas con rhizobium y hongos micorrícicos (Valladares et al., 2002; Caravaca et al., 2003b,2004; Alegre et al., 2004; González-Andrés et al., 2005). *Dorycnium pentaphyllum* L. es un arbusto leguminoso de crecimiento lento, que pertenece a la sucesión natural en ciertas comunidades vegetales de los ecosistemas mediterráneos semiáridos en el sudeste de España. También está bien

adaptada a las condiciones de estrés hídrico y, por lo tanto, potencialmente se podría utilizar en el restablecimiento de la vegetación en zonas degradadas semiáridas. La colonización micorrícica bajo estrés hídrico se ha demostrado que es importante para la asimilación de nitrógeno y para mitigar los efectos perjudiciales de la sequía en las plantas de *D. pentaphyllum* establecidas en suelos relativamente secos (Caravaca et al., 2003c,2004; Garcia-Estringana et al., 2013). Sin embargo, el conocimiento de las estrategias de reforestación que involucran *D. pentaphyllum* es todavía muy escaso.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que los hongos micorrícicos arbusculares (MA) pueden mejorar la capacidad de las plantas para establecerse en un medio semiárido con suelos degradados (Jeffries et al., 2003; Smith y Read, 2008; Barea et al., 2011). Se ha demostrado que la actividad de las micorrizas se encuentra claramente mermada por la desertificación en los ecosistemas mediterráneos semiáridos (Azcón-Aguilar et al., 2003). Un correcto manejo de la simbiosis micorrícica puede contribuir notablemente al éxito de los programas de reforestación (Jeffries et al., 2003). El establecimiento de la simbiosis con los hongos MA también parece depender de la concentración de compuestos fenólicos presentes en el suelo (Leadir et al., 1997; Mandal et al., 2010). Recientemente, se ha demostrado que el efecto de los compuestos fenólicos contenidos en los residuos DOC sobre la colonización en la raíz de plantas micorrizadas puede variar con el tipo de hongos y el momento de la inoculación (Martín et al., 2002; Medina et al., 2010).

Los objetivos de este estudio fueron: (1) evaluar la eficacia del tratamiento combinado que implica la adición de residuo de alperujo DOC tratado con *A. niger*, en presencia de fosfato de roca, además de la inoculación de micorrizas en las plántulas, para mejorar la calidad estructural y biológica del suelo de un área mediterránea semiárida degradada, y (2) determinar la influencia de tales mejoras en el establecimiento de las plántulas de *D. pentaphyllum*. La calidad del suelo se evaluó mediante la evaluación de las fracciones lábiles de carbono (carbohidratos y carbono hidrosoluble), las actividades enzimáticas (deshidrogenasa, proteasa-BAA, fosfatasa ácida y  $\beta$ -glucosidasa) y la estabilidad de los agregados del suelo.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1. Área de estudio

El área experimental se encuentra en Los Cuadros en la provincia de Murcia (sureste de España) (coordenadas: 1°05' O y 38°10' N). El clima es mediterráneo semiárido con una precipitación media anual de 300 mm y una temperatura media anual de 19,2° C; la evapotranspiración potencial es elevada alcanzando 1.000 mm al año. El suelo utilizado fue un Haplocalcid típico (Soil Survey Staff, 2010) desarrollado a partir de sedimentos cuaternarios (Tabla 2 capítulo Materiales y Métodos).

### 5.2.2. Materiales

El alperujo (DOC), un material lignocelulósico procedente de una almazara situada en Granada, se secó a 60° C en un horno y después se molió en fragmentos de 2 mm. El residuo de alperujo se sometió a un proceso de fermentación estática con *A. niger*, en presencia de fosfato de roca, de acuerdo a la biotecnología descrita en “Materiales y Métodos”. Las características del DOC después de la fermentación fueron: pH 4,0; conductividad eléctrica (1:10), 1.231  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , P total, 0,38 %; N total, 0,62 %; C orgánico total 22,2 % y C hidrosoluble 1.146  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Como especie vegetal para el experimento de reforestación se utilizó *Dorycnium pentaphyllum* Scop. Ésta es una leguminosa arbustiva presente de modo natural en el área de estudio, que se encuentra generalmente en los matorrales semiáridos en el sudeste de España.

### 5.2.3. Inoculación micorrícica de las plántulas

Los hongos micorrícicos utilizados en el experimento, *Glomus intraradices* Schenck y Smith, *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss. y Menge) y *Glomus mosseae* (Nicol y Gerd.) Gerd. y Trappe. La nomenclatura botánica actual reconoce estas denominaciones como sinónimos, sin embargo se ha preferido mantener la nomenclatura que coincide con los registros de la colección de procedencia.

El inóculo micorrícico consistió en una mezcla de suelo rizosférico obtenido con un cultivo trampa (*Sorghum sp.*) que contiene esporas, hifas y fragmentos de raíz micorrizada. Las plántulas, una vez germinadas, se trasplantaron en el sustrato de crecimiento, formado por turba y fibra de coco (1:1, v:v). El inóculo de micorrizas arbusculares correspondiente se aplicó a razón del 5 % (v/v). Se añadió la misma cantidad de una mezcla autoclavada de inóculo para las plantas control, complementadas con un filtrado (papel Whatman no. 1) del mismo inóculo para proporcionar las poblaciones microbianas que acompañan a los hongos micorrícicos. Las plántulas inoculadas y no inoculadas se cultivaron durante 8 meses bajo condiciones de vivero sin ningún tratamiento de fertilización. Las plantas se mantuvieron a temperaturas de 30° C/10° C máximas/mínimas respectivamente, y entre el 85 % y 40 % de humedad relativa. La radiación fotosintética activa (PAR) tuvo un promedio de 240  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las plantas fueron regadas regularmente con agua corriente.

#### 5.2.4. Diseño y factores experimentales

Se estableció un diseño factorial (2 x 4) en bloques al azar con dos factores y cinco bloques de repetición. El primer factor fue la adición del residuo fermentado DOC al suelo, y la segunda fue la inoculación de las plantas de *D. pentaphyllum*, con tres hongos MA (*G. intraradices*, *G. deserticola* o *G. mosseae*) en el vivero.

Cada bloque de replicación fue de 180 m<sup>2</sup> (12,5 x 14,5 m). Se cavaron manualmente hoyos de plantación de 40 x 40 cm<sup>2</sup> y 30 cm de profundidad. En febrero de 2011, se añadió el residuo fermentado DOC a los hoyos de plantación, mezclándolo manualmente con el suelo en proporción del 5 % (p:p). Las plántulas (inoculadas y no inoculadas) se plantaron en cada hoyo a 1 metro de distancia unas de otras, con 3 metros de separación entre bloques. Se plantaron 64 plantas por bloque de repetición (ocho plantas x ocho tratamientos en cada bloque).



#### 5.2.5. Procedimiento de muestreo

Se recolectaron cinco muestras de suelo en cada tratamiento un año después de la plantación (una por bloque) obteniendo 40 muestras de suelo en total. Cada muestra consistió en ocho submuestras ( $200\text{ cm}^3$  de suelo), recogidas al azar (0-20 cm) de la rizosfera de ocho plantas individuales. Para recolectar el suelo rizosférico de la planta adherido a las raíces se introdujo en una bolsa de plástico, se sacudió y se separó el suelo de la rizosfera del sistema radicular. El muestreo se llevó a cabo a principios de abril (antes de la estación seca), cuando se esperaba una actividad microbiana mayor (Lax et al., 1997). Cinco plantas de cada tratamiento (una por bloque) fueron cosechadas un año después de la plantación, coincidiendo con el final de la etapa de floración.

#### 5.2.6. Análisis de la planta

Un año después de la plantación, se registraron datos de la biomasa fresca y seca ( $65^\circ\text{ C}$ , 24 h) de la parte aérea y radicular. El porcentaje de colonización por hongos micorrícicos arbusculares fue calculado por el método de

intersección de cuadrícula (Giovannetti y Mosse, 1980) después de la tinción con azul tripán (Phillips y Hayman, 1970).

#### *5.2.7. Análisis físico-químico, químico y bioquímico del suelo*

El pH del suelo y la conductividad eléctrica se midieron en una solución acuosa 1:5 (p/v). En el mismo extracto acuoso del suelo se determinó el carbono hidrosoluble en un analizador de carbono para muestras líquidas Shimadzu TOC- 5050A. Los carbohidratos hidrosolubles se determinaron por el método de Brink et al. (1960). El nitrógeno total se determinó con un analizador elemental C/N modelo Flash EA 1112 Series-LECO TRUSPEC. El fósforo asimilable se extrajo con  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M y se determinó por colorimetría de acuerdo con Olsen et al. (1954).

La actividad deshidrogenasa se determinó de acuerdo con García et al. (1997). La actividad proteasa-BBA se determinó en tampón fosfato 0,1 M a pH 7; se utilizó BAA 0,03 M como sustrato (Nannipieri et al., 1980). La actividad fosfatasa ácida se determinó utilizando *p*-nitrofenil fosfato disódico como sustrato (Tabatabai y Bremner, 1969). La actividad  $\beta$ -glucosidasa se determinó usando el método descrito por Tabatabai (1982). Los métodos se encuentran más detalladamente descritos en el capítulo de “Materiales y Métodos”.

#### *5.2.8. Análisis físico*

La estabilidad de agregados (EA) se midió de acuerdo a Roldán et al. (1994b), basado en el método de Benito et al. (1986). Este método examina la proporción de agregados que permanecen estables después de que una muestra de suelo (tamizado entre 0,25-4 mm) se somete a una lluvia artificial de energía conocida ( $270 \text{ J/m}^2$ ).

#### *5.2.9. Análisis estadístico*

Los datos fueron transformados logarítmicamente para lograr la normalidad. Para los datos de porcentaje de agregados estables y colonización micorrícica se utilizó la transformación arcoseno. Los efectos de la adición del residuo fermentado DOC, la inoculación con hongos micorrícicos, y sus interacciones, fueron determinados mediante un análisis de la varianza de dos vías y las comparaciones entre las medias se realizaron mediante el test de Tukey

calculado para  $P < 0,05$ . Los procedimientos estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS 18.0 para Windows.

### 5.3. RESULTADOS

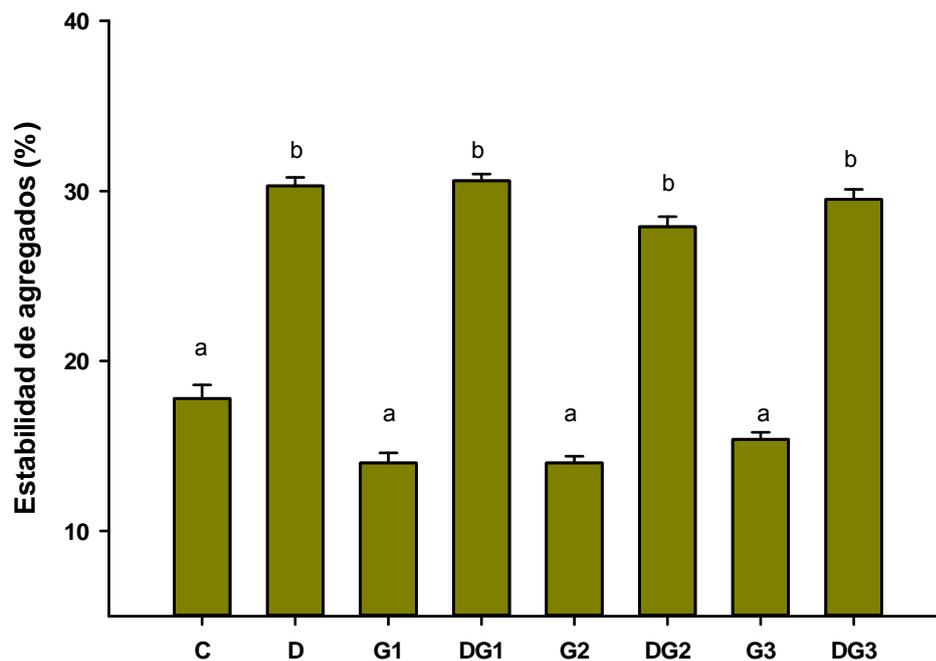
#### 5.3.1. Parámetros físico-químicos

Sólo la adición del residuo DOC fermentado disminuyó ligeramente el pH y aumentó la conductividad eléctrica del suelo (Tablas 1 y 2). Sin embargo, ni la inoculación micorrícica ni la interacción del residuo fermentado y la inoculación micorrícica tuvieron efecto significativo sobre los parámetros físico-químicos del suelo (Tabla 2).

**Tabla 1.** Variaciones en las propiedades físico-químicas de la rizosfera de *D. pentaphyllum* en respuesta a los distintos tratamientos de inoculación micorrícica y a la adición de DOC fermentado, un año después de la plantación (n=5).

	pH (H <sub>2</sub> O)	CE (1:5, μS cm <sup>-1</sup> )	N total (g kg <sup>-1</sup> )	P disponible (μg g <sup>-1</sup> )
<b>C</b>	8,73±0,04d	302±6a	0,70±0,01a	1,5±0,1a
<b>D</b>	8,53±0,01abc	361±6b	1,06±0,02d	5,5±0,1c
<b>G1</b>	8,68±0,01cd	323±7ab	0,73±0,00a	1,6±0,1a
<b>DG1</b>	8,59±0,01abcd	346±3ab	0,97±0,03bcd	4,0±0,1b
<b>G2</b>	8,64±0,02bcd	324±6ab	0,82±0,01ab	1,9±0,1a
<b>DG2</b>	8,52±0,01ab	340±5ab	0,96±0,03bcd	4,7±0,3bc
<b>G3</b>	8,66±0,01bcd	326±7ab	0,83±0,01abc	1,8±0,1a
<b>DG3</b>	8,47±0,01a	353±4ab	1,02±0,02cd	4,4±0,1bc

CE= conductividad eléctrica. C= control; D= adición de DOC fermentado; G1= inoculación con *G. intraradices*; DG1= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. intraradices*; G2= inoculación con *G. deserticola*; DG2= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. deserticola*; G3= inoculación con *G. mosseae*; DG3= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. mosseae*. Media ± error estándar. Los valores en la misma columna compartiendo una o más letras no difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) según el test de Tukey.



**Figura 1.** Variaciones en la estabilidad de agregados en la rizosfera de *D. pentaphyllum* en respuesta a los distintos tratamientos de inoculación micorrícica y a la adición de DOC fermentado, un año después de la plantación (n=5). C= control; D= adición de DOC fermentado; G1= inoculación con *G. intraradices*; DG1= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. intraradices*; G2= inoculación con *G. deserticola*; DG2= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. deserticola*; G3= inoculación con *G. mosseae*; DG3= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. mosseae*. Media  $\pm$  error estándar. Las barras verticales que comparten una o más letras no difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) según el test de Tukey.

El contenido de fósforo asimilable y de nitrógeno total fueron mayores en el suelo enmendado que en los suelos con los tratamientos de inoculación micorrícica y el suelo control (Tabla 1). El mayor incremento debido a la adición del residuo DOC fermentado se observó en el contenido de fósforo asimilable en el suelo enmendado (aproximadamente un 400% mayor que en el suelo no enmendado). La adición del residuo orgánico aumentó el porcentaje de agregados estables alrededor de un 66 %, independientemente de la inoculación con hongos MA (Figura 1).

**Tabla 2.** ANOVA de dos factores (D= adición de DOC fermentado e I= inoculación micorrícica) para todos los parámetros estudiados en la rizosfera de las plántulas de *D. pentaphyllum*. Valores de significación (*P*).

