

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Afectación de la funcionalidad de suelos calcáreos sujetos a
diferentes usos en el área periurbana de Madrid**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan Pedro Martín Sanz

DIRECTORAS

María Inmaculada Valverde Asenjo
Ana de Santiago Martín

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas

Unidad Docente de Edafología



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

Tesis doctoral

**AFECTACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE SUELOS CALCÁREOS
SUJETOS A DIFERENTES USOS EN EL ÁREA PERIURBANA DE MADRID**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan Pedro Martín Sanz

Bajo la dirección de las Doctoras

María Inmaculada Valverde Asenjo

Ana de Santiago Martín

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. JUAN PEDRO MARTÍN SANZ,
estudiante en el Programa de Doctorado D9BI-DOCTORADO EN FARMACIA,
de la Facultad de Farmacología de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

AFECCIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE SUELOS CALCÁREOS SUJETOS
A DIFERENTES USOS EN EL ÁREA PERIURBANA DE MADRID

y dirigida por: MARÍA INMACULADA VALVERDE ASENJO
ANA DE SANTIAGO MARTÍN

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 2 de septiembre de 2019

Fdo.: JUAN PEDRO MARTÍN SANZ

4.2.2.1	<i>Concentraciones totales de los elementos traza y su relación con los parámetros del suelo.</i>	65
4.2.2.2	<i>Concentraciones potencialmente disponibles (DTPA) de los elementos traza y su relación con los parámetros del suelo.</i>	68
4.2.2.3	<i>Concentraciones inmediatamente disponibles (CaCl₂) de los elementos traza y su relación con los parámetros del suelo.</i>	71
4.3	Actividades enzimáticas de los suelos en función del uso	75
4.3.1	<i>Influencia de los parámetros físico-químicos de los suelos en las actividades enzimáticas en función del uso.</i>	78
4.3.2	<i>Influencia de la disponibilidad de elementos traza en las actividades enzimáticas en suelos bajo usos agrícolas.</i>	85
4.3.2.1	<i>Concentraciones totales</i>	86
4.3.2.2	<i>Concentraciones potencialmente disponible, extraídas con DTPA.</i>	89
4.3.2.3	<i>Concentraciones inmediatamente disponibles, extraídas con CaCl₂.</i>	92
4.3.2.4	<i>Regresiones lineales de las actividades enzimáticas no agrupadas.</i>	94
4.3.2.5	<i>Discusión sobre las relaciones encontradas entre actividades enzimáticas y elementos traza.</i>	96
4.4	Perfil catabólico a nivel comunidad en función del uso del suelo	103
4.4.1	<i>Color medio de pozo (AWCD), riqueza (S) e índices de biodiversidad ..</i>	103
4.4.2	<i>Diferencias en la utilización de substratos y de grupos de substratos de carbono entre usos.</i>	105
4.4.3	<i>Influencia de los parámetros físico-químicos del suelo en el perfil catabólico a nivel comunidad en función del uso.</i>	107
4.4.4	<i>Influencia de la disponibilidad de elementos traza en el perfil catabólico a nivel comunidad en función del uso.</i>	110
4.4.4.1	<i>Concentraciones totales</i>	111
4.4.4.2	<i>Potencialmente disponibles (DTPA)</i>	113
4.4.4.3	<i>Inmediatamente disponibles (CaCl₂)</i>	115
4.4.4.4	<i>Discusión general sobre los efectos de los elementos traza en los suelos estudiados.</i>	117
4.5	ADN bacteriano, fúngico y de arqueas en los suelos en función del uso	119
4.5.1	<i>Influencia de los parámetros físico-químicos de los suelos en el contenido de ADN en función del uso.</i>	122
4.5.2	<i>Influencia de la disponibilidad de elementos traza en el contenido de ADN en función del uso.</i>	124

4.5.2.1 Concentraciones totales	125
4.5.2.2 Concentraciones potencialmente disponibles (DTPA)	127
<i>e inmediatamente disponibles (CaCl₂).</i>	
4.6 Ensayos ecotoxicológicos	130
4.6.1 Ensayo de reproducción y bioacumulación con <i>Eisenia fetida</i>	130
4.6.2 Ensayo de elongación radicular con <i>Lactuca sativa</i>	134
4.6.2.1 Influencia de los parámetros físico-químicos de los suelos ...	135
<i>en el test de elongación radicular con Lactuca sativa en función</i>	
<i>del uso.</i>	
4.6.2.2 Influencia de la disponibilidad de elementos traza en	137
<i>el test de elongación radicular con Lactuca sativa en función del uso</i>	
4.7 Aplicación del análisis de redes a los suelos de estudios	143
5. Conclusiones	157
6. Referencias Bibliográficas	163
APÉNDICES	189

Resumen

El suelo es un recurso natural cuyo aprovechamiento es esencial para el ser humano debido a la multitud de servicios que le proporciona y de los que obtiene beneficio. En este aprovechamiento se puede producir un deterioro del suelo pudiendo poner en riesgo su capacidad futura para desempeñar sus funciones. En este sentido, los suelos agrícolas se encuentran sometidos a prácticas que pueden poner en riesgo su funcionalidad al afectar a sus propiedades físicas, químicas y biológicas. A este hecho es necesario añadir la posible entrada de contaminantes a través del empleo de agroquímicos y, en el caso de entornos periurbanos, por deposición aérea. Esta entrada de contaminantes, que se produce en bajas concentraciones a lo largo de mucho tiempo, y su posible interacción con el resto de los parámetros del suelo, influyendo en la funcionalidad de éste, ha sido escasamente estudiada en trabajos de campo. Por todo ello, en esta Tesis se ha investigado si existe una afectación de la funcionalidad de suelos agrícolas periurbanos evaluando las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos, además de sus interacciones.

Las muestras se tomaron en suelos calcáreos del sureste de Madrid bajo los usos de cultivo secano y olivar, tomando como referencia suelos naturales. En todas las muestras de suelo se llevó a cabo una caracterización de sus propiedades físico-químicas y se estudió la disponibilidad de 16 elementos traza (As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, V y Zn) mediante extracciones simples: contenido total extraído con *aqua regia*, contenido potencialmente disponible extraído con DTPA y contenido inmediatamente disponible extraído con CaCl_2 . Desde el punto de vista biológico se determinaron 12 actividades enzimáticas (α -glucosidasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, fenoloxidasa, arilamidasa, N-acetil-glucosaminidasa, ureasa, fosfatasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, arilsulfatasa y deshidrogenasa), se analizó el perfil catabólico a nivel comunidad (CLPP) a través del estudio de placas Biolog EcoPlate, se determinó el contenido de ADN de bacterias, hongos y arqueas y, para representar organismos superiores, se llevó a cabo un ensayo de reproducción de *Eisenia fetida* y de germinación y elongación radicular de *Lactuca sativa*. Mediante análisis de la varianza de una vía, análisis de redundancia y análisis de redes se determinó la influencia del uso en estos parámetros biológicos.