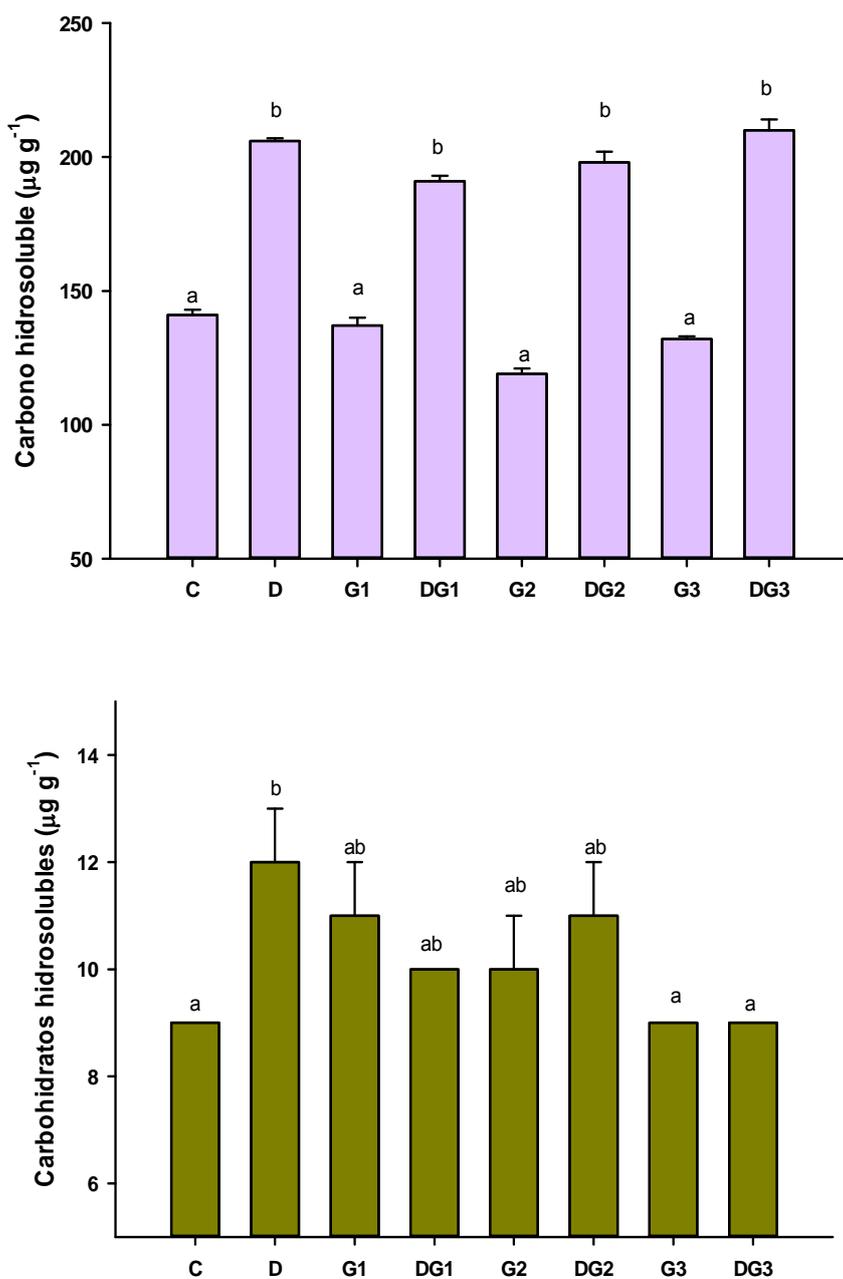
	Adición enmendante (D)	Inoculación micorrícica (I)	Interaction (D x I)
pH	45,7 (<0,001)	2,5 (0,082)	1,3 (0,283)
Conductividad eléctrica	4,5 (0,045)	2,3 (0,105)	1,1 (0,102)
N total	65,6 (<0,001)	1,2 (0,332)	2,9 (0,057)
P disponible	203,7 (<0,001)	2,4 (0,095)	3,2 (0,043)
Estabilidad de agregados	324,8 (<0,001)	2,6 (0,074)	1,2 (0,342)
C hidrosoluble	124,0 (<0,001)	1,2 (0,339)	0,9 (0,424)
Carbohidratos hidrosolubles	5,5 (0,028)	2,8 (0,064)	4,1 (0,018)
Deshidrogenasa	83,0 (<0,001)	22,3 (<0,001)	4,0 (0,019)
Proteasa	7,1 (0,014)	7,1 (0,001)	17,9 (<0,001)
Fosfatasa	4,6 (0,041)	7,5 (0,001)	7,0 (0,001)
$\beta$ -glucosidasa	17,8 (<0,001)	13,3 (<0,001)	14,6 (<0,001)
Biomasa aérea	718,2 (<0,001)	699,9 (<0,001)	5,4 (0,002)
Colonización	0,2 (0,649)	82,3 (<0,001)	0,3 (0,853)

### 5.3.2. Parámetros bioquímicos

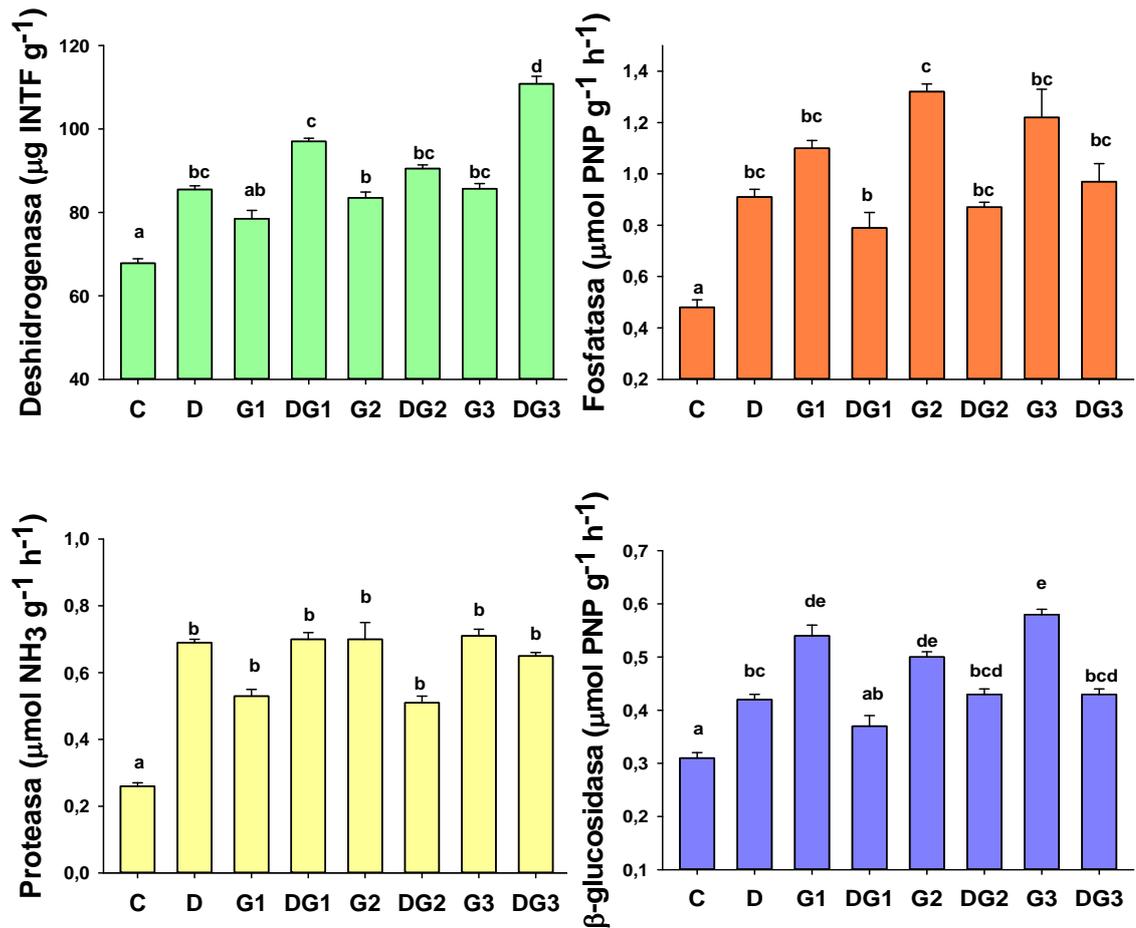
Los valores de carbohidratos y carbono hidrosolubles se incrementaron sólo con la adición de la enmienda (Tabla 2 y Figura 2), los mayores incrementos se observaron en la fracción de carbono soluble en agua (en promedio alrededor del 43 % mayor que el suelo no enmendado).

En el suelo rizosférico de los tratamientos enmendados y con la inoculación micorrícica se registraron actividades enzimáticas significativamente más altas (deshidrogenasa, proteasa-BAA, fosfatasa ácida y  $\beta$ -glucosidasa) que en el suelo control (Figura 3). Todos los parámetros bioquímicos fueron similares (para deshidrogenasa, fosfatasa y proteasa-BAA actividades ácido) o incluso más altos (para la actividad  $\beta$ -glucosidasa) en los suelos de los tratamientos con inoculación micorrícica, en comparación con el suelo enmendado. En general, en los tratamientos combinados, que implican la inoculación micorrícica de las plántulas con cualquiera de los hongos MA y adición del

DOC fermentado al suelo, se observaron variaciones de los parámetros bioquímicos del suelo en un grado igual o menor que en cada tratamiento aplicado por separado.



**Figura 2.** Variaciones de las fracciones de carbono orgánico en la rizosfera de *D. pentaphyllum* en respuesta a los distintos tratamientos de inoculación micorrícica y a la adición de DOC fermentado, un año después de la plantación (n=5). C= control; D= adición de DOC fermentado; G1= inoculación con *G. intraradices*; DG1= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. intraradices*; G2= inoculación con *G. deserticola*; DG2= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. deserticola*; G3= inoculación con *G. mosseae*; DG3= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. mosseae*. Media  $\pm$  error estándar. Las barras verticales que comparten una o más letras no difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) según el test de Tukey.

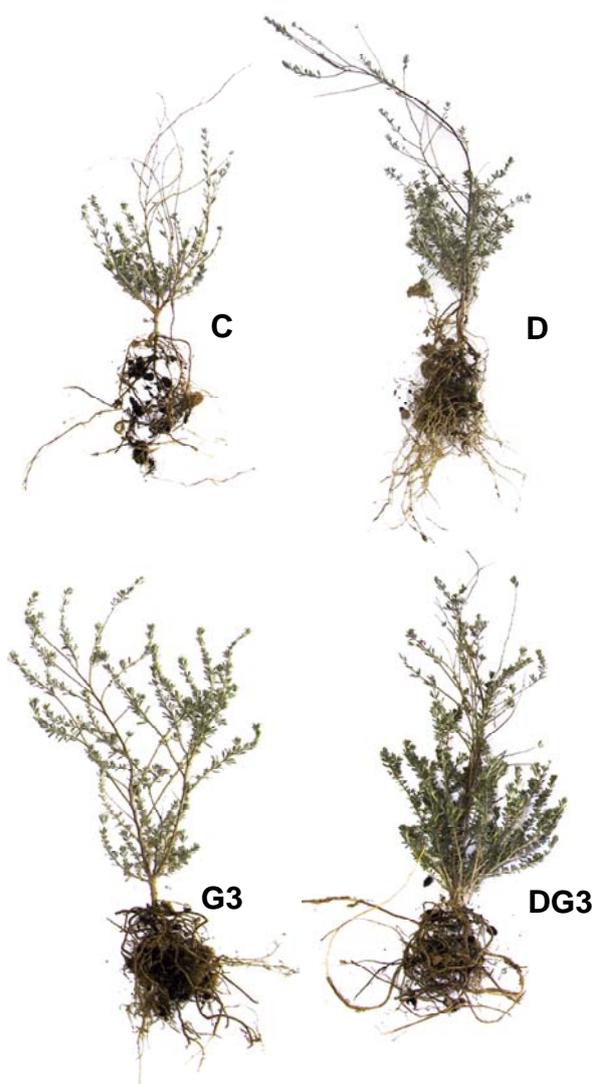


**Figura 3.** Variaciones en las actividades enzimáticas en la rizosfera de *D. pentaphyllum* en respuesta a los distintos tratamientos de inoculación micorrícica y a la adición de DOC fermentado, un año después de la plantación (n=5). C= control; D= adición de DOC fermentado; G1= inoculación con *G. intraradices*; DG1= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. intraradices*; G2= inoculación con *G. deserticola*; DG2= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. deserticola*; G3= inoculación con *G. mosseae*; DG3= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. mosseae*. Media  $\pm$  error estándar. Las barras verticales que comparten una o más letras no difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) según el test de Tukey.

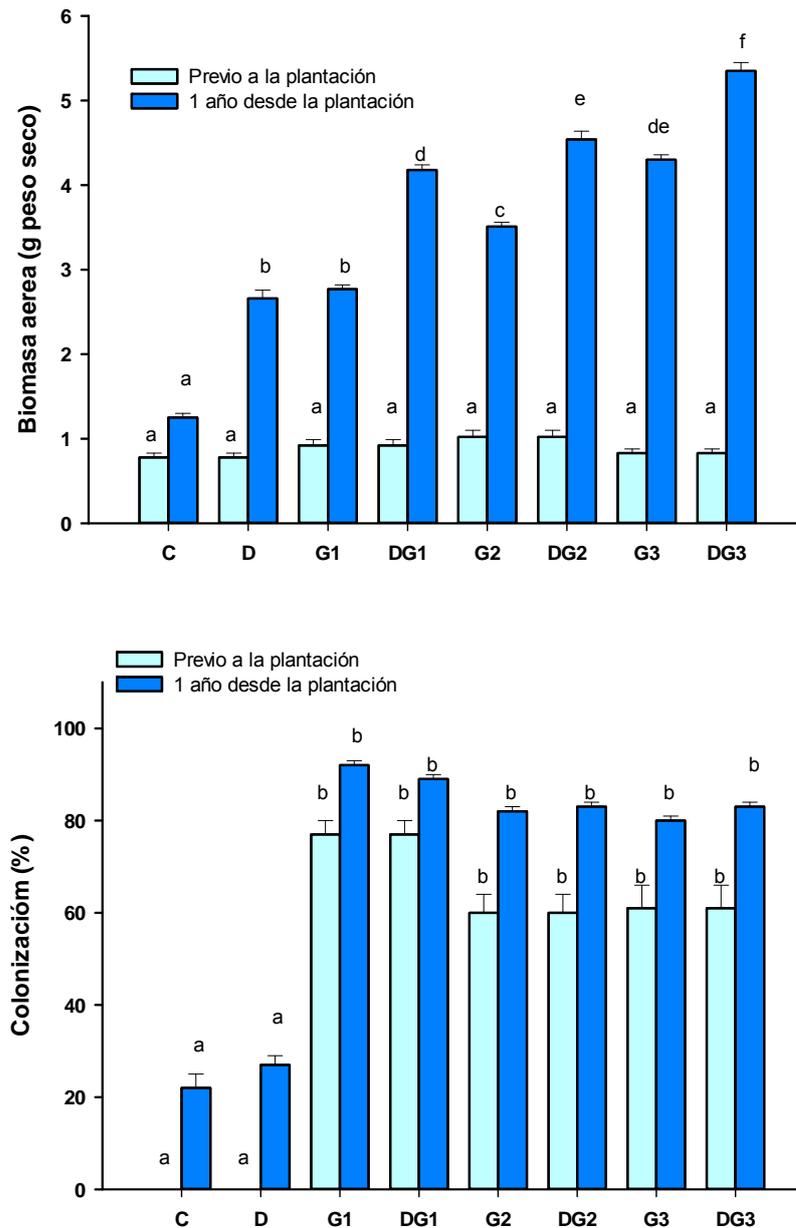
### 5.3.3. Crecimiento y colonización micorrícica de *D. pentaphyllum*

En el momento de la plantación, el peso seco aéreo de las plantas de *D. pentaphyllum* inoculadas fue ligeramente mayor que el de las plantas no inoculadas (Figura 4). Un año después de la plantación, tanto la adición del residuo DOC fermentado como los tratamientos de inoculación micorrícica

estimularon significativamente la producción de biomasa de las plantas de *D. pentaphyllum* con respecto a las plantas control (Figura 4 y Tabla 2). Los tratamientos de inoculación micorrícica aumentaron el crecimiento de las plantas en un mayor grado que la adición del residuo fermentado, y la combinación de ambos factores produjo un crecimiento de la planta incluso mayor (Tabla 2). El tratamiento combinado de la adición del residuo DOC fermentado y la inoculación de las plantas con *G. mosseae* produjo el mayor efecto sobre la biomasa aérea (en promedio, 328 % mayor que las plantas control).



**Imagen 1.** Diferencias en la biomasa aérea y en las raíces de *D. pentaphyllum* en respuesta a los distintos tratamientos de inoculación micorrícica y a la adición de DOC fermentado, un año después de la plantación. C= control; D= adición de DOC fermentado; G3= inoculación con *G. mosseae*; DG3= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. mosseae*.



**Figura 4.** Variaciones en la biomasa aérea y porcentaje de micorrización en las raíces de *D. pentaphyllum* en respuesta a los distintos tratamientos de inoculación micorrícica y a la adición de DOC fermentado, un año después de la plantación. C= control; D= adición de DOC fermentado; G1= inoculación con *G. intraradices*; DG1= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. intraradices*; G2= inoculación con *G. deserticola*; DG2= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. deserticola*; G3= inoculación con *G. mosseae*; DG3= adición de DOC fermentado e inoculación con *G. mosseae*. Las barras indican el error estándar de la media (n=5). Para cada fecha de muestreo, las barras verticales que comparten una o más letras no difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) según el test de Tukey.

Antes de la plantación en campo, los porcentajes de colonización micorrícica en las raíces de las plantas inoculadas con *G. intraradices*, *G. deserticola* o *G. mosseae* fueron de 77y 61% respectivamente (Figura 4). Un año después de la plantación, la infección micorrícica en las raíces de las plantas inoculadas había aumentado notablemente, registrándose niveles similares para todos los tratamientos de inoculación. La colonización natural produjo alrededor de un 25 % de infección en las raíces de las plántulas control.

## 5.4. DISCUSIÓN

### 5.4.1. Efecto del residuo DOC fermentado

Los resultados de este estudio demuestran la viabilidad de aplicar el residuo DOC, fermentado en presencia de fosfato de roca, con el fin de mejorar la implantación de *D. pentaphyllum*. Del mismo modo, la ausencia de un efecto negativo de este residuo fermentado sobre el crecimiento de *D. pentaphyllum* podría estar relacionado con la eliminación de las sustancias fitotóxicas contenidas en el DOC durante el proceso de fermentación. En esta misma zona, se realizó un estudio previo en el que la adición de un residuo de remolacha de azúcar, fosfato de roca y *Aspergillus niger*, aplicado directamente en el hoyo de plantación, fue menos eficaz (aproximadamente el 33 % mayor que las plantas control) para mejorar el crecimiento de *D. pentaphyllum* que el residuo DOC fermentado (aproximadamente 113 % mayor que las plantas control) utilizado en este estudio (Caravaca et al., 2004). La eficacia del residuo DOC fermentado con respecto a la estimulación del crecimiento de las plantas podría ser atribuible a una mejora en el suministro de nutrientes disponibles en el suelo. Durante la fermentación del alperujo con *A. niger*, tuvo lugar paralelamente la solubilización del fosfato de roca, aumentando, el contenido de fósforo disponible en el residuo fermentado (Vassilev et al., 1998). Por lo tanto, el uso del residuo DOC fermentado mejoró la productividad del suelo, aumentando la concentración en el suelo de nutrientes potencialmente limitantes, tales como N y P. Los beneficios de las enmiendas orgánicas también pueden ser debidos a la mejora de las características físicas del suelo, que a su vez favorece la creación y viabilidad de una cubierta vegetal estable

(Roldán et al., 1996; Cox et al., 2001; Caravaca et al., 2003a; Nicolás et al., 2014). En este sentido, el residuo DOC fermentado mejoró la estabilidad estructural del suelo rizosférico de *D. pentaphyllum* en un grado estadísticamente significativo. Varios autores mostraron que la restauración de la estructura del suelo puede depender de la cantidad y la naturaleza de la materia orgánica añadida, así como de la mineralogía del suelo (Roldán et al., 1996; Bossuyt et al., 2001; Paradelo et al., 2013). Las transformaciones biológicas que el residuo DOC sufrió durante la fermentación pudieron aumentar la cantidad de agentes potencialmente favorecedores de la formación y estabilización de agregados, tales como carbohidratos y carbono hidrosolubles. En particular, en el suelo se registraron incrementos notables en el contenido de carbono hidrosoluble como consecuencia de la adición del residuo DOC fermentado. La fracción de materia orgánica soluble en agua consiste en una mezcla heterogénea de componentes de peso molecular variable, tales como mono- y polisacáridos, polifenoles, proteínas y ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Esta fracción puede ser utilizada como fuente de carbono y de energía por la microflora del suelo (Roldán et al., 1994b; Caravaca et al., 2004) y está relacionada positivamente con la actividad microbiana (de Luca y Keeney, 1993). La actividad deshidrogenasa, se ha utilizado con frecuencia como un indicador de la actividad microbiana del suelo (García et al., 1997), mientras que los procesos relacionados con la degradación de la materia orgánica por la actividad microbiana pueden ser estimados mediante las actividades hidrolasas (Ceccanti y García, 1994; Caldwell, 2005; Burns et al., 2013). En nuestro experimento se constató un aumento de la actividad biológica puesto de manifiesto por las variaciones en la deshidrogenasa y actividades hidrolasas. El residuo orgánico aquí utilizado puede ser a corto plazo más eficaz que otros residuos, como los lodos de depuradora y residuos sólidos urbanos, ampliamente utilizados para mejorar la estructura del suelo en condiciones mediterráneas semiáridas (Caravaca et al., 2003a; Nicolás et al., 2014). La fermentación del residuo de alperujo (DOC) con *A. niger* se puede considerar como una biotecnología eficaz de valorización del mismo para su uso como una enmienda del suelo, ya que se ha visto que la aplicación de este mismo residuo no fermentado tiene efectos perjudiciales sobre las propiedades físicas, químicas y la calidad microbiológica del suelo

(Riffaldi et al., 1993; Sampedro et al., 2004). Sin embargo, el proceso de fermentación implica dificultades relacionadas con el control y regulación del proceso, así como limitaciones de escala del proceso de producción. Por esta razón, el uso del residuo DOC fermentado en programas de revegetación no puede considerarse todavía como una alternativa viable para la eliminación de estos residuos.

#### 5.4.2. Efecto de los tratamientos de inoculación micorrícica

La inoculación con cualquiera de los hongos MA demostró ser un método eficaz para fomentar el crecimiento de las plántulas de *D. pentaphyllum*. La inoculación micorrícica puede incrementar la absorción de nutrientes, especialmente de P, favoreciendo el desarrollo del sistema radicular y produciendo sustancias que promueven el crecimiento de las plántulas (Jeffries et al., 2003; Smith y Read, 2008; Barea et al., 2011). Es importante destacar que los tratamientos de inoculación con *G. deserticola* o *G. mosseae* fueron más eficaces que la adición del residuo DOC fermentado, para mejorar el rendimiento de las plantas de *D. pentaphyllum* bajo condiciones semiáridas (durante el curso del experimento, sólo se registraron 130 mm de lluvia). Estos resultados reafirman el papel clave de las micorrizas en el mantenimiento de la cubierta vegetal en los suelos con escasez de fósforo disponible, además de mostrar la necesidad de incluir la inoculación micorrícica para garantizar el funcionamiento de las plantas en los programas de revegetación. Los tratamientos de inoculación micorrícica mostraron diferentes niveles de eficacia con respecto a su capacidad para mejorar el crecimiento de las plántulas de *D. pentaphyllum*. El tratamiento con *G. mosseae* fue el más eficaz, sin embargo, ésto no se relacionó con los porcentajes de colonización de la raíz, ya que todas las plantas inoculadas presentaron altas tasas de infección por hongos MA, sin diferencias significativas para ente tratamientos de inoculación.

#### 5.4.3. Efecto del tratamiento combinado

Este experimento mostró que la combinación del residuo DOC fermentado y la inoculación micorrícica puede mejorar considerablemente el crecimiento de *D. pentaphyllum* en condiciones semiáridas. Este resultado contrasta con la idea ampliamente aceptada de que las micorrizas presentan poca ventaja para las

plántulas cultivadas en suelos fertilizados (Yanai et al., 1995; Treseder, 2004). El rápido crecimiento en el suelo enmendado de las plántulas inoculadas con hongos MA, en comparación con las plantas no inoculadas, podría estar relacionado con la capacidad del hongo para aumentar la captación de fósforo aportado con el DOC fermentado. Los hongos MA también pueden facilitar la acción o la transferencia de sustancias tóxicas para las plantas (Martín et al., 2002; Medina et al., 2011). Sin embargo, no se observó ningún efecto negativo del residuo DOC fermentado sobre el crecimiento de las plantas colonizadas por MA. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la fitotoxicidad del residuo DOC fue eliminada durante el proceso de fermentación con *A. niger*.

La adición del residuo DOC fermentado, la inoculación con los hongos MA y la combinación de ambos tratamientos no tuvieron ningún efecto significativo en la supervivencia de la planta. En las primeras etapas de crecimiento (1 año después de la siembra), que son las más críticas para la revegetación en zonas semiáridas mediterráneas, la supervivencia de las plantas osciló entre el 60 y el 75% para todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos.

Podemos concluir que tanto la aplicación del residuo de alperujo fermentado como la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares resultaron ser efectivos bioenmendantes para mejorar la calidad biológica del suelo. Sin embargo, sólo el residuo de alperujo fermentado fue capaz de mejorar la estabilidad estructural del suelo y promover el crecimiento de *D. pentaphyllum*. El uso de hongos micorrícicos arbusculares en combinación con el DOC fermentado aumentó la resistencia de las plántulas frente a las condiciones ambientales desfavorables.



**Efecto de diferentes prácticas agrícolas sobre la estabilidad estructural del suelo y la tasa de erosión en un agroecosistema mediterráneo semiárido**



## RESUMEN

Las prácticas agrícolas inadecuadas pueden causar una pérdida de la calidad del suelo, aumentar la erodibilidad y provocar la desertización del mismo en condiciones ambientales de clima mediterráneo.

El experimento de campo se realizó en la estación experimental El Teularet en la Sierra de Enguera (provincia de Valencia) situada al sureste de la península ibérica. Se ha estudiado la influencia de diferentes prácticas agrícolas durante un periodo de 5 años sobre los parámetros físicos, químicos y biológicos indicadores de la calidad del suelo (carbohidratos totales e hidrosolubles, proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP), carbono orgánico total, estabilidad de agregados, cobertura vegetal y erosión del suelo). Las prácticas agrícolas incluyeron el uso de un herbicida residual, laboreo, laboreo + avena, acolchado con paja de avena y control (campo abandonado). Los diferentes tratamientos fueron comparados con el suelo adyacente colonizado por vegetación natural. El mantillo de paja de avena contribuyó a incrementar los niveles de carbohidratos hidrosolubles, proteínas del suelo relacionadas con la glomalina y estabilidad de agregados. Este tratamiento también ayudó a disminuir la tasa de erosión dando unos valores similares al suelo con vegetación natural. Los niveles más bajos en carbohidratos hidrosolubles y proteínas del suelo relacionadas con la glomalina se registraron en las parcelas con laboreo, laboreo con siembra de avena y en las tratadas con herbicida. El mantenimiento y el incremento de los agregados estables pudieron ser atribuidos al aumento de las fracciones lábiles de C (carbohidratos) y al contenido de GRSP. Los resultados demuestran que el terreno abandonado (parcela control) o el uso de una cubierta vegetal (plantas o paja) contribuyen a incrementar la calidad del suelo y a reducir el riesgo de erosión. El estudio nos muestra que unas prácticas agrícolas sostenibles favorecen la recuperación de la calidad del suelo, y en este sentido la adición de paja como un mantillo puede considerarse la estrategia de manejo más efectiva.

## 6.1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es una práctica común en las zonas mediterráneas semiáridas desde hace 10.000 años. El arado, los incendios y el pastoreo han provocado una degradación del suelo aumentando la erosión, compactación y una reducción de materia orgánica debido a la adopción de prácticas agrícolas inadecuadas (Caravaca et al., 2002a; Cerdá et al., 2010; García-Ruiz, 2010). Existen evidencias de que estos procesos de degradación se han desarrollado durante milenios (Lynrintzis y Papanastasis 1995; Castro et al 2000; Gómez Gutierrez et al 2010). La erosión del suelo es especialmente intensa en los cultivos de secano como en el olivar de Andalucía (Gómez et al., 2003), en los cultivos de cítricos (Cerdá et al., 2009), en viñedos (Martínez-Casasnovas et al., 2000; Le Bissonnais et al., 2007; Casalí et al., 2009; Novara et al., 2011) y en cultivos en ladera (Atucha et al., 2013).

El problema de la erosión en los ambientes mediterráneos ha sido ampliamente estudiado (Cerdá et al., 2010; Ruiz-Sinoga et al., 2011), y durante la última década han recibido especial atención los estudios centrados en el impacto de la agricultura sobre la degradación de los suelos (Cerdá et al., 2007) y en la problemática de los campos abandonados (Seeger y Ries, 2010; García-Ruiz y Lana-Renault, 2011).

Tras más de treinta años de investigación sobre la erosión y degradación del suelo en ambientes mediterráneos, se ha llegado a la conclusión de que el manejo inadecuado del suelo es una de las principales causas de degradación del mismo. Por el contrario, un adecuado manejo del suelo puede proporcionar soluciones si se aplican prácticas agrícolas más sostenibles (Cerdá et al., 2010).

La desertización (degradación del suelo bajo condiciones áridas y semiáridas) se desencadena por una escasa cubierta vegetal. Esta cubierta en el Mediterráneo está condicionada por las condiciones climáticas severas, que se caracterizan por unas precipitaciones bajas e irregulares acompañadas de frecuentes sequías. Estas condiciones tienen un efecto negativo sobre la calidad del suelo y sobre el crecimiento de las plantas. Por estos motivos, los suelos degradados requieren estrategias para reducir la pérdida de calidad y minimizar los impactos que provocan su degradación.

El uso de cultivos de cobertura, la implementación del no laboreo o su reducción, la adición de restos de poda y el uso de un mantillo de paja son técnicas frecuentemente utilizadas en fincas experimentales para reducir la alta tasa de erosión en los agroecosistemas de secano en el sureste de España (García-Orenes et al., 2009). Los efectos de estas estrategias contribuyen a la reducción de la erosión del suelo (García-Orenes et al., 2010), aunque no se tiene constancia de que con estas estrategias se puedan recuperar las propiedades del suelo en su conjunto, y cuánto tiempo puede demorar este proceso.

La estabilización de los agregados del suelo depende de varios factores biológicos incluyendo polisacáridos extracelulares, hifas de los hongos, biomasa microbiana del suelo, raíces, aportes de carbono y nitrógeno de la materia orgánica fresca, sustancias húmicas (Lax y García-Orenes, 1993; Roldán et al., 1994 a,b; Amézketa, 1999; Daynes et al., 2013) y proteínas del suelo relacionadas con glomalina (glomalin-related soil proteins GRSP) procedentes de las micorrizas arbusculares (Wright y Anderson, 2000; Rillig y Mummey, 2006; Bedini et al., 2009; Spohn y Giani, 2010; Zhang et al., 2012).

La estabilidad de los agregados del suelo es una propiedad dinámica, que puede cambiar debido a las condiciones climáticas, las prácticas agrícolas y la descomposición de la materia orgánica fresca (Christensen 2001; Abiven et al., 2009). El cambio en la agregación del suelo en respuesta a las prácticas agronómicas requiere investigación, ya que la estructura del suelo juega un papel fundamental en la infiltración y en los procesos biológicos.

En este estudio, la hipótesis de partida es que las diferentes prácticas agrícolas pueden modificar la estabilidad de los agregados del suelo mediante cambios en la actividad biológica. Estos cambios pueden ser estimados con la determinación de los contenidos en carbohidratos hidrosolubles y proteínas del suelo relacionadas con la glomalina. El objetivo de este estudio fue determinar los efectos sobre la tasa de erosión y estabilidad estructural del suelo inducidos por diferentes prácticas agrícolas en un ambiente Mediterráneo semiárido. Como consecuencia, se podrían proponer alternativas a la agricultura tradicional adecuadas al ambiente semiárido en el este de España, así como establecer criterios para seleccionar la práctica agrícola más sostenible para un agroecosistema mediterráneo semiárido.