Las prácticas agrícolas tuvieron reflejo en una menor cantidad de materia orgánica y de los parámetros relacionados con ella en los suelos de cultivo, y en una mayor cantidad de fósforo disponible en los suelos de secano a causa de la fertilización. Así mismo, la concentración de Cu fue superior en los usos de cultivo, especialmente en el uso de secano, que también mostró concentraciones superiores de Zn que el uso olivar. En cambio, el uso forestal mostró mayores concentraciones de Pb total y de Cd, Pb y Zn potencialmente disponible.

En la disponibilidad de los elementos traza, los óxidos de Fe y Mn tuvieron un papel determinante en los suelos de cultivo, mientras que en los suelos forestales la materia orgánica también desempeñó un papel fundamental. La disponibilidad potencial de varios elementos (Cu, Zn y Pb) estuvo relacionada con la presencia de fósforo disponible, mayores concentraciones de As, Ba y Sb estuvieron relacionadas con la cercanía a Madrid y en los suelos olivar y forestal la fracción carbonatada retuvo elementos traza. Los contenidos en materia orgánica soluble regularon las concentraciones inmediatamente disponibles de Co, Cu, Mo, Ni y Zn, especialmente en el uso forestal.

Las actividades enzimáticas, el CLPP y los contenidos de ADN mostraron ser indicadores sensibles a la hora de diferenciar entre usos de cultivo y forestal, mostrando una afectación de la funcionalidad del suelo. Además, las actividades enzimáticas fueron indicadores sensibles a la disponibilidad de elementos traza, siendo los únicos indicadores capaces de diferenciar entre los tres usos estudiados. En los ensayos llevados a cabo con *Eisenia fetida* y *Lactuca sativa* los parámetros físico-químicos del suelo regularon las respuestas obtenidas, a excepción del contenido total en Se de los suelos de secano que mostró inhibir el porcentaje de germinación.

El empleo de técnicas de análisis de redes en el estudio del suelo ha permitido identificar, junto con el análisis de redundancia, patrones en las actividades enzimáticas de los suelos de cultivo, generando una imagen global y diferencial de los tres usos del suelo estudiados y mostrando potencial para ser empleada en futuros estudios de funcionalidad y calidad del suelo, mediante el estudio comparativo y temporal de los mismos.

1. Introducción

1. Introducción

El suelo es uno de los recursos naturales que más tiempo lleva la Humanidad aprovechando y, debido a ese aprovechamiento, desde el inicio de la Agricultura se ha modificado el equilibrio natural del suelo, pudiendo incluso haber provocado históricamente el colapso de civilizaciones tempranas de Oriente Medio y Norte África (Lowdermilk, 1953). Para solventar los desequilibrios de los suelos agrícolas el ser humano tiende a reflejar el funcionamiento de la naturaleza: labra el suelo para aumentar la porosidad y facilitar la entrada de agua al igual que lo harían los organismos del suelo o la vegetación a través de las raíces, aporta nutrientes al suelo en forma de abonos y fertilizantes como se produciría de forma natural por la deposición, descomposición y reciclaje de la materia orgánica y emplea fitoquímicos para controlar plagas como sucede de forma natural entre la interacción de plantas con microorganismos. Sin embargo, la gran complejidad del suelo genera que una actuación parcial sobre un componente del suelo, como pueda ser el labrado, ejerza efectos sobre otros componentes, como por el ejemplo la disminución paulatina de la materia orgánica soluble debido al labrado del suelo (Bolan et al., 2011). Por tanto, teniendo en cuenta que los suelos en sí mismos son muy diversos, al igual que los cultivos y manejos a los que se encuentran sometidos, es necesario el estudio de los posibles efectos adversos que cualquier práctica pueda ejercer en las componentes físicas, químicas o biológicas del suelo (Parr et al., 1992).

En caso de no ser capaces de gestionar de forma correcta los suelos se pondrá en riesgo su funcionamiento en el futuro, es decir, su funcionalidad y su calidad. Históricamente se ha empleado la connotación de que un buen suelo es capaz de generar grandes cosechas y durante cuanto más tiempo mejor. Para Mausel (1971), uno de los primeros artículos en tratar este tema, la calidad del suelo se podría definir a partir de la capacidad que tiene un suelo en producir una serie de cultivos con valor económico en su zona de estudio. Posteriormente, el concepto se fue ampliando para dar cabida a la evolución temporal que puede tener un suelo, de esta forma Karlen et al. (1997) definen la calidad del suelo como "la capacidad de un tipo específico de suelo para funcionar, dentro de los límites de los ecosistemas naturales o gestionados, para mantener la productividad de las plantas y los animales, mantener o mejorar la calidad del agua y el aire, y sustentar la salud y la vivienda humana". En este sentido el suelo deja de ser únicamente tratado como un soporte aislado de una cosecha, se le trata como a un elemento clave del medio ambiente, que interacciona con otros compartimentos

del mismo, que puede cambiar a lo largo del tiempo y que es indispensable para el ser humano, proporcionándole efectos beneficiosos, es decir, servicios ecosistémicos (Costanza y D'Arge, 1997).

Según la Comisión Europea (2006) el suelo cubre los siguientes servicios ecosistémicos:

- 1) Producción de biomasa, incluidos los bienes de producción en agricultura y silvicultura.
- 2) Funciones reguladoras del suelo, que comprenden almacenar, filtrar y transformar nutrientes, sustancias y agua.
- 3) Reserva de biodiversidad, como hábitats, especies y genes.
- 4) Entorno físico y cultural para humanos y actividades humanas.
- 5) Fuente de materias primas como arena, arcilla o turba.
- 6) Reserva de carbono.
- 7) Archivo del patrimonio geológico y arqueológico.

A su vez, de acuerdo a Bünemann et al. (2018) y Glenk et al. (2012), las funciones del suelo son los procesos que se dan en él y que de forma individual o agrupada permiten que el suelo preste servicios ecosistémicos, pudiéndose encontrar las funciones del suelo, y por consiguiente los servicios ecosistémicos, afectados por distintas amenazas:

- 1) Pérdida de biodiversidad (Katayama et al., 2019).
- 2) Salinización (Singh, 2015).
- 3) Desequilibrio de nutrientes y contaminación (Luo y Gu, 2016; Micó et al., 2006)
- 4) Compactación (Shah et al., 2017).
- 5) Sellado (Pérez y García, 2016).
- 6) Acidificación (Rasmussen y Rohde, 1989).
- 7) Erosión (Lal, 1998).
- 8) Pérdida de carbono orgánico (Bolan et al., 2011).

Por todo ello, es necesario conocer el estado de calidad del suelo para poder gestionarlo de una manera más eficiente (Herrick, 2000), poder clasificarlo y comparar la calidad de los suelos en diferentes zonas o en una misma localización a lo largo del tiempo (Nortcliff, 2002). Con estos objetivos varios países en el mundo, entre ellos Canadá, Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, Francia, Reino Unido o Irlanda, tienen, o han tenido, programas estatales para monitorizar la calidad del suelo. En cada uno de estos programas se definen los servicios

ecosistémicos y funciones del suelo que se quieren controlar, realizándose después una selección de indicadores para representar las características físicas, químicas y biológicas de los suelos bajo estudio.