## 6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.2.1. Descripción del área experimental

El estudio se realizó en la estación experimental de El Teularet (García-Orenes et al., 2009; García-Orenes et al., 2010) situada en la Sierra de Enguera (38° 50' Norte; 0° 42' Oeste) en el sureste de la provincia de Valencia. Se trata de una zona de cultivo de secano donde ha predominado el cultivo del olivo, almendro y trigo durante el último siglo. En esta zona los suelos han sido intensamente arados durante siglos. El suelo es un Xerorthent Típico desarrollado sobre margas del Cretácico (Soil Survey Staff, 2010). El área tiene un clima Mediterráneo caracterizado por precipitaciones irregulares y largos periodos de sequía, normalmente durante los meses de junio a septiembre. La temperatura anual es de 14.2° C y la precipitación media anual de 479 mm al año, con máximos de lluvia en el otoño y la primavera.

### 6.2.2. Diseño y factores experimentales

Las parcelas experimentales se establecieron en otoño de 2003 en una terraza homogénea con una pendiente del 5% y sin vegetación. Este área fue arada para crear unas condiciones uniformes en el horizonte superficial del suelo antes de comenzar el experimento; también se llevó a cabo un muestreo en diferentes puntos a través de la terraza, donde los resultados del análisis no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las propiedades del suelo antes de llevar a cabo los distintos tratamientos (Tabla 2 del capítulo materiales y métodos). En febrero de 2004 se iniciaron los tratamientos con diferentes sistemas de manejo agrícola (Tabla 1). Para cada tratamiento se establecieron, incluyendo control, tres repeticiones (6 x 10 m<sup>2</sup>) y un área adyacente bajo vegetación natural se utilizó como referente de suelo de alta calidad. Los muestreos fueron llevados a cabo todos los meses de julio desde 2005 a 2009.

Los diferentes tratamientos fueron seleccionados tomando como referencia las prácticas más utilizadas por los agricultores del área de estudio: arado y aplicación de herbicidas; y se incluyeron técnicas de agricultura ecológica como

el mantillo con paja de avena o el cultivo de avena. Se seleccionó como parcela control un área agrícola abandonada.

**Tabla 1.** Descripción de las diferentes prácticas agrícolas.

Tratamientos	Descripción
HR Herbicida residual (Oxyfluorfen)	3 aplicaciones año <sup>-1</sup> (240 g l <sup>-1</sup> ); 1,5 kg ha <sup>-1</sup>
L Laboreo	4 veces año <sup>-1</sup> ; (profundidad 20 cm)
A+L Avena+Laboreo	Arado: 4 veces año <sup>-1</sup> ; (profundidad 20 cm) Siembra de avena 100% (se muele y se añade al suelo en primavera)
C Control	Campo abandonado con colonización natural
P Paja de avena	Dosis: 0,25 kg m <sup>-2</sup> año <sup>-1</sup> (paja troceada y añadida a la superficie del suelo como mantillo)
N Cobertura natural	Área adyacente no cultivada

### 6.2.3. Muestreo de suelos y análisis

Durante los 5 años que duró el experimento se tomaron 5 muestras de suelo de cada tratamiento en el mes de julio, cuando las propiedades del suelo se suponían estables. Las muestras de suelo húmedo se tamizaron a 2 mm y se almacenaron a 2° C para realizar los análisis químicos. Alícuotas de muestra de suelo se tamizaron entre 0,25-4 mm para determinar el porcentaje de agregados estables.

El carbono de la biomasa microbiana ( $C_{mic}$ ) fue determinado por el método de fumigación-extracción (Vance et al., 1987). La respiración basal del suelo se midió con un respirómetro (Micro-Oxymax, Columbus, OH, USA). Los carbohidratos totales (CHT) extraídos con ácido sulfúrico al 72 % y los carbohidratos hidrosolubles (1:5) se determinaron con el método de Brink et al. (1960). La metodología empleada aparece detallada en el capítulo “Materiales y Métodos”

Se determinó la fracción de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP) por el método de Wright y Upadhyaya (1996). El carbono orgánico total se determinó con un analizador elemental modelo LECO TruSpec. El contenido de materia orgánica (MO) se calculó multiplicando el carbono orgánico total por

el coeficiente de Waskman (1,72). La estabilidad de agregados (EA) se midió de acuerdo a Roldán et al. (1994b), basado en el método de Benito et al. (1986), siguiendo la metodología establecida que aparece en el capítulo de “Materiales y Métodos”.

Se llevaron a cabo cinco experimentos de simulación de lluvias en cada tratamiento, coincidiendo con cada fecha de muestreo, con el fin de determinar las pérdidas de suelo y agua de escorrentía. En total 150 experimentos (5 simulaciones x 6 tratamientos x 5 años) se realizaron durante el período de sequía estival, cuando la humedad del suelo es baja (<10%). La simulaciones de lluvia se realizaron tal y como viene descrito en el capítulo de materiales y métodos. Las tasas de escorrentía y concentración de sedimentos se utilizaron para calcular la producción de sedimentos, escorrentía total, coeficiente de escorrentía, infiltración, y las tasas de erosión (Cerdà, 1999). La cobertura vegetal fue medida en el campo como porcentaje de la superficie del suelo cubierta por las plantas.

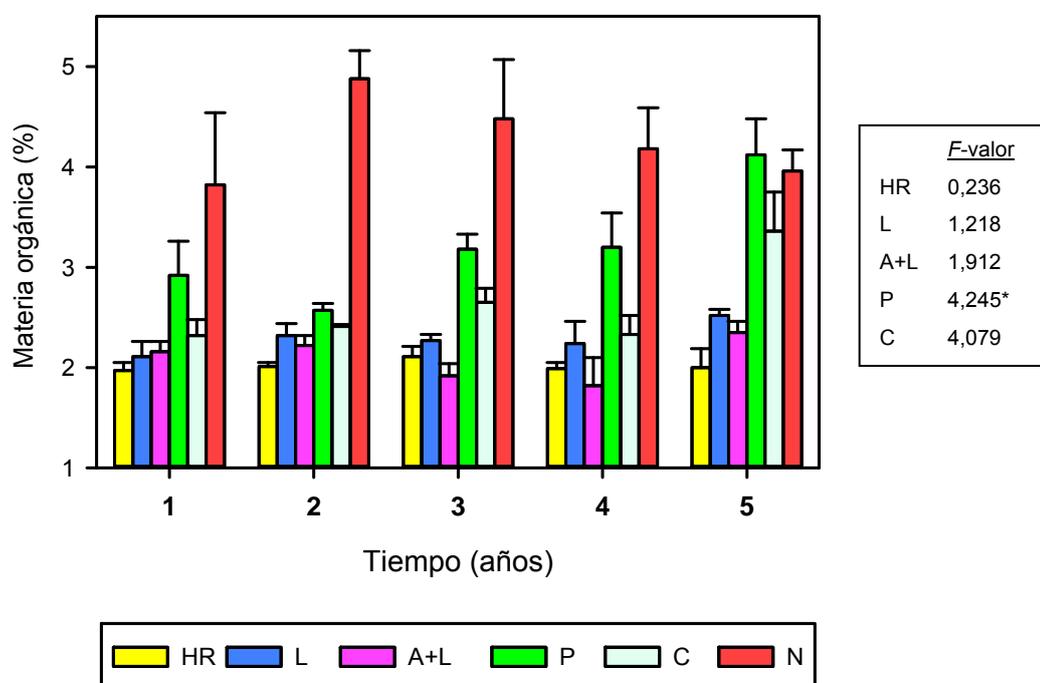
#### *6.2.4. Análisis estadístico*

La normalidad de los datos se comprobó con el test de Kolmogorov-Smirnov. Para variables que presentaban una distribución log normal se emplearon datos transformados logarítmicamente. Para los datos de porcentaje de agregados estables y de cobertura vegetal se utilizó la transformación arcseno. Se realizó un análisis de la varianza para conocer el efecto de los diferentes tratamientos y fecha de muestreo sobre las variables analizadas y la comparación entre las medias se realizó usando el test de Tukey calculado a  $P < 0,05$ . Para dilucidar relaciones entre los diferentes parámetros se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Los procedimientos estadísticos se realizaron con el paquete de software SPSS 18.0 para Windows.

### **6.3. RESULTADOS**

El mayor contenido de materia orgánica en el suelo, con un valor medio de 4,5 %, se encontró en las parcelas no cultivadas con vegetación natural (N) (Fig. 1) y no se hallaron diferencias significativas durante los cinco años del experimento. La parcela que contiene la vegetación natural de maquis fue

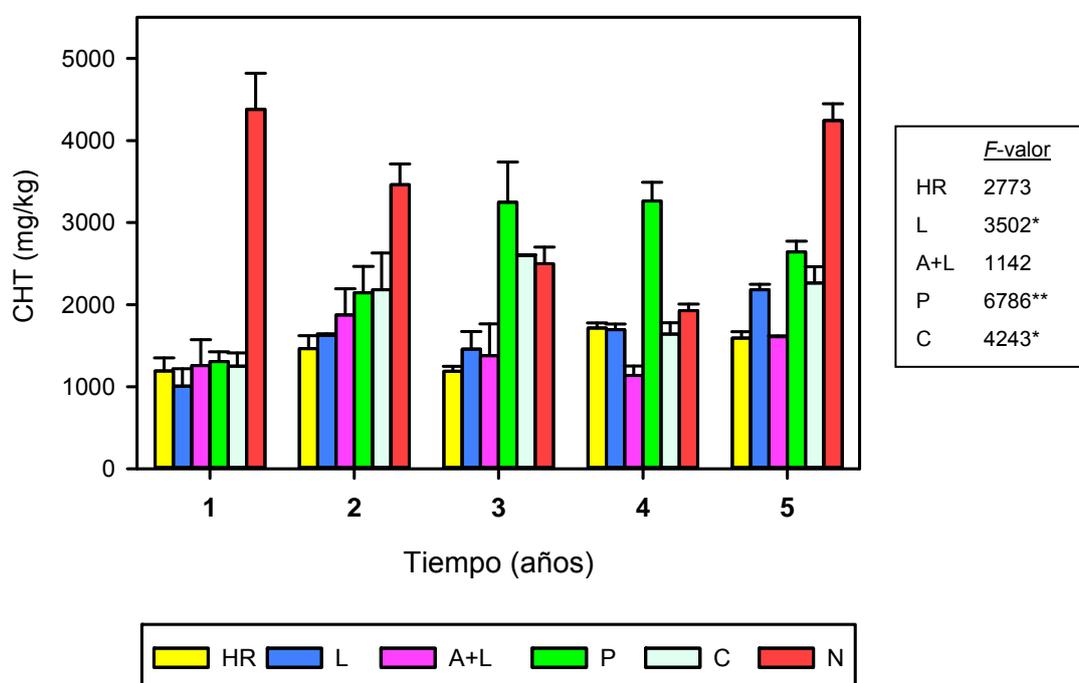
considerada como un sistema de referencia y no como un tratamiento. En esta parcela encontramos un 98% de cobertura vegetal con especies arbustivas como *Quercus coccifera* L., *Pistacia lentiscus* L., *Juniperus oxycedrus* L. y herbáceas como *Brachypodium retusum* (Pers) Beauv. Con respecto a los tratamientos, se observó un importante aumento del contenido de materia orgánica en el suelo después de la adición de paja de avena (P), que alcanzó los mismos valores que en el suelo de las parcelas no cultivadas cinco años después del establecimiento del experimento. El resto de los tratamientos (HR, L, A+L, C) mostraron un contenido de carbono orgánico similar (2%), sin variaciones significativas durante el período experimental.



**Figura 1.** Evolución temporal de la materia orgánica en la capa arable (0-20 cm) de los diferentes tratamientos agrícolas. Las barras indican el error estándar de la media.  
**HR:** herbicida residual, **L:** laboreo, **A+L:** avena+laboreo, **P:** paja de avena, **C:** control, **N:** cobertura natural.

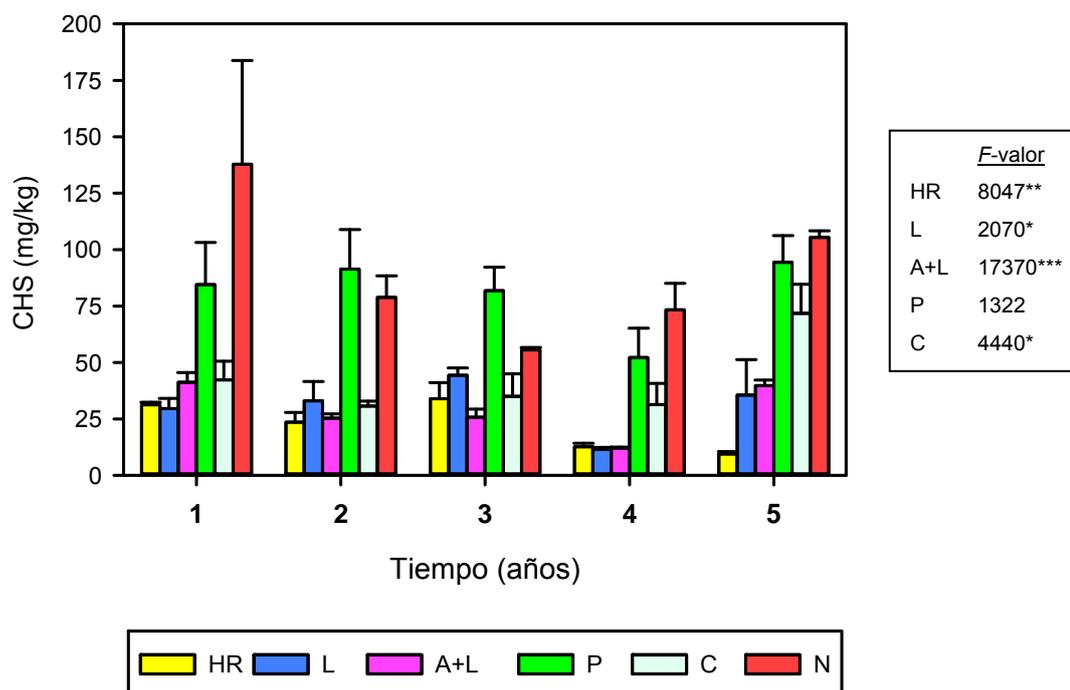
Las Fig. 2 y 3 muestran la evolución del contenido de carbohidratos totales e hidrosolubles (CHT) y (CHS). Los mayores valores para estos parámetros se registraron en la parcela con vegetación natural al inicio del experimento, siendo cuatro veces más altos que en el resto de los tratamientos. Se observaron algunas variaciones en los dos parámetros a lo largo de los años

de muestreo en las parcelas, alcanzando el máximo al final del ensayo. Los niveles de carbohidratos totales e hidrosolubles aumentaron en el tratamiento con la aplicación de paja de avena, con alguna variación anual alcanzando los mismos valores que la parcela con vegetación natural al final del experimento. El resto de los tratamientos presentaban valores de carbohidratos totales e hidrosolubles significativamente menores que en las parcelas con vegetación natural y con aplicación de paja de avena. En particular, los contenidos en CHS decrecieron bruscamente en el tratamiento con herbicida durante el transcurso del experimento.



**Figura 2.** Evolución temporal del contenido de carbohidratos totales (CHT) en la capa arable (0-20 cm) de los diferentes tratamientos agrícolas. Las barras indican el error estándar de la media.