La selección de un conjunto mínimo de indicadores a partir del set completo de los posibles indicadores de calidad del suelo es un paso necesario, puesto que es inviable, e incluso imposible, analizar todos ellos debido al coste que representaría (Bünemann et al., 2018). Sin embargo, los estudios con una amplia cantidad de variables y de larga duración para conocer la influencia de las perturbaciones en los suelos son necesarios (Bloem et al., 2005). La selección de indicadores debería basarse principalmente en los distintos usos y en los distintos tipos de suelos, además de en aspectos obvios como que exista una relación entre función del suelo-indicador, que sea sencillo de medir o que sea suficientemente sensible a los distintos manejos (Nortcliff, 2002; Parr et al., 1992). Por tanto, es muy complicado, por no decir casi imposible, establecer un set de indicadores y de valores de estos indicadores de forma universal (Bünemann et al., 2018), siendo necesario ver la calidad del suelo desde un punto de vista más relativo que absoluto (Karlen et al., 1997).

En un mundo en el que para el año 2050 se ha estimado una población entre 9,4 y 10,1 miles de millones de personas (United Nations, Department of Economic y Social Affairs, 2019), los suelos dedicados a agricultura suponen un factor determinante como sustento de la población y, por tanto, su calidad y funcionalidad debería ser monitorizada. A pesar de su rol central en el mundo, los suelos agrícolas se encuentran sometidos a procesos de degradación que ponen en riesgo su capacidad, total o parcial, para desempeñar los servicios ecosistémicos que se le suponen. El servicio ecosistémico principal de los suelos agrícolas es la producción de bienes en forma de cosecha, pero para este cometido son igualmente necesarias: i) su capacidad reguladora de nutrientes, en la que cobra gran importancia la del suelo, que a su vez influye en que los suelos sean fuente o sumidero de carbono y puedan, por tanto, influir positiva o negativamente en el cambio climático (Lal, 2004), ii) su capacidad de amortiguación frente a la entrada de diversos contaminantes en el suelo de forma directa a través de fertilizantes (Nziguheba y Smolders, 2008), fitoquímicos (Giller et al., 1998), agua de riego (Edelstein y Ben-Hur, 2018) o por deposición aérea (Nicholson et al., 2003), con el consiguiente riesgo que supone esta entrada de químicos en la cadena trófica (Gall et al., 2015) o su paso a otros compartimentos medioambientales como las aguas subterráneas (Böhlke, 2002), y iii) su

biodiversidad, especialmente la microbiológica, que influye en los ciclos biogeoquímicos favoreciendo el equilibrio de nutrientes de los suelos (Tabatabai, 1982) y disminuyendo a su vez la necesidad de fitoquímicos al reducir la cantidad de plagas (Jabran, 2017; Jabran et al., 2015).

A la afectación de la funcionalidad de los suelos debido a su uso agrícola habría que incorporar la posible afectación derivada de la entrada adicional de elementos traza ajenos al uso. Los elementos traza representan un mayor riesgo debido a su carácter persistente, acumulable y tóxico (Adriano, 2001), siendo los principales contaminantes que aparecen en los suelos de Europa, representando un 36%, en España un 17% (Van Liedekerke et al., 2014) y en la Comunidad de Madrid un 54% (Comunidad de Madrid, 2019).

Los estudios de afectación del suelo por elementos traza se han llevado a cabo, por lo general, bajo tres aproximaciones: i) considerando suelos que presentan una elevada contaminación, ii) investigando, predominantemente, los efectos producidos por un número reducido de elementos traza, y iii) realizando muchos de los estudios en condiciones de laboratorio empleando soluciones a distintas concentraciones del o de los elementos traza e, incluso, empleando suelos artificiales. Estas aproximaciones muestran una serie de limitaciones a la hora de extrapolar los resultados: i) los suelos por lo general no tienen niveles tan altos de contaminación, habitualmente los suelos muestran concentraciones reducidas de una mezcla de elementos traza, ii) la contaminación de los suelos en laboratorio se suele realizar empleando, por lo general, sales aniónicas de los elementos traza, favoreciendo su (bio)disponibilidad y mostrando efectos tóxicos a menores concentraciones, mientras que en suelos *in situ* la entrada de los elementos traza es paulatina a lo largo de, normalmente, mucho tiempo donde influyen numerosos condicionantes (componentes físico-químicos del suelo, variaciones climáticas, etc.) en su (bio)disponibilidad, y iii) los suelos artificiales no son suelos *sensu stricto* sino que se emplean más como matriz portadora del contaminante, por lo que el papel que juegan los distintos componentes físico-químicos de los suelos en la (bio)disponibilidad de los elementos traza no se tienen en cuenta.

Los anteriores estudios muestran una baja aplicabilidad cuando se considera que las condiciones en las que se han llevado a cabo distan, en gran medida, de las habituales encontradas en campo. Existe un gran desconocimiento, ya que son escasos los estudios de la

afectación del suelo cuando la mezcla de elementos traza presentes es numerosa y se encuentran en bajas concentraciones.

En este contexto, el estudio de los suelos agrícolas en un entorno urbano e industrial reviste un especial interés ya que: i) debido a su localización, los suelos pueden recibir continuos y reducidos aportes de elementos traza, no solo de las prácticas agrícolas, sino también por deposición aérea (De Miguel et al., 1999; Vázquez de la Cueva et al., 2014), no percibiéndose una contaminación aunque pueda existir una afectación de la funcionalidad del suelo, y ii) alertan sobre una potencial contaminación que, en la actualidad, puede pasar desapercibida. Estas consideraciones adquieren una especial relevancia si se considera el enfoque preventivo del marco normativo en la Unión Europea, cuyo fin es garantizar la utilización sostenible a largo plazo de los recursos naturales.

2. Hipótesis y Objetivos

2 Hipótesis y Objetivos

En el contexto planteado, se pone de manifiesto la necesidad de realizar nuevas investigaciones que den respuesta a las siguientes HIPÓTESIS:

- El manejo al que están sujetos los suelos agrícolas afecta a sus propiedades físicas, químicas y biológicas, repercutiendo en la funcionalidad del suelo.
- Los suelos agrícolas pueden experimentar una acumulación de elementos traza provenientes de su manejo y, adicionalmente, de su localización en el entorno de un gran núcleo de población.
- Las poblaciones microbianas y organismos superiores son sensibles a las alteraciones de la funcionalidad del suelo asociada a las actividades agrícolas y al entorno urbano
- La dificultad aparejada a las interacciones entre los componentes del suelo, la disponibilidad de elementos traza y la actividad biológica del suelo encuentra solución en el empleo de técnicas de procesamiento de datos, del tipo de RDA y análisis de redes, que permiten identificar alteraciones de la funcionalidad del suelo difíciles de detectar de otra manera.