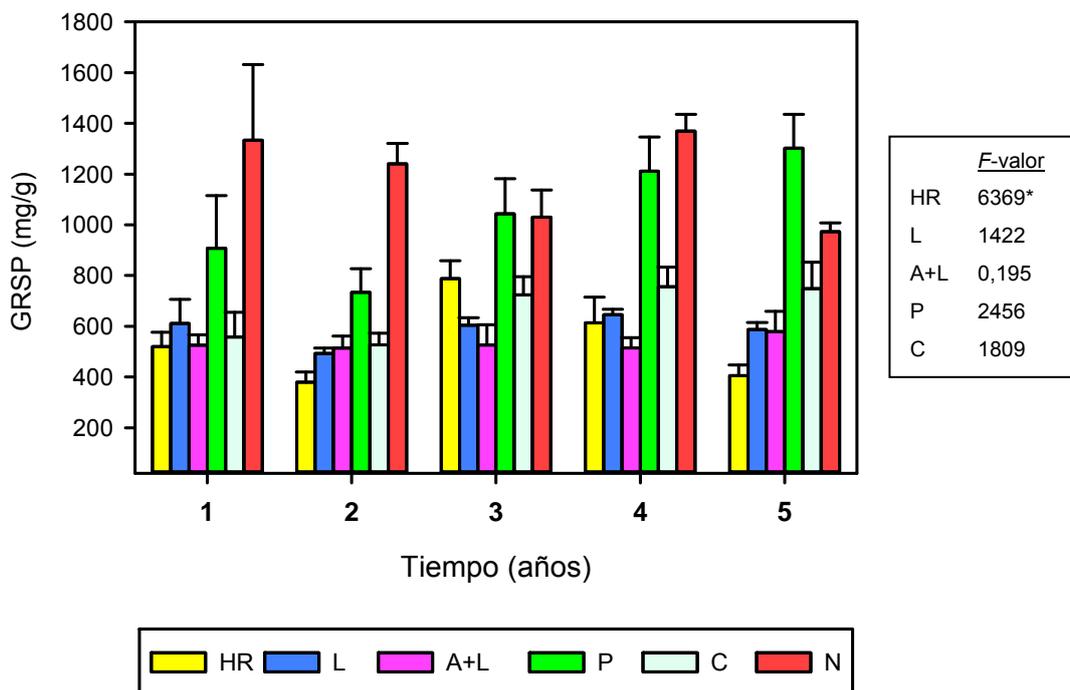
**HR:** herbicida residual, **L:** laboreo, **A+L:** avena+laboreo, **P:** paja de avena, **C:** control, **N:** cobertura natural.



**Figura 3.** Evolución temporal del contenido de carbohidratos hidrosolubles (CHS) en la capa arable (0-20 cm) de los diferentes tratamientos agrícolas. Las barras indican el error estándar de la media.

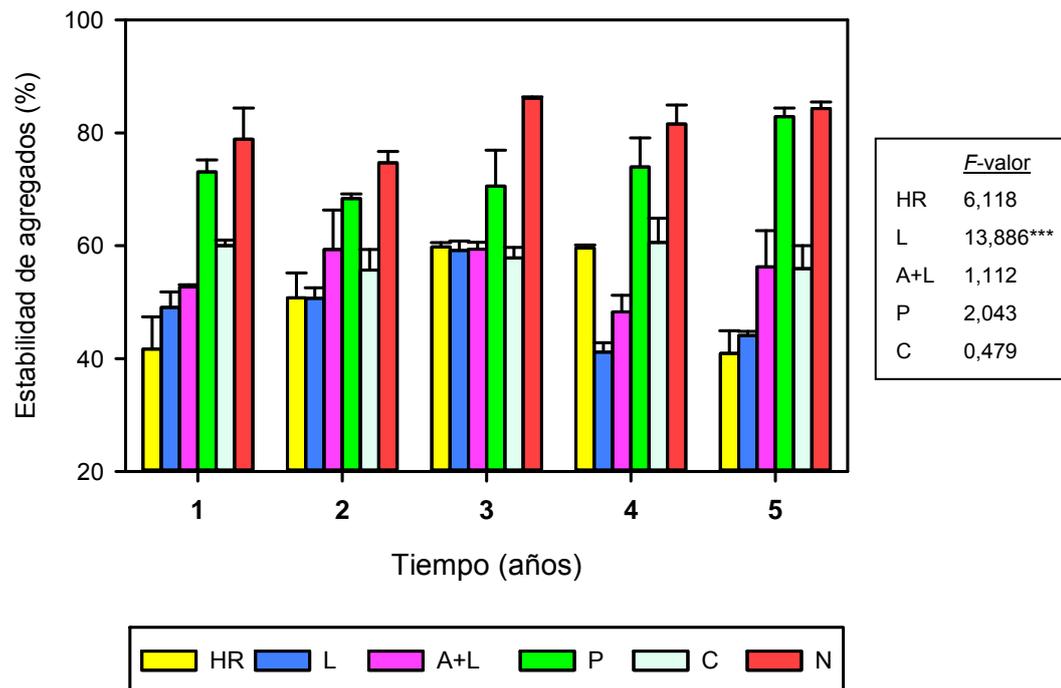
**HR:** herbicida residual, **L:** laboreo, **A+L:** avena+laboreo, **P:** paja de avena, **C:** control, **N:** cobertura natural.

Respecto a los resultados de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP) encontramos que la producción más alta de estas proteínas se produjo en la parcela con vegetación natural, aunque también observamos un aumento para este parámetro en el tratamiento con la adición de paja de avena, tal y como podemos ver en la Fig. 4. Cinco años después de la aplicación de los tratamientos el contenido de GRSP fue más alto en la parcela con paja de avena respecto a la de vegetación natural.



**Figura 4.** Evolución temporal del contenido de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (GRSP) en la capa arable (0-20 cm) de los diferentes tratamientos agrícolas. Las barras indican el error estándar de la media.  
**HR:** herbicida residual, **L:** laboreo, **A+L:** avena+laboreo, **P:** paja de avena, **C:** control, **N:** cobertura natural.

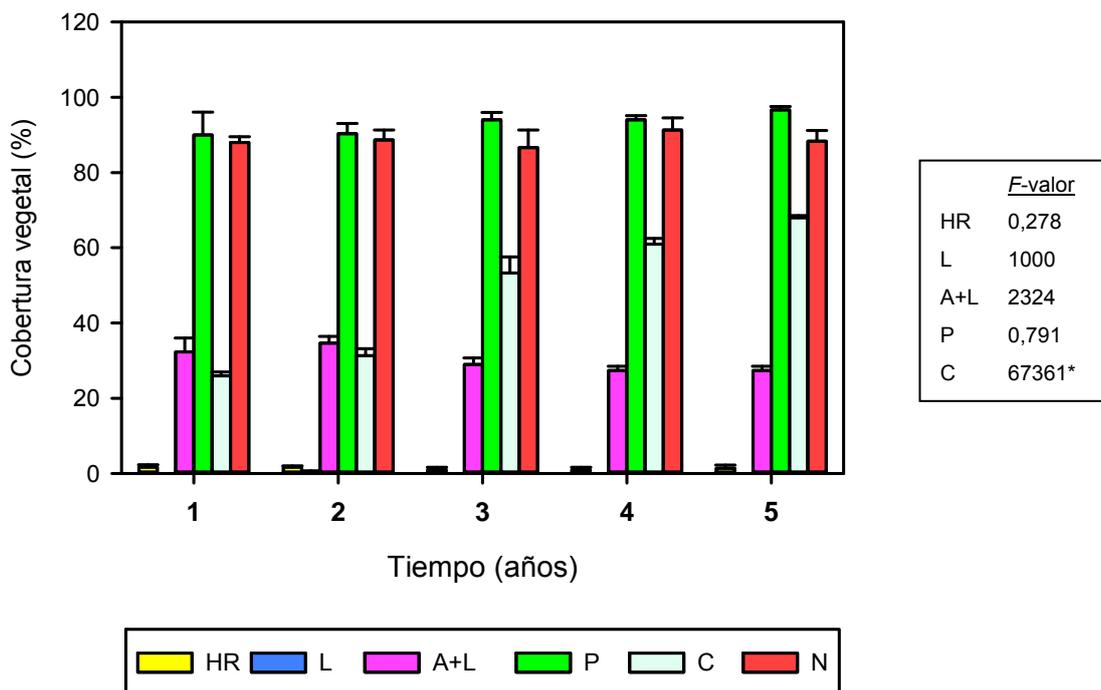
Transcurrido un año desde el inicio del experimento, observamos que los valores más altos de estabilidad de agregados se registraron en la parcela con vegetación natural y en el suelo tratado con paja avena (Fig. 5). Estos valores se mantuvieron durante los cinco años que duró el estudio. Cabe destacar que el porcentaje de agregados estables del suelo con laboreo disminuyó significativamente a lo largo de los cinco años que duró el ensayo. El resto de tratamientos no presentaron cambios significativos en este parámetro durante el experimento, alcanzando valores más bajos que el suelo con vegetación natural.



**Figura 5.** Evolución temporal del porcentaje de estabilidad de agregados estables en la capa arable (0-20 cm) de los diferentes tratamientos agrícolas. Las barras indican el error estándar de la media.

**HR:** herbicida residual, **L:** laboreo, **A+L:** avena+laboreo, **P:** paja de avena, **C:** control, **N:** cobertura natural.

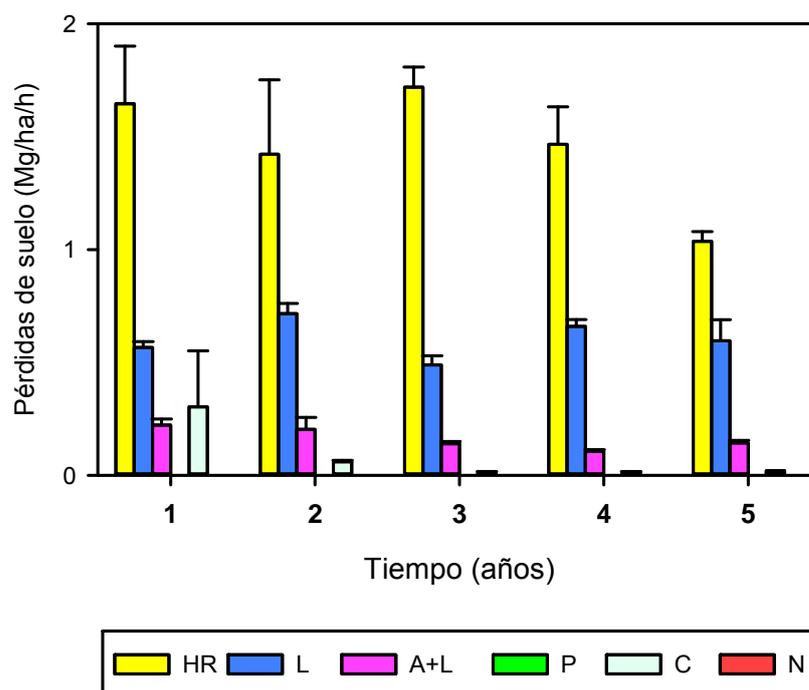
La parcela con vegetación natural y el tratamiento con paja de avena presentaban los mayores porcentajes de cobertura vegetal (Fig. 6). Se observó un incremento notable en la cobertura vegetal del tratamiento control, llegando a alcanzar una cobertura del 68% al final del ensayo. La cobertura vegetal fue muy escasa en los tratamientos con aplicación de herbicidas y prácticamente inexistente en el tratamiento con laboreo.



**Figura 6.** Evolución temporal del porcentaje de cobertura natural con los diferentes tratamientos agrícolas. Las barras indican el error estándar de la media.

**HR:** herbicida residual, **L:** laboreo, **A+L:** avena+laboreo, **P:** paja de avena, **C:** control, **N:** cobertura natural.

La comparación de los datos de pérdidas de suelo entre 2005 y 2009 nos muestra el impacto de los tratamientos sobre la erosión del suelo. Transcurrido un año desde el inicio del experimento, el tratamiento con herbicida fue el que presentó las mayores pérdidas de suelo ( $1,40 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) mientras que el arado ( $0,75 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), arado + avena ( $0,19 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y la parcela control ( $0,08 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) mostraron valores intermedios, tendencia que se mantuvo hasta el final del experimento. Cinco años después de la aplicación de los tratamientos, las pérdidas de suelo de la parcela tratada con herbicida fueron inferiores a las registradas al inicio del experimento, mientras las parcelas con laboreo ( $0,60 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), con laboreo y siembra de avena ( $0,16 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y la parcela control ( $0,01 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) presentaron valores similares durante los cinco años del experimento. Sin embargo, no se produjeron pérdidas de suelo en las parcelas tratadas con paja de avena y vegetación natural (Fig. 7).



**Figura 7.** Evolución temporal de la tasa de erosión con los diferentes tratamientos agrícolas. Las barras indican el error estándar de la media.

**HR:** herbicida residual, **L:** laboreo, **A+L:** avena+laboreo, **P:** paja de avena, **C:** control, **N:** cobertura natural.

#### 6.4. DISCUSIÓN

El suelo agrícola mostró un comportamiento muy diferente con los diferentes tratamientos aplicados. El suelo utilizado como referencia con vegetación natural (NC) se mostró como un suelo de alta calidad, dando unos resultados de alto contenido en materia orgánica, estabilidad de agregados y cubierta vegetal; en esta parcela los resultados también nos indican que no hubo pérdida de suelo durante los cinco años del estudio. Previamente, en la misma zona experimental se observó que el carbono de la biomasa microbiana, la tasa de respiración basal y las actividades enzimáticas alcanzaban unos valores elevados y estables en la parcela con vegetación natural (García-Orenes et al., 2010). En 2004, cuando dio comienzo el experimento, los valores de materia orgánica, estabilidad de agregados y cubierta vegetal fueron más altos en la parcela con vegetación natural que en el resto de los tratamientos. Estos valores son atribuidos a las prácticas agrícolas anteriores que contribuyeron a

la degradación de la estructura del suelo, a través del uso del arado, y a la pérdida de materia orgánica. El tratamiento con la adición de paja de avena se mostró muy eficaz en la mejora de la estructura del suelo, aumentando los valores de la estabilidad de agregados. Estos resultados fueron similares a la parcela con vegetación natural después de 5 años.

En la formación de los agregados y la estructura del suelo participan sustancias orgánicas, carbonatos, arcillas, oxihidróxidos de hierro y aluminio y la biota (Six et al., 2004; Bronick y Lal, 2005; Daynes et al., 2013). En particular los polisacáridos secretados por las bacterias, hifas de los hongos y las sustancias mucilaginosas excretadas por las raíces actúan como importantes agentes cementantes de las partículas del suelo para formar agregados (Oades, 1984; Puget et al., 1999; Jolivet et al., 2006). El aumento de la estabilidad de agregados del suelo en el tratamiento con la adición de paja de avena, en comparación con la parcela control, puede ser explicado por un incremento significativo de la materia orgánica y las fracciones de carbono soluble. Se observaron variaciones estacionales en la estabilidad de agregados y en las fracciones de C que pueden ser atribuidas a los fuertes cambios en la humedad del suelo.

Algunos estudios muestran variaciones en el contenido de carbohidratos atribuibles a diferentes prácticas de manejo del suelo; por ejemplo, Jolivet et al. (2006) publicó que el cultivo de suelos que habían sido forestales reduce el contenido de carbohidratos. En nuestro estudio todos los tratamientos mostraron valores de carbohidratos por debajo de los obtenidos en la parcela con vegetación natural excepto en el tratamiento con la adición de paja de avena. En este sentido, la adición de paja de avena puede reducir la pérdida de carbohidratos favoreciendo la formación de agregados en el suelo. Además este tratamiento contribuyó significativamente a la producción de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina. Varios trabajos han demostrado que estas proteínas contribuyen a la agregación del suelo (Bedini et al., 2009; Kohler et al., 2009; Harner et al., 2004; Wright y Upadhyaya, 1998). Los valores obtenidos para GRSP tras cinco años de adición de paja avena ( $1,200 \text{ mg g}^{-1}$ ) fueron muy similares a los valores obtenidos por Kohler et al. (2009) para esta proteínas en un suelo degradado de una zona mediterránea semiárida, inoculado con *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* ( $1,190 \text{ mg g}^{-1}$  y  $1,000$

mg g<sup>-1</sup> respectivamente). Estas dos especies de hongos micorrícicos producen la glicoproteína GRSP en la rizosfera de la planta huésped. En este sentido se puede afirmar que la adición de paja de avena ha sido muy eficaz como promotor de la producción de estas proteínas.

Se encontraron relaciones significativas y positivas entre algunas de las variables y la estabilidad de agregados, que se detallan a continuación: EA y MO ( $r = 0,558$ ,  $P < 0,01$ ), EA y CHT ( $r = 0,463$ ,  $P < 0,01$ ), EA y CHS ( $r = 0,619$ ,  $P < 0,01$ ) y EA y GSRP ( $r = 0,418$ ,  $P < 0,01$ ). Estos resultados apoyan la hipótesis de que los compuestos orgánicos estudiados (MO, CHT, CHS y GRSP) son importantes para la agregación del suelo en condiciones semiáridas.

Los valores más altos obtenidos para los parámetros estudiados, y el mantenimiento de estos valores durante el experimento en el tratamiento con adición de paja de avena, indican que la mejora en las propiedades del suelo se relaciona con el aumento de la cubierta vegetal del suelo y el mantillo de paja. El comportamiento del suelo bajo este tratamiento fue muy similar al de la parcela con cobertura natural al final del experimento, ya que ambos alcanzaron el mayor porcentaje de cobertura vegetal (ca. 100 %). Como consecuencia de la vegetación y la cubierta de paja, las pérdidas de agua por escorrentía del suelo fueron insignificantes durante los experimentos de simulación de lluvia. Las pérdidas de suelo en la parcela control, como ya se mencionó, fueron insignificantes después de 3 años, porque este suelo desarrolló una cobertura vegetal del 60%, lo cual es suficiente para controlar las pérdidas de sedimentos (Ruiz-Sinoga et al., 2010); incluso con la cobertura vegetal del 40% en el tratamiento de laboreo y avena, se encontró una disminución considerable en cuanto a las pérdidas de suelo. El impacto de la recuperación de la vegetación en la reducción de las pérdidas de suelo en campos abandonados ha sido estudiado en el este y el norte de España (García-Ruiz et al., 1995; Cerdá et al., 1997; García-Ruiz et al., 2011). La importancia de la vegetación, la cubierta de paja u hojarasca se explica por el hecho de que la cobertura vegetal reduce la energía cinética de las gotas de lluvia. Por lo tanto, las partículas desprendidas por salpicadura son insignificantes, al igual que la pérdida de suelo. Varios estudios han encontrado resultados similares a éstos, coincidiendo en que las menores pérdidas de

suelo se localizaban en las parcelas con mantillo de paja y en barbecho (por ejemplo, Schwing, 1978; Messer, 1980; Grill et al., 1989; Klik et al., 1998; Kahlon et al., 2013; Babcock et al., 2013). Las pérdidas de suelo tuvieron una correlación negativa significativa con la cubierta vegetal ( $r = -0,462$ ,  $P < 0,01$ ), y la vegetación se correlacionó positivamente con la estabilidad de los agregados ( $r = 0,592$ ,  $P < 0,01$ ). Estos datos indican que dos factores principales protegen el suelo contra la erosión: la cubierta vegetal, que puede reducir la energía cinética de la precipitación, y la estabilidad de los agregados, que se relaciona con el contenido de materia orgánica del suelo, carbohidratos hidrosolubles, carbohidratos totales y proteínas del suelo relacionadas con la glomalina, tal y como se confirma en este estudio. Por otra parte, la estabilidad de agregados es un buen indicador de la calidad del sistema suelo y se ve afectada por el tipo de vegetación en pastizales mediterráneos (Cerdá, 1998).

El suelo agrícola en España no solo sufre la degradación debido a la erosión sino también a la ruptura de los agregados, el bajo contenido de materia orgánica y la falta de una cubierta vegetal protectora. Los resultados demuestran que el control de la erosión del suelo es posible mediante el uso de prácticas que favorecen el desarrollo de la cubierta vegetal natural. Estos efectos se han observado en un espacio de tiempo relativamente corto (5 años). La aplicación de mantillo de paja resultó muy eficaz, ya que las pérdidas de suelo se reducen en menos de 1 año.

Esta investigación no sólo contribuye a la comprensión del impacto del uso y manejo del suelo agrícola en España, sino también a entender las consecuencias del abandono de la tierra agrícola. A lo largo del siglo XX, el terreno montañoso cultivado en España ha sido abandonado en su mayor parte. En algunos casos, este abandono ha dado lugar a la recuperación de la vegetación, el control de la erosión del suelo y la mejora en las propiedades de éste, dando lugar a resultados experimentales similares a los de este estudio. Por lo tanto, el no manejo del suelo después del cultivo se puede considerar como una opción viable con vistas a su sostenibilidad.

El manejo agrícola tiene una importante influencia sobre las propiedades del suelo estudiadas, tales como la materia orgánica, carbohidratos totales, carbohidratos solubles y contenido de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina suelo (Adesodun et al., 2001; Bedini et al., 2007; García-Orenes et

al., 2010; Gispert et al., 2013). Estas propiedades del suelo están altamente relacionadas con la formación de los agregados estables del suelo y por lo tanto con el control de la erosión. La aplicación de un mantillo de paja al suelo fue el tratamiento más eficaz ya que provocó un aumento del contenido de materia orgánica, carbohidratos hidrosolubles, carbohidratos totales y proteínas del suelo relacionadas con la glomalina, y estos incrementos se reflejaron en la mejora de la estabilidad de los agregados, alcanzando valores similares a los del suelo con la cubierta vegetal natural, que fue utilizado como un suelo de referencia de alta calidad.

Una mayor estabilidad de los agregados y una cubierta vegetal estable, son los dos factores principales para la protección del suelo contra la erosión en condiciones mediterráneas. Cuando se aplica la paja sobre el suelo la recuperación es incluso más rápida. Esta investigación demuestra que el abandono de tierras, que ha tenido lugar en la región del Mediterráneo en los últimos 50 años, ha contribuido al aumento de la calidad del suelo y a reducir los riesgos de erosión. En este estudio también se ha demostrado que la gestión sostenible en las prácticas agrícolas evita la degradación del suelo; y que el uso de la paja como agente protector es la estrategia más eficaz para conseguir la sostenibilidad de estos agroecosistemas.

## **6.5. CONCLUSIONES**

El manejo agrícola en el área mediterránea afecta las propiedades del suelo y condiciona las pérdidas de suelo y agua. En condiciones ambientales mediterráneas, el uso de la labranza y herbicidas disminuye la calidad del suelo y provoca altas tasas de erosión. Las prácticas de manejo que favorecen el desarrollo de la cubierta vegetal, como es el uso de un mantillo de paja, contribuyen a un aumento de los carbohidratos totales y solubles en agua, proteínas del suelo relacionadas con la glomalina, carbono orgánico total y estabilidad de los agregados, dando como resultado una reducción o incluso eliminación de las pérdidas de suelo y agua.



# Conclusiones



## CONCLUSIONES

Tanto la adición de enmiendas orgánicas como los tratamientos de inoculación micorrícica incrementaron significativamente la biomasa aérea de *J. oxycedrus*. La inoculación micorrícica fue el tratamiento más eficaz para incrementar la biomasa aérea de las plantas, no encontrándose diferencias significativas entre los dos tratamientos de micorrización.

La inoculación con la mezcla de tres hongos MA y la combinación de *G. intraradices* con las dos enmiendas orgánicas mejoró significativamente la estabilidad estructural del suelo, posiblemente debido a una reactivación de las poblaciones microbianas.

Los valores de carbono hidrosoluble y de carbohidratos, estrechamente relacionados con la estabilidad estructural, se incrementaron sólo con la adición de los lodos de depuradora compostados o el residuo DOC fermentado.

En condiciones de riego adecuado, los mayores porcentajes de agregados estables se registraron en el suelo enmendado, seguido por el suelo inoculado con hongos MA. La desecación causó un aumento significativo de la estabilidad de los agregados del suelo en la rizosfera de todas las plantas, en particular en las enmendadas e inoculadas. En todos los tratamientos, los agregados formados después del secado del suelo fueron inestables, ya que después de la rehumectación alcanzaron los niveles iniciales previos al secado. Este incremento observado puede estar ligado al aumento de las fracciones de carbono lábiles (carbono hidrosoluble, carbohidratos totales e hidrosolubles) que se produjo durante el ciclo de secado. La rehumectación del suelo disminuyó significativamente tales fracciones de carbono.

El tratamiento combinado de la adición del residuo fermentado de alperujo y la inoculación con hongos MA, en particular con *G. mosseae*, tuvo el mayor efecto para incrementar la biomasa aérea de *D. pentaphyllum*.

La adición del residuo DOC fermentado y la inoculación micorrícica incrementaron la actividad microbiana del suelo y los porcentajes de agregados estables del mismo. La enmienda también incrementó los niveles de fertilidad. La mejora de los indicadores de calidad del suelo, especialmente la estabilidad

estructural, avala la efectividad de estas prácticas para la regeneración de suelos degradados.

El manejo agrícola inadecuado en un ambiente mediterráneo, como el uso de la labranza intensiva y el uso de herbicidas disminuyeron la calidad del suelo afectando a la estructura de éste y provocando altas tasas de erosión.

Las prácticas de manejo como la adición de un mantillo de paja, resultaron adecuadas ya que contribuyeron a un aumento de los carbohidratos totales y solubles en agua, proteínas del suelo relacionadas con la glomalina, carbono orgánico total y estabilidad de los agregados, dando como resultado una reducción o incluso eliminación de las pérdidas de suelo y agua





## **Bibliografía**



- Abiven, S., Menasseri, S., Chenu, C. 2009. The effects of organic inputs over time on soil aggregate stability – a literature analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1–12.
- Adesodun, J.K., Mbagwu, J.S.C., Oti, N. 2001. Structural stability and carbohydrate contents of an ultisol under different management systems. *Soil and Tillage Research*, 60, 135–142.
- Albaladejo, J., Castillo, V., Roldán, A. 1996. Rehabilitation of degraded soils by water erosion in semiarid environment. In: J.L. Rubio y A. Calvo (eds.). *Soil Degradation and Desertification in Mediterranean Environments*. Geofoma, pp. 265-278.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F. 2001. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresour. Technol.* 77, 109–114.
- Albuquerque, J. A., Gonzalez, J., Garcia, D., Cegarra, J. 2006. Composting of a solid olive-mill by-product ("alperujo") and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions. *Waste Management*, 26(6), 620-626.
- Albuquerque, J.A., Gonzalez, J., Tortosa, G., Ait Baddi, G., Cegarra, J. 2009. Evaluation of "alperujo" composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation*, 20(2), 257-270.
- Alegre, J., Alonso-Blazquez, N., de Andres, E. F., Tenorio, J. L., Ayerbe, L. 2004. Revegetation and reclamation of soils using wild leguminous shrubs in cold semiarid Mediterranean conditions: Litterfall and carbon and nitrogen returns under two aridity regimes. *Plant and Soil*, 263(1-2), 203-212.

- Alguacil, M., Diaz-Pereira, E., Caravaca, F., Fernandez, D. A., Roldan, A. 2009. Increased Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in a Long-Term Field Experiment via Application of Organic Amendments to a Semiarid Degraded Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13), 4254-4263.
- Alguacil, M.M., Caravaca, F., Díaz, G., Marín, P., Roldán, A. 2004. Establishment of *Retama sphaerocarpa* L. seedlings on a degraded semiarid soil as influenced by mycorrhizal inoculation and sewage sludge amendment. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167:637-644.
- Alguacil, M.M., Caravaca, F., Roldán, A. 2005. Changes in rhizosphere microbial activity mediated by native or allochthonous AM fungi in the reforestation of a Mediterranean degraded environment. *Biol. Fertil. Soils* 41, 59–68.
- Amaral Franco, J. 1964. *Juniperus* L. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds.), *Flora Europaea*, vol. I. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 181–188.
- Amezketá, E. 1999. Soil aggregate stability: a review. *Journal of Sustainable Agriculture*, 14, 83–151.
- Angers, D.A., Caron, J. 1998. Plant-induced changes in soil structure: processes and feedbacks. *Biogeochemistry* 42, 55– 72.
- Attou, F., Bruand, A. 1998. Experimental study of 'fragipans' formation in soils. Role of both clay dispersion and wetting–drying cycles. *C. R. Acad. Sci., Ser. 2, Fascicule II. Sci. Terre Planetes* 326, 545– 552.
- Atucha, A., Merwin, I. A., Brown, M. G., Gardiazabal, F., Mena, F., Adriazola, C., Lehmann, J. 2013. Soil erosion, runoff and nutrient losses in an avocado (*Persea americana* Mill) hillside orchard under different groundcover management systems. *Plant and Soil*, 368(1-2), 393-406.

- Augé, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3–42.
- Azcón-Aguilar, C., Palenzuela, J., Roldán, A., Bautista, S., Vallejo, R., Barea, J.M. 2003. Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands, *Appl. Soil Ecol.* 22, 29-37.
- Babcock, D. L., McLaughlin, R. A. 2013. Erosion control effectiveness of straw, hydromulch, and polyacrylamide in a rainfall simulator *Journal of Soil and Water Conservation* (Vol. 68, pp. 221-227).
- Barea, J. M., Palenzuela, J., Cornejo, P., Sanchez-Castro, I., Navarro-Fernandez, C., Lopez-Garcia, A., Azcon-Aguilar, C. 2011. Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Journal of Arid Environments*, 75(12), 1292-1301.
- Barto, E.K., Oelmann, Y., Wilcke, W., Rillig, M.C. 2010. Contributions of biotic and abiotic factors to soil aggregation across a land use gradient. *Soil Biology & biochemistry* 42: 2316-2324.
- Bearden, B.N., Petersen, L. 2000. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of vertisols. *Plant and Soil* 218, 173-183.
- Beare, M.H., Hendrix, P.F., Coleman, D.C. 1994. Water-stable aggregates and organic matter fractions in conventional- and no-tillage soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 777–786.
- Bedini, S., Avio, L., Argese, E., Giovannetti, M. 2007. Effect of longterm land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. *Agriculture Ecosystem and Environment*, 120, 463–466.

- Bedini, S., Pellegrino, E., Avio, L., Pellegrini, S., Bazzoffi, P., Argese, E., Giovannatti, M. 2009. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1491–1496.
- Benito, E., Gomez-Ulla, A., Diaz-Fierros, F. 1986. Descripción de un simulador de lluvia para estudios de erodibilidad y estabilidad de agregados al agua. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 45, 1115–1126.
- Boix-Fayos, C., Calvo-Cases, A., Imeson, A.C. 2001. Influence of soil properties on the aggregation of some Mediterranean soils and the use of aggregate size and stability as land degradation indicators. *Catena* 44, 47– 67.
- Bossuyt, H., Denef, K., Six, J., Frey, S. D., Merckx, R., Paustian, K. 2001. Influence of microbial populations and residue quality on aggregate stability. *Applied Soil Ecology*, 16(3), 195-208.
- Bradford, M.M. 1976. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brink, R.H., Dubach, P., Lynch, D.L. 1960. Measurements of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone. *Soil Science*, 89, 157–166.
- Bronick, C.J., Lal, R. 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124, 3–22.
- Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Zoppini, A. 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology & Biochemistry*, 58, 216-234.

- Caesar-TonThat, T.C. 2002. Soil binding properties of mucilage produced by a basidiomycete fungus in a model system. *Mycol.Res.* 106, 930–937.
- Caldwell, B. A. 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia*, 49(6), 637-644.
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Azcón, R., Díaz, G., Roldán, A. 2004. Comparing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and amendment with sugar beet, rock phosphate and *Aspergillus niger* to enhance field performance of the leguminous shrub *Dorycnium pentaphyllum* L, *Appl. Soil Ecol.* 25 169-180.
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Díaz, G., Roldán, A. 2003c. Use of nitrate reductase activity for assessing effectiveness of mycorrhizal symbiosis in *Dorycnium pentaphyllum* under induced water deficit, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 34 2291-2302.
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Figueroa, D., Barea, J.M., Roldán, A. 2003b. Re-establishment of *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in a semiarid mediterranean area. *Forest Ecol. Manage.* 182, 49–58.
- Caravaca, F., Figueroa, D., Alguacil, M. M., Roldan, A. 2003a. Application of composted urban residue enhanced the performance of afforested shrub species in a degraded semiarid land. *Bioresource Technology*, 90(1), 65-70.
- Caravaca, F., Hernández, M.T., García, C., Roldán, A. 2002b. Improvement of rhizosphere aggregates stability of afforested semi-arid plant species subjected to mycorrhizal inoculation and compost addition. *Geoderma* 108, 133-144.
- Caravaca, F., Lax, A., 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) 4:1235-1238.