Para contrastar estas hipótesis se han establecido los siguientes OBJETIVOS:

- Identificar y cuantificar el efecto que ejercen los usos en las propiedades físico-químicas de los suelos.
- Identificar el efecto ejercido por los usos del suelo en la disponibilidad de elementos traza.
- Evaluar el efecto ejercido por los usos del suelo y por la disponibilidad de elementos traza en la población microbiana y organismos superiores.
- Identificar alteraciones de la funcionalidad del suelo mediante técnicas de procesamiento de datos.

Esta investigación se ha llevado a cabo en suelos agrícolas del área mediterránea tomando como referencia suelos no afectados por el uso.

Este Tesis doctoral se encuadra en la investigación llevada a cabo por el grupo de investigación SIAM de la UCM de Madrid (Ref.: 950605) a través del proyecto competitivo de investigación del Programa de Actividades I+D de la Comunidad de Madrid, titulado: Caracterización, Modelización, Remediación y Evaluación del Riesgo de Suelos Contaminados y Aguas Subterráneas – CARESOIL. (Ref.: P2018/EMT-4317) y (Ref.P2013/MAE2739)

3. Material y Métodos

3 Material y Métodos

3.1 Diseño experimental

En los suelos agrícolas de entornos periurbanos a la posible afección generada por la perturbación del suelo a través del labrado y/o empleo de agroquímicos es necesario añadir la posible entrada de contaminantes por deposición aérea en el entorno de la ciudad. Entre los posibles contaminantes que pueden recibir estos suelos los elementos traza reclaman especial atención por su condición de persistentes y acumulables en el suelo, aspectos en los que puede influir el uso al que se someta el suelo.

Para estudiar las posibles afectaciones de la funcionalidad de suelos calcáreos periurbanos de Madrid se tomaron un total de 60 muestras divididas en tres usos: i) cultivo de cereal, denominado en adelante uso de secano, ii) olivar y iii) suelos naturales sin apreciable acción antrópica, denominado en adelante uso forestal. Estas 60 muestras se agruparon en 20 puntos, de tal forma que en cada uno de estos puntos los tres usos a estudiar fueran colindantes para reducir posibles variaciones entre las muestras de un mismo punto debido a una distinta litología, diferencias en el clima, distinta topografía, etc.

Para conocer la influencia que ejerce el uso en la funcionalidad de los suelos se llevaron a cabo una serie de determinaciones de parámetros físico-químicos que, a su vez, podrían regular la disponibilidad de los elementos traza presentes en estos suelos. La actividad biológica de los suelos es uno de los indicadores más tempranos de afectación, por lo que se estudió cómo influían los parámetros-físico químicos y la disponibilidad de los elementos traza en distintos indicadores biológicos: i) actividades enzimáticas que reflejan el reciclaje de nutrientes en los suelos, ii) perfil catabólico a nivel comunidad mediante el uso de placas Biolog EcoPlate, como indicadores de biodiversidad funcional, iii) ADN de bacterias, hongos y arqueas como bioindicadores de la diversidad de los principales grupos de microorganismos, iv) reproducción y bioacumulación de metales traza en *Eisenia fetida* por ser un organismo superior situado en las primeras fases de la cadena trófica y v) ensayo de elongación radicular con *Lactuca sativa* como representante de la capacidad de los suelos de generar un medio idóneo para el desarrollo vegetal.

Con el fin de determinar si el uso introduce una variación en todos los componentes determinados (parámetros físico-químicos del suelo, disponibilidad de elementos traza y

actividades biológicas) se llevaron a cabo análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Así mismo, para discernir los posibles efectos ejercidos por los parámetros físico-químicos de los suelos en la disponibilidad de elementos traza y determinar qué parámetros del suelo tenían una mayor influencia sobre los distintos índices de disponibilidad determinados, se llevaron a cabo análisis de redundancia (RDA). En el estudio de las actividades biológicas, se emplearon RDA con el fin de determinar si los parámetros físico-químicos del suelo y disponibilidad de elementos traza influían en ellas, y en tal caso conocer cuáles representaban un papel más importante en cada indicador de actividad biológica empleado. Para apoyar los análisis de redundancia se emplearon correlaciones bivariadas de Spearman, empleadas también como base de análisis de redes efectuados para estudiar como interaccionan todos los componentes determinados entre sí y para la obtención de patrones de agrupamientos de variables con el fin de facilitar y mejorar el análisis de la gran cantidad de datos generados.

3.2. Localización de los puntos de muestreo

3.2.1. Estudio geoestadístico

Se pretendió localizar una zona de Madrid en la que los tres usos de suelos (secano, olivar y forestal) fueran colindantes. Para localizar los puntos de muestreo de esta Tesis Doctoral, se tomaron como punto de partida los resultados obtenidos en un estudio previo en el que se muestrearon 122 puntos en un área de 1.050 km² (30x35 km) al SE de la zona metropolitana de Madrid, caracterizada por una variada litología (yesos, calizas, arenas, gravas, etc.) y usos del suelo (industrial, agrícola, forestal y residencial). En esta zona se identificaron y seleccionaron los puntos de muestreo a partir de dos mallas alineadas con el sistema de proyección UTM. La primera malla era de 5 x 5 km y se seleccionaron 48 de un total de 56 nodos. La segunda era de 1 x 1 km y se seleccionaron al azar 74 nodos, lo que hace un total de 122 puntos de muestreo (Vázquez *et al.*, 2014). Posteriormente, las muestras fueron analizadas.

De los análisis de laboratorio efectuados se escogieron, para esta Tesis, los resultados correspondientes al contenido metálico total y, además, las fracciones inmediatamente disponibles y potencialmente disponibles de Cd, Cu, Pb y Zn, dado que el contenido metálico

total no es un buen indicador del grado de contaminación y, por tanto, de afectación de la funcionalidad del suelo. Con estos datos se realizó la distribución geoespacial que se presenta a continuación, empleando técnicas geoestadísticas, con modelos de variogramas y kriging de datos (Martín-Sanz *et al.*, 2017).

3.2.1.1. Consideraciones previas de las técnicas geoestadísticas

Al estudiar cómo se distribuye espacialmente una variable natural existe la imposibilidad espacial, temporal y económica de muestrear completamente toda una zona de estudio (dominio), haciéndose necesario inferir los valores de la variable a estudiar en todo el dominio a partir de las medidas llevadas a cabo en un número finito de puntos. La Geoestadística pretende llevar a cabo dicha inferencia mediante un estimador que minimice la varianza del error.