Caravaca, F., Masciandaro, G., Ceccanti, B. 2002a. Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semiarid Mediterranean environment. *Soil and Tillage Research*, 68, 23–30.

Casalí, J., Giménez, R., De Santisteban, L., Álvarez-Mozos, J., Mena, J., Del Valle de Lersundi, J. 2009. Determination of longterm erosion rates in vineyards of Navarre (Spain) using botanical benchmarks. *Catena*, 78, 12–19.

Castro, P., Gill, S., Lull, V., Mico, R., Rihnete, C., Risch, R., YIIMa, E.S., Chapman, R. 2000. Archaeology and desertification in the Vera basin (Almeria, south-east Spain). *European Journal of Archaeology*, 3, 147–166.

Ceccanti, B., Garcia, C. 1994. Coupled chemical and biochemical methodologies to characterize a composting process and the humic substances, in: N. Senesi, T. Miano, T. (Eds.), *Humic substances in the global environment and its implication on human health*, Elsevier, New York, pp. 1279-1285.

Cerdá, A. 1998. Soil aggregate stability under different Mediterranean vegetation types. *Catena*, 32, 73–86.

Cerdá, A. 1999. Parent material and vegetation affect soil erosion in eastern Spain. *Soil Science Society American Journal*, 63, 362–368.

Cerda, A. 2000. Aggregate stability against water forces under different climates on agriculture land and scrubland in southern Bolivia. *SOIL & TILLAGE RESEARCH* V: 57. 3:159-166.

- Cerdá, A., Flanagan, D.C., le Bissonnais, Y., Boardman, J. 2009. Soil erosion and agriculture. *Soil and Tillage Research*, 106, 107–108.
- Cerdá, A., Hooke, J., Romero-Diaz, A., Montanarella, L., Lavee, H. 2010. Soil erosion on Mediterranean type-ecosystems. *Land Degradation and Development*, 21, 71–217.
- Cerdá, A., Ibáñez, S., Calvo, A. 1997. Design and operation of a small and portable rainfall simulator for rugged terrain. *Soil Technology*, 11, 161–168.
- Cerdá, A., Imeson, A.C., Poesen, J. 2007. Soil water erosion in rural areas. *Catena*, 71, 191–192.
- Chander, K., Brookes, P.C. 1993. Residual effects of zinc, copper, and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1231–1239.
- Chenu, C. 1993. Clay-or sand-polysaccharide associations as models for the interface between microorganisms and soil: water related properties and microstructure. *Geoderma* 56, 143-156.
- Chenu, C., Cosentino, D. 2011. Microbial regulation of soil structural dynamics. In: Ritz, K., Young, I.M. (Eds.), *The Architecture and Biology of Soils*. CABI, Oxfordshire, U.K, pp. 37-70.
- Cheshire, M.V., and Hayes, M.H.B. 1990. Composition, origins, structures, and reactivities of soil polysaccharides. In *Soil Colloids and Their Associations in Aggregates*, De Boodt, M. F., Hayes, M.H.B., and Herbillon, A., eds., Plenum, New York, pp. 307– 336 .
- Christensen, B. T. 2001. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *European Journal of Soil Science*, 52(3), 345-353.

- Clough, A., Skjemstad, J.O. 2000. Physical and chemical protection of soil organic carbon in three agricultural soils with different contents of calcium carbonate. *Aust. J. Soil Res.* 38, 1005–1016.
- Cox, D., Bezdicek, D., Fauci, M. 2001. Effects of compost, coal ash, and straw amendments on restoring the quality of eroded Palouse soil. *Biology and Fertility of Soils* 33, 365-372.
- Dalal, R.C., Bridge, B.J. 1996. Aggregation and organic matter storage in sub-humid and semi-arid soils. In: Carter, M.R., Stewart, B.A. (Eds.), *Structure and Organic Matter Storage in Agricultural Soils*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 263–307.
- Daynes, C.N., Field, D.J., Saleeba, J.A., Cole, M.A., McGee, P.A. 2013. Development and stabilisation of soil structure via interactions between organic matter, arbuscular mycorrhizal fungi and plant roots. *Soil Biology & Biochemistry*, 57, 683-694.
- De Luca, T.H., Keeney, D.R. 1993. Soluble anthrone-reactive carbon in soils: effect of carbon and nitrogen amendments, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57 1296-1300.
- Debosz, K., Petersen, S.O., Kure, L.K., Ambus, P., 2002b. Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. *Appl. Soil Ecol.* 19, 237– 248.
- Debosz, K., Vognsen, L., Labouriau, R. 2002a. Carbohydrates in hot water extracts of soil aggregates as influenced by long-term management. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33, 623– 634.
- Denef, K., Six, J., Bossuyt, H., Frey, S.D., Elliott, E.T., Merckx, R., Paustian, K. 2001. Influence of dry – wet cycles on the interrelationship between aggregate, particulate organic matter, and microbial community dynamics. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1599– 1611.

- Dinel, H., Righi, D., Hardy, M., Jambu, P. 1997. Neutral lipids and structural stability of physically degraded soils. *Agrochimica* 41, 97– 108.
- Doran, J.W., Parkin, T.B. 1994. Defining and Assessing Soil Quality. In: Doran, J.W., Coleman, D.F., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (ed.). *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Science Society of America, Special Publication 35, Madison, WI, pp 3-21.
- Douds, D.D., Galvez, L., Franke-Snyder, M., Reider, C., Drinkwater, L.E. 1997. Effect of compost addition and crop rotation point upon VAM fungi. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 65, 257-266.
- Edwards, A.P., Bremner, J.M. 1967. Microaggregates in soils. *J. Soil Sci.* 18, 64–73.
- ENADIMSA. 1972. Memoria y hoja geológica num. 913 (Orihuela). Mapa geológico de España, E 1:50.000 (seria magna). IGME.
- Fierer, N., Schimel, J.P., Holden, P.A. 2003. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microbial Ecology* 45, 63-71.
- Filho, C.C., Lourenco, A., Guimaraes, M.D.F., Fonseca, I.C.B. 2002. Aggregate stability under different soil management systems in a red Latosol in the state of Parana, Brazil. *Soil Tillage Res.* 65, 45– 51.
- Fliessbach, A., Martens, R., Reber, H.H. 1994. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1201–1205.
- Fokom, R., Adamou, S., Teugwa, M.C., Boyogueno, A.D.B., Nana, W.L., Ngonkeu, M.E.L., Zollo, P.H.A. 2012. Glomalin related soil protein, carbon, nitrogen and soil aggregate stability as affected by land use

variation in the humid forest zone of south Cameroon. *Soil & Tillage Research*, 120, 69-75.

Franzluebbers, A.J., Haney, R.L., Honeycutt, C.W., Arshad, M.A., Schomberg, H.H., Hons, F.M. 2001. Climatic influences on active fractions of soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1103– 1111.

García Ruiz, J.M. 2010. The effects of land uses on soil erosion in Spain: A review. *Catena*, 81, 1–11.

García, C., Gil, F., Hernández, M.T., Trasar, C. 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Mundi-Prensa. Madrid.

García, C., Hernández, M.T., 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, M.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 Biol. Biochem.* 32, 1173–1181.

García-Estringana, P., Alonso-Blazquez, N., Marques, M. J., Bienes, R., Gonzalez-Andres, F., Alegre, J. 2013. Use of Mediterranean legume shrubs to control soil erosion and runoff in central Spain. A large-plot assessment under natural rainfall conducted during the stages of shrub establishment and subsequent colonisation. *Catena*, 102, 3-12.

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. *Biol. Fertil. Soils* 39, 320–328.

- García-Orenes, F., Cerdá, A., Mataix-Solera, J., Guerrero, C., Bodí, M.B., Arcenegui, V., Zornoza, R., Sempere, J.G. 2009. Effects of agricultural management on surface soil properties and soilwater losses in eastern Spain. *Soil and Tillage Research*, 106, 117–123.
- García-Orenes, F., Guerrero, C., Roldán, A., Mataix-Solera, J., Cerdá, A., Campoy, M., Zornoza, R., Bárcenas, G., Caravaca, F. 2010. Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil and Tillage Research*, 109, 110–115.
- García-Ruiz, J. M., Lana-Renault, N. 2011. Hydrological and erosive consequences of farmland abandonment in Europe, with special reference to the Mediterranean region - A review. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 140(3-4), 317-338.
- García-Ruiz, J. M., Lana-Renault, N. 2011. Hydrological and erosive consequences of farmland abandonment in Europe, with special reference to the Mediterranean region - A review. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 140(3-4), 317-338.
- García-Ruiz, J.M., Lasanta, T., Ortigosa, L., Ruiz Flaño, P., Martí, C., González, C. 1995. Sediment yield under different land-uses in the Spanish Pyrenees. *Mountain Research and Development*, 15, 229–240.
- Ghani, A., Dexter, M., Perrott, K.W. 2003. Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilisation, grazing and cultivation. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1231-1243.
- Giovannetti, M., Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84, 489-499.

- Gispert, M., Emran, M., Pardini, G., Doni, S., Ceccanti, B. 2013. The impact of land management and abandonment on soil enzymatic activity, glomalin content and aggregate stability. *Geoderma*, 202, 51-61.
- Gómez Gutiérrez, Á., Schnabel, S., Lavado Contador, F. 2010. Gully erosion, land use and topographical thresholds during the last 60 years in a small rangeland catchment in SW Spain. *Land Degradation and Development*, 20, 535–550.
- Gómez, J.A., Batteny, M., Renschler, C.S., Fereres, E. 2003. Evaluating the impact of soil management on soil loss in olive orchards. *Soil Use and Management*, 19, 127–134.
- Gonzalez-Andres, F., Alegre, J., Ceresuela, J. L. 2005. The rhizobia nodulating shrubs for revegetation of arid lands: Isolation of native strains and specificity of the plant-rhizobia interaction by cross inoculation tests. *Arid Land Research and Management*, 19(4), 307-326.
- Grill, J.J., Canler, J.P., Carsouille, J. 1989. The benefit of permanent grass and mulching for limiting runoff and erosion in vineyards. Experimentations using rainfalls-simulations in the Beaujolais. In: *Soil erosion protection measures in Europe* (eds U. Schwertmann, R.J. Rickson & K. Auerswald), pp. 157–166.
- Gutián-Ojea, F., Carballas, T. 1976. *Técnicas de análisis de suelos*. Ed. Pico Sacro. Santiago de Compostela.
- Hamblin, A.P. 1985. The influence of soil structure on water movement, crop root growth, and water uptake. *Advances in Agronomy* 38, 95-158.
- Haner, M.J., Ramsey, P.W., Rillig, M.C. 2004. Protein accumulation and distribution in floodplain soils and river foam. *Ecology Letters*, 7, 829–836.

- Harris, R. 1981. Effect of water potential on microbial growth and activity. In: Parr, J., Gardener, W. (Eds.). Water potential relations in soil microbiology. Soil science society of America, Madison, WI, pp. 23-95.
- Hueso, S., Garcia, C., Hernandez, T. 2012. Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 50, 167-173.
- Jacquot-Plumey, E., van Tuinen, D., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. 2001. 25S rDNA-based molecular monitoring of glomalean fungi in sewage sludge-treated field plots. *Environmental Microbiology*, 3(8), 525-531.
- Jastrow, J.D. 1996. Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 28, 665– 676.
- Jastrow, J.D., Miller, R.M. 1997. Soil aggregate stabilization and carbon sequestration: feedbacks through organomineral associations. *Soil processes and the carbon cycle*, 207-223.
- Jeffries, P., Barea, J.M. 2000. Arbuscular mycorrhiza-a key component of sustainable plant-soil ecosystems. In: Hock, B. (Ed.), *The Mycota. Fungal Associations*, vol. IX. Springer, Berlin, pp. 95–113.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S. Perotto, S. Turnau, K. Barea, J.M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37, 1-16.
- Johansson, M., Stenberg, B., Torstensson, L. 1999. Microbiological and chemical changes in two arable soils after long-term sludge amendments. *Biol. Fertil. Soils* 30, 160–167.
- Jolivet, C., Angers, D.A., Chantigny, M.H., Andreux, F., Arrouays, D. 2006. Carbohydrates dynamics in particle-size fractions of sandy spodosols

following forest conversion to maize cropping. *Soil Biology Biochemistry*, 38, 2834–2842.

Kahlon, M. S., Lal, R., Ann-Varughese, M. 2013. Twenty two years of tillage and mulching impacts on soil physical characteristics and carbon sequestration in Central Ohio. *Soil & Tillage Research*, 126, 151-158.

Karami, A., Homaei, M., Afzalnia, S., Ruhipour, H., Basirat, S. 2012. Organic resource management: Impacts on soil aggregate stability and other soil physico-chemical properties. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 148, 22-28.

Klik, A., Rosner, J., Loiskandl, W. 1998. Effects of temporary and permanent soil cover on grape yield and soil chemical and physical properties. *Journal Soil Water Conservation*, 53, 249–253.

Knudsen, D., Peterson, G. A., Pratt, P.F. 1982. Lithium, sodium, and potassium. Pages 225–246 in A. L. Page, R. H. Miller, and D. R. Keeney, editors. *Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.

Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L., Roldán, A. 2006. Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregate stabilization and promotion of biological fertility in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. *Soil Use and Management*, 22(3), 298-304.

Kohler, J., Caravaca, F., Roldán, A. 2009. Effect of drought on rhizosphere soil aggregates of *Lactuca sativa* grown in a degraded soil inoculated with PGPR and AM fungi. *Applied Soil Ecology*, 42, 160–165.

Lal, R. 2008. Sequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> in global carbon pools. *ENERGY & ENVIRONMENTAL SCIENCE*. Volume: 1. 1:86-100.

- Lax, A., García-Orenes, F. 1993. Carbohydrates from municipal solid wastes as aggregation factor of soils. *Soil Technology* 6, 157-162.
- Lax, A., Roldán, A., Caravaca, F., García-Orenes, F. 1997. Relationships between aggregate improvement, microbiological activity and organo-mineral complex formation in soils from semiarid areas, in: S.G. Pandalai, (Ed.), *Recent research developments in soil biology and biochemistry*, Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 77-92.
- Le Bissonnais, Y., Blavet, D., De Noni, G., Laurent, J. Y., Asseline, J., Chenu, C. 2007. Erodibility of Mediterranean vineyard soils: Relevant aggregate stability methods and significant soil variables. *European Journal of Soil Science*, 58(1), 188-195.
- Leadir, L., Fries, M., Pacovsky, R.S., Safir, G.R., Siqueira, J.O. 1997. Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization affected by exogenously applied phenolic compounds, *J. Chem. Ecol.* 23 1755-1767.
- Leifheit, E. F., Veresoglou, S. D., Lehmann, A., Morris, E. K., Rillig, M. C. 2014. Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation-a meta-analysis. *Plant and Soil*, 374(1-2), 523-537.
- Linares, A., Caba, J.M., Ligeró, F., de la Rubia, T., Martínez, J. 2003. Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavido-alba*. *Chemosphere* 51, 887–891.
- Lynrintzis, G., Papanastasis, V. 1995. Human activities and their impact on land degradation – Psilorites mountain in Crete: a historical perspective. and *Degradation and Development*, 6, 79–93.
- Magill, A.H., Aber, J.D. 1998. Long-term effects of experimental nitrogen additions on foliar litter decay and humus formation in forest ecosystems. *Plant Soil* 203, 301– 311.

- Mandal, S. M., Chakraborty, D., Dey, S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling & behavior*, 5(4), 359-368.
- Martens, D.A. 2000. Plant residue biochemistry regulates soil carbon cycling and carbon sequestration. *Soil Biol. Biochem.* 32, 361– 369.
- Martens, D.A., Frankenberger Jr., W.T. 1992. Modification of infiltration rates in an organic-amended irrigated soil. *J. Agron.* 84, 707– 717.
- Martín, J., Sampedro, I., Garcia-Romera, I., Garcia-Garrido, J. M., Ocampo, J. A. 2002. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues. *Soil Biology & Biochemistry*, 34(11), 1769-1775.
- Martínez, J., Pérez, J., de la Rubia, T. 1998. Olive oil mill wastewater degradation by ligninolytic fungi. In: Pandalai, S.G. (Ed.), *Recent Research Development in Microbiology*, vol. 2. Research Singpost, Trivandrum, pp. 373–403.
- Martinez-Casanovas, J. A., Sanchez-Bosch, I. 2000. Impact assessment of changes in land use/conservation practices on soil erosion in the Penedes-Anoia vineyard region (NE Spain). *Soil & Tillage Research*, 57(1-2), 101-106.
- Martinez-Inigo, M. J., Perez-Sanz, A., Ortiz, I., Alonso, J., Alarcon, R., Garcia, P., Lobo, M. C. 2009. Bulk soil and rhizosphere bacterial community PCR-DGGE profiles and beta-galactosidase activity as indicators of biological quality in soils contaminated by heavy metals and cultivated with *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Chemosphere*, 75(10), 1376-1381.
- Medina, A., Azcon, R. 2010. Effectiveness of the application of arbuscular mycorrhiza fungi and organic amendments to improve soil quality and

- plant performance under stress conditions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 354-372.
- Medina, A., Roldan, A., Azcon, R. 2010. The effectiveness of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Aspergillus niger* or *Phanerochaete chrysosporium* treated organic amendments from olive residues upon plant growth in a semi-arid degraded soil. *Journal of Environmental Management*, 91(12), 2547-2553.
- Mendes, I.C., Bandick, A.K., Dick, R.P., Bottomley, P.J. 1999. Microbial biomass and activities in soil aggregates affected by winter cover crops. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 873– 881.
- Messer, T. 1980. Soil erosion measurements on experimental plots in Alsace vineyards (France). In: *Assessment of erosion* (eds M. de Boodt & D. Gabriels), pp. 455–462. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK.
- Miller, R.M., Jastrow, J.D. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. In: Kapulnik, Y., Douds, D.D. (Eds.). *Arbuscular Mycorrhizas: Molecular Biology and Physiology*. Kluwer academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 3-18.
- Nannipieri, P. 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst, C.E. (Ed.), *Soil biota: management in sustainable farming systems*. CSIRO, Australia, pp. 238–244.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Matarese, E. 1980. Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbon and nitrogen from soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44, 1011–1016.
- Naseby, D.C., Lynch, J.M. 1997. Rhizosphere soil enzymes as indicators of perturbations caused by enzyme substrate addition and inoculation of a

genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* on wheat seed. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1353-1362.

Naseby, D.C., Lynch, J.M. 1997. Rhizosphere soil enzymes as indicators of perturbation caused by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* on wheat seed. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1353–1362.

Nicolás, C., Kennedy, J. N., Hernandez, T., Garcia, C., Six, J. 2014. Soil aggregation in a semiarid soil amended with composted and non-composted sewage sludge-A field experiment. *Geoderma*, 219, 24-31.

Nocker, A., Fernandez, P. S., Montijn, R., Schuren, F. 2012. Effect of air drying on bacterial viability: A multiparameter viability assessment. *Journal of Microbiological Methods*, 90(2), 86-95.

Novara, A., Gristina, L., Saladino, S. S., Santoro, A., Cerda, A. 2011. Soil erosion assessment on tillage and alternative soil managements in a Sicilian vineyard. *Soil & Tillage Research*, 117, 140-147.

Oades, J.M. 1984. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant and Soil*, 76, 319–337.

Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S., Dean, L.A. 1954. Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate. U. S. Department of Agriculture Circular No. 939. Banderis, A. D., D. H. Barter and K. Anderson. *Agricultural and Advisor*.

Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, O.R. 1982. *Methods of Soil Analysis*. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI, p. 1159.

Palm, C.A., Rowland, A.P. 1997. Minimum dataset for characterization of plant quality for decomposition. In: Cadisch, G., Giller, K.E. (Eds.), *Driven by*

- Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. CAB International, Wallingford, UK, pp. 379–392.
- Paradelo, R., Barral, M. T. 2013. Influence of organic matter and texture on the compactability of Technosols. *Catena*, 110, 95-99.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 158-161.
- Powers, J.S., Schlesinger, W.H. 2002. Relationships among soil carbon distributions and biophysical factors at nested spatial scales in rain forests of northeastern Costa Rica. *Geoderma* 109, 165– 190.
- Puget, P., Angers, D.A., Chenu, C. 1999. Nature of carbohydrates associated with water stable aggregates of two cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 55–63.
- Puget, P., Chenu, C., Balesdent, J. 2000. Dynamics of soil organic matter associated with particle-size fractions of water-stable aggregates. *EUROPEAN JOURNAL OF SOIL SCIENCE*. (51) 4:595-605
- Querejeta, J.I. 1998. Efectos del tratamiento combinado de suelo y planta sobre una repoblación con *Pinus halepensis* Mill en ambiente semiárido. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Quilchano, C., Maranon, T. 2002. Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 35(2), 102-107.
- Reynolds, P. E. 2001. Effects of forestry practices on forest microclimate. In Y. Villacampa, C. A. Brebbia & J. L. Uso (Eds.), *Ecosystems and Sustainable Development* lii (Vol. 10, pp. 623-634).

- Richards, L.A. 1941 A pressure-membrane extraction apparatus for soil solution. *Soil Science* 51, 377-386.
- Riffaldi R., Levi-Minzi, R., Saviozzi, A., Vanni, G., Scagnozzi, A. 1993. Effect of the disposal of sludge from olive processing on some soil characteristics, laboratory experiments, *Water Air Soil Poll.* 69 257-264.
- Rillig, M. C., Mummey, D. L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171(1), 41-53.
- Rillig, M.C., Aguilar-Trigueros, CA., Bergmann, J., Verbruggen, E., Veresoglou, S.D., Lehmann, A. 2015. Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. *New Phytologist* 205:1385-1388.
- Rillig, M.C., Mardatin, N.F., Leifheit, E.F., Antunes, P.M. 2010. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi increases soil water repellency and is sufficient to maintain water-stable soil aggregates. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1189-1191
- Rillig, M.C., Wright, S.F., Eviner, V.T. 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil* 238, 325-333.
- Roberson, E.B., Firestone, M.K. 1992. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1284-1291.
- Roldán A., Salinas-García J.R., Alguacil M.M., Caravaca F. 2007. Soil sustainability indicators following conservation tillage practices under subtropical maize and bean crops. *Soil and Tillage Research*, 93, 273-282.

- Roldán, A., Albaladejo, J. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) fungal populations in a Xeric Torriorthent receiving urban refuse. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 451-456.
- Roldán, A., Albaladejo, J. 1994. Effect of mycorrhizal inoculation and soil restoration on the growth of *Pinus halepensis* seedlings in a semiarid soil. *Biology and Fertility of soils* 18, 143-149.
- Roldán, A., Albaladejo, J., Thornes, J. 1996. Aggregate stability changes in a semiarid soil after treatment with different organic amendments. *Arid Soil Res. Rehab.* 10, 139–148.
- Roldán, A., Caravaca, F., Hernández, M.T., García, C., Sanchez-Brito, C., Velasquez, M., Tiscareño, M. 2002. Conservation tillage and crop residue mulching rapidly restored soil structure and microbial activity on degraded maize fields in the Patzcuaro watershed (Mexico). In: *Technology and methods of soil and water conservation*, Tsinghua University Press, Beijing, pp:215-221
- Roldán, A., Caravaca, F., Hernández, M.T., García, C., Sánchez-Brito, C., Velásquez, M., Tiscareño, M. 2003. No-tillage, crop residue additions, and legume cover cropping effects on soil quality characteristics under maize in Patzcuaro watershed (Mexico). *Soil and Tillage Reseach.* 72, 65-73.
- Roldan, A., Garcia Orenes, F., Lax, A. 1994b. An incubation experiment to determine factors involving aggregation changes in an arid soil receiving urban refuse. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 1699–1707.
- Roldan, A., Garcia-Orenes, F., Albaladejo, J. 1994a. Microbial populations in the rhizosphere of *Brachypodium retusum* and their relationship with stable aggregates in a semiarid soil of southeastern Spain. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 8, 105–114.

- Roldán, A., Salinas-García, J.R., Alguacil, M.M., Caravaca, F. 2005. Changes in soil microbial activity, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. *Applied Soil Ecology* 30:11-20.
- Rosacker, L.L., Kieft, T.L. 1990. Biomass and adenylate energy charge of a grassland soil during drying. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 1121-1127.
- Rosier, C.L., Hoyer, A.T., Rillig, M.C. 2006. Glomalin-related soil protein: assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biology and Biochemistry* (in press). DOI 10.1016/j.soilbio.2006.01.021.
- Ruiz Sinoga, J.D., Romero Diaz, A., Ferre Bueno, E., Martínez Murillo, J.F. 2010. The role of soil surface conditions in regulating runoff and erosion processes on a metamorphic hillslope (Southern Spain) Soil surface conditions, runoff and erosion in Southern Spain. *Catena*, 80, 2.
- Ruiz-Sinoga, J. D., Gabarron Galeote, M. A., Martinez Murillo, J. F., Garcia Marin, R. 2011. Vegetation strategies for soil water consumption along a pluviometric gradient in southern Spain. *Catena*, 84(1-2), 12-20.
- Sampedro, I., Aranda, E., Martin, J., Garcia-Garrido, J. M., Garcia-Romera, I., Ocampo, J. A. 2004. Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. *Applied Soil Ecology*, 26(2), 149-156.
- Sandalio, L.M. 1987. Superóxido dismutasas en peroxisomas vegetales especializados: localización intraorganelar y estudio de la producción de radicales libres de oxígeno. Tesis doctoral, universidad de Granada.
- Sardans, J., Penuelas, J. 2005. Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biology & Biochemistry*, 37(3), 455-461.

- Schaefer, C.E.R. 2001. Brazilian latosols and their B horizon microstructure as long-term biotic constructs. *Aust. J. Soil Res.* 39, 909– 926.
- Schrader, S., Zhang, H.Q. 1997. Earthworm casting: stabilization or destabilization of soil structure? *Soil Biol. Biochem.* 29, 469– 475.
- Schübler, A., Schwarzott, D., Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 102(12): 1413-1421.
- Schulten, H.R., Leinweber, P. 2000. New insights into organic–mineral particles: composition, properties and models of molecular structure. *Biol. Fertil. Soils* 30, 399–432.
- Schutter, M.E., Dick, R.P. 2002. Microbial community profiles and activities among aggregates of winter fallow and cover-cropped soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 142– 153.
- Schwing, J.F. 1978. Soil erosion in Alsace vineyards. Its importance and development in relation to agricultural practices. *Catena*, 5, 305–319.
- Seeger, M., Ries, J.B. 2010. Soil degradation and soil surface process intensities on abandoned fields in Mediterranean mountain environments. *Land Degradation and Development*, 19, 488–501.
- Siddiky, M.R.K., Kohler, J., Cosme, M., Rillig, MC. 2012. Soil biota effects on soil structure: interactions between arbuscular mycorrhizal fungal mycelium and collembola. *Soil Biology & Biochemistry* 50: 33-39.
- Singer, M.J., Southard, R.J., Warrington, D.J., Janitzky, P. 1992. Stability of synthetic sand clay aggregates after wetting and drying cycles. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 1843– 1848.

- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Denef, K. 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil & Tillage Research*, 79(1), 7-31.
- Six, J., Elliott, E.T., Paustian, K. 2000. Soil structure and soil organic matter: II. A normalized stability index and the effect of mineralogy. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 1042– 1049.
- Smith, S. N., Pugh, G. J. F. 1979. Evaluation of dehydrogenase as a suitable indicator of soil microflora activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 1(4), 279-281.
- Smith, SE., Read, DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Ed 3. Academic Press, New York.
- Soil Survey Staff 2010. *Keys to soil taxonomy*, 11th edn. USDANRCS, Washington DC.
- Spohn, M., Giani, L. 2010. Water-stable aggregates, glomalin-related soil protein, and carbohydrates in a chronosequence of sandy hydromorphic soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 42(9), 1505-1511.
- Spohn, M., Giani, L. 2010. Water-stable aggregates, glomalinrelated soil protein, and carbohydrates in a chronosequences of sandy hydromorphic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 45, 1505–1511.
- Tabatabai, M.A. 1982. Soil enzymes. In: Page, A.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis*. ASA and SSSA, Madison, WI, pp. 501–538.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. 1969. Use of *p*-nitrophenol phosphate in assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1, 301-307.

- Tejada, M., Hernandez, M. T., Garcia, C. 2007. Application of two organic wastes in a soil polluted by lead: Effects on the soil enzymatic activities. *Journal of Environmental Quality*, 36(1), 216-225.
- Tisdall, J.M., Oades, J.M. 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.* 33, 141–163.
- Treseder, K. K. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO<sub>2</sub> in field studies. *New Phytologist*, 164(2), 347-355.
- Valladares, F., Villar-Salvador, P., Domínguez, S., Fernández-Pascual, M., Peñuelas, J.L., Pugnaire, F.I. 2002. Enhancing the early performance of the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss: fertilisation versus Rhizobium inoculation, *Plant Soil* 240 253-262.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D. 1987. An extraction method for measuring microbial biomass carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 703–707.
- Vassilev, N., Baca, M.T., Vassileva, M., Franco, I., Azcón, R. 1995. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 546–549.
- Vassilev, N., Baca, M.T., Vassileva, M., Franco, I., De Nobili, M. 1998. Mineralization of three agro-industrial wastes by an acid-producing strain of *Aspergillus niger*, in: M. De Bertoldi, P. Sequi, B. Lenunes, T. Papi, (Eds.), *The science of composting*, Chapman and Hall, London, pp. 1375-1379.
- Vassilev, N., Franco, I., Vassileva, M., Azcón, R. 1996. Improved plant growth with rock phosphate solubilized by *Aspergillus niger* grown on sugar beet waste. *Bioresour. Technol.* 55, 237–241.

- Vassilev, N., Medina, A., Azcon, R., Vassileva, M. 2006. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant and Soil*, 287(1-2), 77-84.
- Vassilev, N., Vassileva, M. 2003. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), 435-440. 1318-3
- Vassileva, M., Serrano, M., Bravo, V., Jurado, E., Nikolaeva, I., Martos, V., Vassilev, N. 2010. Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1287-1299.
- Wright, S. F., & Anderson, R. L. 2000. Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. *Biology and Fertility of Soils*, 31(3-4), 249-253.
- Wright, S. F., Upadhyaya, A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, 161(9), 575-586.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular micorrizal fungi. *lant and Soil*, 198, 97–107.
- Wu, X., Zhang, X. K., Yu, J., Sun, X. M., Liang, W. J. 2012. Impact of organic amendments on nematode distribution within aggregate fractions in aeolian sandy soil. *Journal of Nematology*, 44(4), 497-497.
- Yanai, R.D., Fahey, T.J., Miller, S.L. 1995. Efficiency of nutrient acquisition by fine roots and mycorrhizae, in: W.K. Smith, T.M. Hinckley, (Eds.),

Resource physiology of conifers: Acquisition, allocation and utilization, Academic Press, London, pp. 75-103.

Zhang, S., Li, Q., Zhang, X., Wei, K., Chen, L., Liang, W. 2012. Effects of conservation tillage on soil aggregation and aggregate binding agents in black soil of Northeast China. *Soil & Tillage Research*, 124, 196-202.