En muchísimos casos, la variable natural sujeta a estudio muestra una tendencia espacial aleatoria y otra tendencia espacial estructurada que puede ser modelizada. Como paso inicial en el análisis geoestadístico, se lleva a cabo la modelización de la tendencia espacial de la variable a estudiar a través de un variograma experimental. Éste se realiza a partir de los valores de la variable en los puntos donde se ha medido. La idea germinal del variograma es que si $Z(x)$ es el valor de la variable en el punto x , $Z(x+h)$ es el valor de esa variable en otro punto que dista de x una distancia h , de forma que si h tiende a cero los dos puntos estarán más cercanos entre sí. Si la variable tiene una tendencia espacial estructurada, la diferencia $Z(x)-Z(x+h)$ también tenderá a cero, cuanto mayor sea h los valores $Z(x)$ y $Z(x+h)$ serán más distintos entre sí. Si extrapolamos este razonamiento a un plano existirán múltiples puntos separados de x una distancia h , por lo que existirán múltiples valores de $Z(x)-Z(x+h)$. El variograma experimental expresa toda esta información de forma resumida, y a partir de los datos se estima como:

$$\gamma(h) = \frac{1}{2N(h)} \sum_{i=1}^{N(h)} \{Z(x_i) - Z(x_i + h)\}^2$$

Dónde $Z(x_i)$ son los valores de la variable Z en los puntos medidos x_i , $N(h)$ es el número de pares de datos separados una distancia h y $Z(x_i+h)$ son los valores de la variable Z en los puntos que distan una distancia h del punto x_i . Con el fin de facilitar la comprensión de la obtención

del variograma experimental en la Figura 1 se muestra el cálculo y el variograma obtenido para una función ficticia de una dimensión. En el caso de la Figura 1, la variable toma seis valores en otros tantos puntos separados entre sí una distancia de una unidad. Se

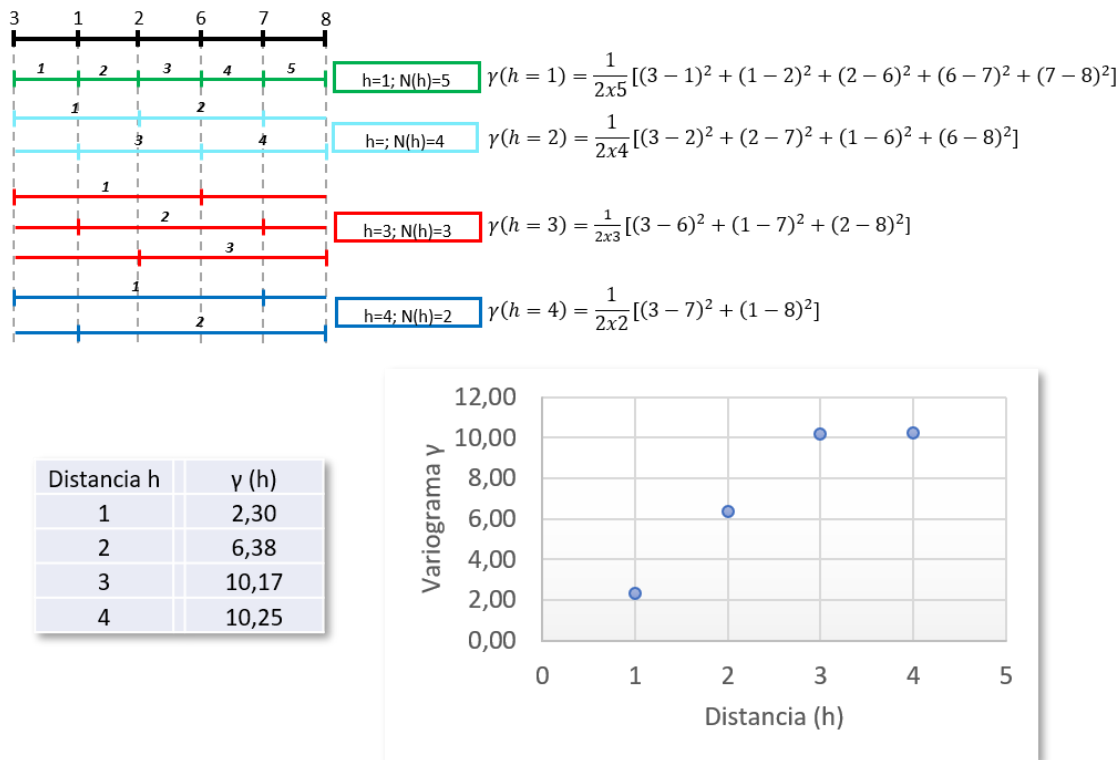


Figura 1: Obtención de un variograma a partir de una variable ficticia de una dimensión

han llevado a cabo los cálculos para los valores de distancia h de 1,2,3 y 4 unidades, dibujándose el variograma que se obtendría en este ejemplo. Los cálculos necesarios en un ejemplo tan sencillo son simples y su cantidad reducida, sin embargo, en el caso de una superficie el cálculo se hace más complejo puesto que hay que tener en cuenta todos los pares de puntos separados entre sí a las distintas distancias h dentro del dominio.

Al variograma experimental se le superpone un modelo generado a partir de variogramas teóricos que se ajustan progresivamente para conseguir el mejor ajuste posible. Para definir el variograma teórico se distinguen tres partes (Figura 2): i) pepita (*nugget*) que es el valor $\gamma(h)$ distinto de cero cuando la distancia $h=0$, ii) rango (*range*), definido como la distancia máxima a la que se encuentra dependencia espacial entre los puntos de la función estudiada y iii) el valor de meseta (*sill*) definido como el valor asintótico al que llega el variograma cuando la variable no muestra dependencia espacial entre los puntos.

Una vez se ha definido el variograma teórico que mejor se ajusta al experimental, se lleva a cabo el kriging que es la estimación de los valores de la variable estudiada en todo el dominio (zona de estudio). El resultado, como se ha comentado anteriormente, es una representación espacial de la distribución de la variable de estudio sobre toda la zona estudiada, pero con la ventaja, frente a otros métodos de interpolación, de tener en cuenta la posición espacial de todos los puntos analizados y las relaciones entre ellos, logrando menores errores y una mayor representatividad de los resultados.

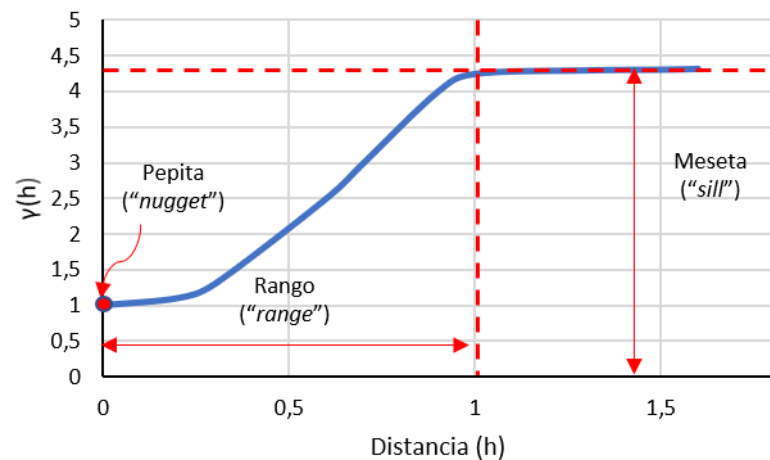
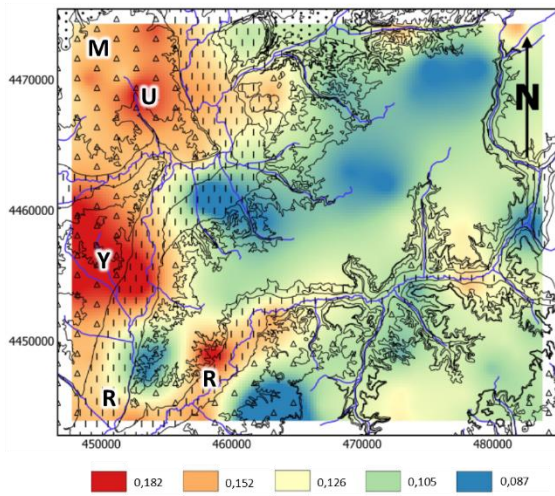


Figura 2: Esquema de un variograma con sus partes principales.

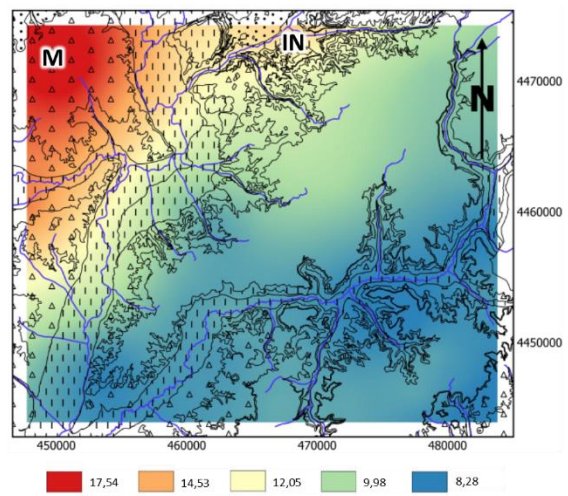
3.2.1.2 Aplicación de técnicas geoestadísticas a la selección de los puntos de muestreo

Como resultado del análisis geoestadístico, en el que se modelizaron los variogramas de las concentraciones totales, potencialmente disponibles (EDTA) e inmediatamente disponibles (CaCl_2) de Cd, Cu, Pb y Zn (Tabla 1), se generaron una serie de mapas de distribución espacial de cada variable empleando kriging ordinario (Figura 3). No fue posible realizar el análisis geoestadístico para los datos de Pb y Zn inmediatamente disponibles puesto que el comportamiento que presentaban sus variogramas era el de un valor continuo en toda la zona de estudio, por lo que el mapa resultante estaría únicamente formado por un valor constante, visualizándose con un solo color. Esta casuística puede deberse a que la distancia entre nodos sea excesivamente grande, lo que produciría que en el modelizado del variograma experimental no fuese posible determinar la existencia de relaciones espaciales, al producirse éstas a una escala menor. Por otro lado, a pesar de haber modelizado Cd- CaCl_2 , el modelo

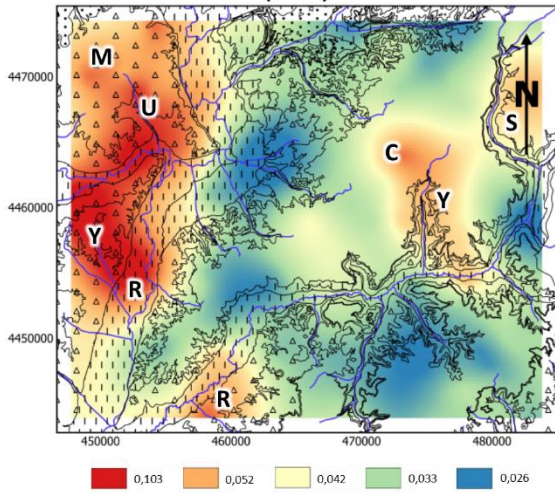
Concentraciones totales de Cd



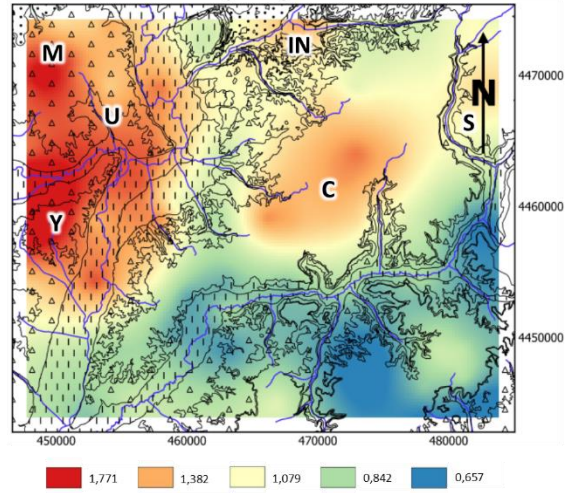
Concentraciones totales de Cu



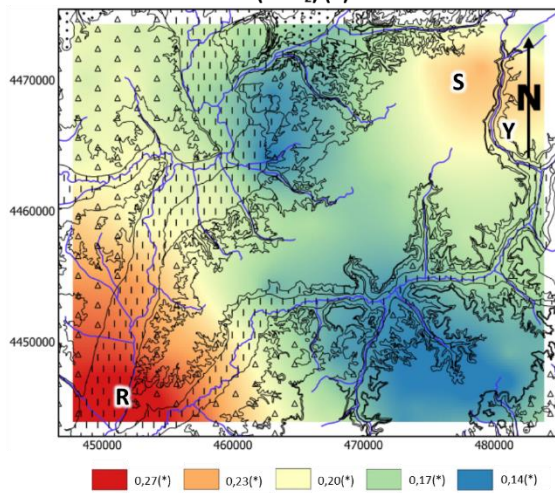
Concentraciones potencialmente disponibles de Cd (EDTA)



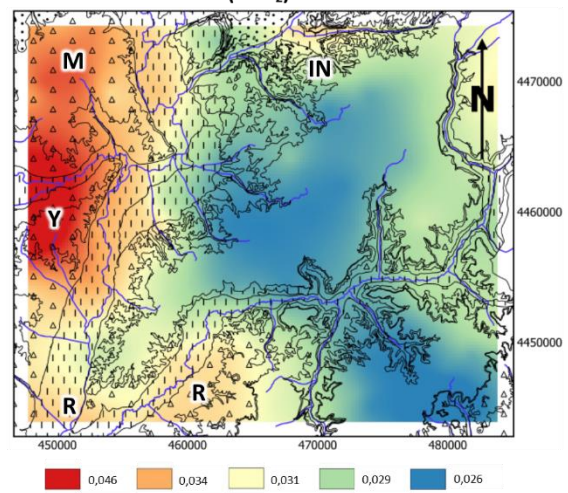
Concentraciones potencialmente disponibles de Cu (EDTA)



Concentraciones inmediatamente disponibles de Cd (CaCl₂) (*)



Concentraciones inmediatamente disponibles de Cu (CaCl₂)



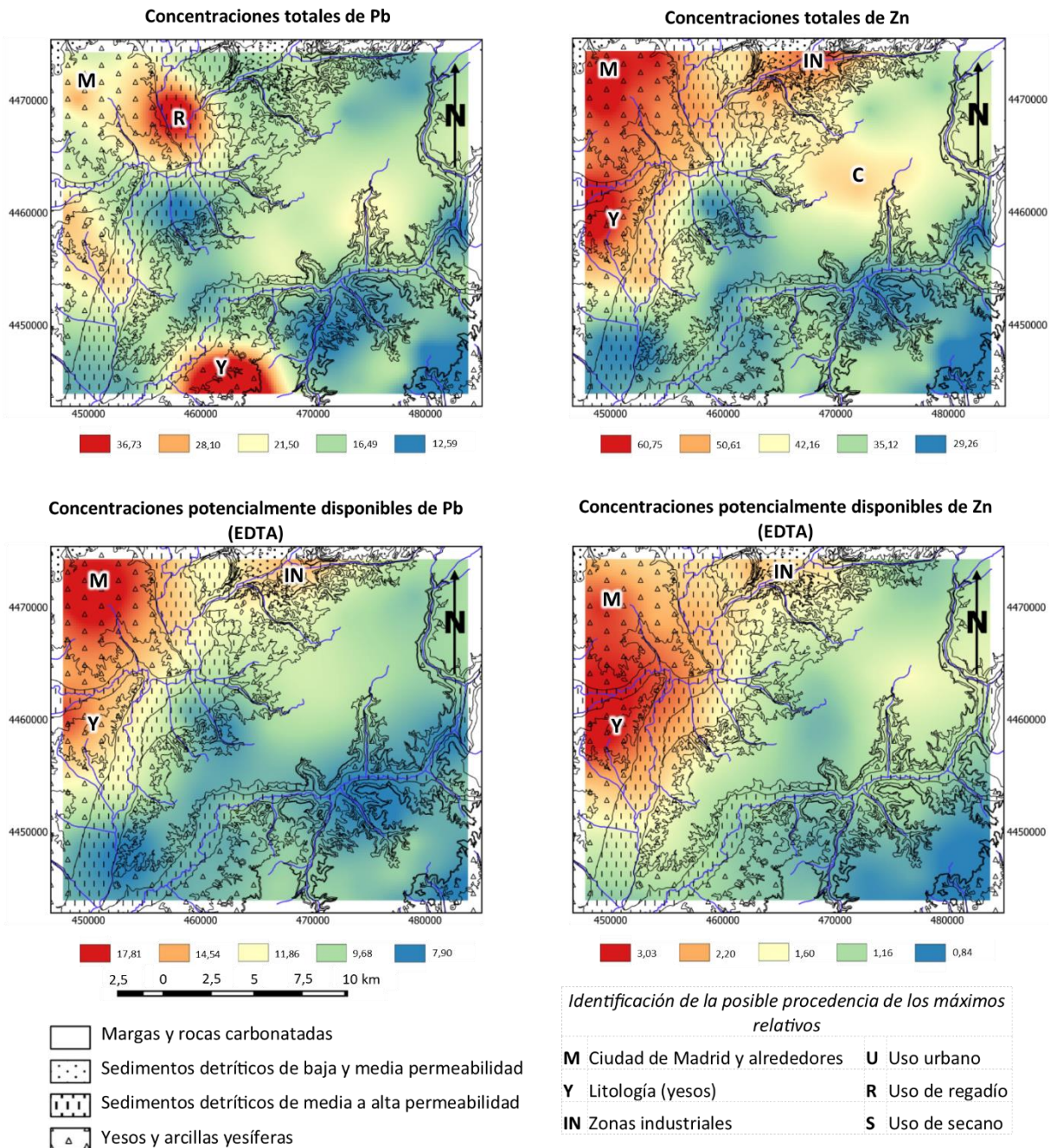


Figura 3: Mapas generados mediante kriging ordinario de las concentraciones totales (T), potencialmente disponibles (EDTA) e inmediatamente disponibles (CaCl₂) de los metales Cd, Cu, Pb y Zn expresadas en mg/kg. (*) indica unidades multiplicadas por 10⁻³

resultante muestra un valor de alcance extremadamente grande, 3162310 m (Tabla 1), por lo que dicho modelo presentaría una menor fiabilidad que la reflejada en su porcentaje de varianza explicado (64,36%).

Tabla 1. Resumen de los modelos seleccionados para llevar a cabo la interpolación geoestadística de las concentraciones totales (T), potencialmente disponibles (EDTA) e inmediatamente disponibles (CaCl₂) de los metales Cd, Cu, Pb y Zn.

Variable	Modelo del variograma	Nugget	Meseta	Alcance (m)	Kappa	Porcentaje de varianza explicado
CdT	Matern	0,20	0,14	3000	0,5	41,60
CuT	Matern	0,20	0,29	12628	3,38	59,95
PbT	Esférico	0,15	0,16	10100	-	51,85
ZnT	Matern	0,09	0,07	5600	0,5	45,52
CdEDTA	Esférico	0,10	0,11	7750	-	53,35
CuEDTA	Matern	0,21	0,16	6000	0,5	44,08
PbEDTA	Matern	0,24	0,12	8000	0,5	32,51
ZnEDTA	Matern	0,40	0,22	13436	0,5	35,86
CdCaCl ₂	Exponencial con potencia	1,07	1,93	3162310	0,5	64,36
CuCaCl ₂	Matern	0,15	0,02	3568	0,5	13,39
PbCaCl ₂	Matern	0,64	0,04	0,001	0,5	6,09
ZnCaCl ₂	Matern	0,86	0,00	0	0,5	0,07

Las concentraciones de los cuatro elementos fueron generalmente menores que los límites legales establecidos para la agricultura por la Comisión Europea (1986) y España (BOE 1990), aunque si superaron las concentraciones de fondo (De Miguel *et al.*, 1999; Vázquez de la Cueva *et al.*, 2014)

En la Figura 3 se representan, en coloraciones rojizas para cada metal (Cd, Cu, Pb y Zn), los valores máximos de concentración obtenidos con las distintas extracciones metálicas (totales, inmediata y potencialmente disponibles), dejando patente las discrepancias en los patrones de distribución para cada metal.

Por otro lado, en la mayoría de los casos se aprecia un gradiente de concentraciones máximas en dirección NW-SE que parte de la ciudad de Madrid y sus alrededores (representado por "M"), es el caso de Cd-T, Cu-T, Zn-T, Cu-EDTA, Pb-EDTA, Zn-EDTA y Cu-CaCl₂. Hace excepción la concentración Cd-CaCl₂ y el contenido de Pb-T que no siguen este patrón. Este resultado es probable que sea causado por la deposición de partículas procedentes del tráfico rodado así

como de los polígonos industriales ubicados en la zona (De Miguel *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004; Manta *et al.*, 2002).

No obstante, la variación del contenido metálico puede depender de otros factores como es la litología representada por “Y” en la zona de yesos y por “C” en las zonas de explotación de canteras de caliza. Otras fuentes locales de contaminación (representadas por “IN”) como las emisiones industriales, los materiales de construcción y los depósitos de residuos no controlados producen valores atípicos de estos metales en el suelo. Por último, el uso agrícola (“R” para regadío y “S” para seco), por ejemplo en los valles de los ríos Jarama y Tajuña, constituye una posible entrada de estos metales pesados asociada al empleo de fertilizantes fosfatados en los que pueden estar presentes (Nziguheba y Smolders, 2008), a fertilizantes orgánicos procedentes de depuradoras (Alloway, 2013) o al riego con aguas residuales (Edelstein y Ben-Hur, 2018).

A partir de los mapas de la distribución espacial llevados a cabo se seleccionaron 20 puntos de muestreo (Figura 4) atendiendo a los siguientes criterios:

- que en cada zona estuvieran presentes los tres usos principales (secano, olivar y forestal) de forma colindante, generando un total de 60 muestras de suelo.
- para evitar la variabilidad introducida por la litología, mayoritariamente yesos y carbonatos, y dado que la capacidad productiva de los suelos desarrollados sobre yesos es muy reducida, se seleccionó exclusivamente la zona calcárea.
- y por último, que los puntos de muestreo estuviesen situados en zonas donde se hubiesen observado discrepancias en los patrones de distribución espacial de los metales estudiados.

3.2.2 Caracterización de la zona de estudio y toma de muestras

Los materiales geológicos de la zona de estudio corresponden con materiales de la Serie del Páramo, que engloba materiales detrítico-carbonatados de origen fluvio-lacustre de edad terciaria. Al tratarse de materiales terciarios la topografía suele ser regular, localizándose a una cuota media de unos 715 m. El clima de la zona según la clasificación de Köppen-Geiger se encuentra entre las categorías Csa (Mediterráneo) y Bsk (semi-árido frío). Para la zona de Arganda del Rey (localidad aproximadamente centrada en la zona de estudio) la temperatura



Figura 4: Mapa con las posiciones de las zonas de muestreo seleccionadas para la realización de esta Tesis doctoral

media anual es $13,8^{\circ}\text{C}$, siendo julio el mes más caluroso con una media de $24,2^{\circ}\text{C}$ y enero el mes más frío con 5°C ; las precipitaciones medias se encuentran en torno a los 440 mm/año siendo julio el mes más seco con 10 mm y noviembre el más lluvioso con 58 mm (Climate-data, 2019). Las especies vegetales naturales predominantes son la *Stipa tenacissima*, *Quercus ilex*, *Quercus coccifera* y *Thymus vulgaris*. Los suelos predominantes de la zona han sido caracterizados como Luvisoles cálcicos (LVk), Calcisoles háplico (Clh) y Regosoles calcáricos (RGc) (Comunidad de Madrid y CSIC, 1990), coincidentes con el actual sistema de nomenclatura FAO (IUSS Working Group WRB, 2015).

Cada una de las 60 muestras, divididas en los tres usos, se formó a partir de una muestra compuesta generada en campo por cinco submuestras recogidas en el centro y en los extremos de una cruz griega orientada según las direcciones cardinales y con 5 m de brazo. En campo cada muestra compuesta se dividió en dos submuestras: una refrigerada para llevar a cabo las determinaciones de actividades enzimáticas, perfil catabólico a nivel comunidad y ADN y otra para el resto de determinaciones. En laboratorio, la submuestra refrigerada se tamizó inmediatamente a $<2\text{ mm}$, manteniéndose después refrigerada en nevera hasta los correspondientes análisis y la submuestra no refrigerada se secó al aire y se tamizó a $<5\text{ mm}$ para el test de reproducción y bioacumulación de *Eisenia fetida* y a $<2\text{ mm}$ para el resto de determinaciones.

3.3. Métodos analíticos

3.3.1 Parámetros físico-químicos del suelo

A partir de muestras de suelo secadas al aire y tamizadas a <2 mm se realizaron las determinaciones de los parámetros físico-químicos del suelo. Siguiendo la metodología de ISRIC (2002) se llevaron a cabo las determinaciones físico-químicas. El pH se determinó en una suspensión suelo:agua 1:2,5 (p:v) medido con un pH-metro "Hanna EDGE"; la conductividad eléctrica (CE) en una suspensión suelo:agua 1:5 (p:v) medida con un conductímetro "micro CM 2200 (CRISON)". Las sales solubles fueron extraídas a partir de una suspensión suelo:agua 1:5 (p:v); la concentración de cloruros (Cl^-), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), fosfatos (PO_4^{3-}) y sulfatos (SO_4^{2-}) se determinó mediante un cromatógrafo iónico "Metrohm 761 COMPACT IC" con carrusel automático "Metrohm 838 ADVANCED SAMPLE PROCESSOR". El contenido en carbono orgánico total (COT) se determinó mediante el método de oxidación húmeda de Walkley y Black (1934) empleando un valorador automático "Metrohm 888 TRITANDO" y "Metrohm 665 DOSIMAT". El nitrógeno total (NT) se determinó por combustión con un analizador "LECO CHNS-932". El carbono soluble en agua fría (CSf) y el soluble en agua caliente (CSc), así como el nitrógeno soluble en agua fría (NSf) y el soluble en agua caliente (NSc) fueron extraídos según el método de Ghani *et al.* (2003) y cuantificados mediante un analizador TC/TN "ANALYTIKJENA MICRO N/C". Para determinar la capacidad de intercambio catiónico (CIC) se realizó un desplazamiento con una solución de NaCl midiendo el ión Na que ocupaba las posiciones de cambio mediante espectroscopía de emisión de llama, utilizando un Sherwood 410; la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} , se cuantificó por espectroscopía de absorción atómica (AAS) (Analytikjena NovAA 300) y, por espectroscopía de emisión de llama, utilizando un Sherwood 410, la concentración de Na^+ y K^+ . El análisis granulométrico se llevó a cabo previa oxidación de la materia orgánica con peróxido de hidrógeno, la dispersión de las muestras se realizó con hexametáfosfato de sodio y agitación durante 6 h; la fracción arena se separó por tamizado, las fracciones limo y arcilla se determinaron utilizando el método de la pipeta de Robinson. El contenido de óxidos de Fe y Mn amorfos (FeA y MnA) y cristalinos (FeX y MnX) se obtuvo mediante extracción ácida de oxalato amónico en oxalato y ditionito-citrato y posterior cuantificación mediante espectroscopía de absorción atómica (AAS) (Analytikjena NovAA 300). El fósforo asimilable (Pas) fue determinado mediante el método de Olsen y Sommers (1982) y el contenido en amonio soluble (NH_4^+) se extrajo según Keeney y

Nelson (1982); en ambos casos los iones se cuantificaron mediante espectrofotometría UV-Visible con lector para placas multipocillo "TECAN NANOQUANT INFINITE M200 PRO". El contenido en carbonato cálcico equivalente (CaCO_3) se llevó a cabo mediante el método de neutralización ácida.

Se siguió el procedimiento de la Soil Survey Staff (2014) para la determinación de la humedad a capacidad de campo (WHC) y densidad aparente (ρ) empleando una muestra inalterada de suelo tomada con cilindro de 100 mL y muestreador tipo Eijkelkamp. *4.3.2. Determinación de concentraciones totales, potencialmente disponibles e inmediatamente disponibles de elementos traza*

Todas las suspensiones y disoluciones se prepararon con agua purificada Milli-Q ($>18 \text{ M}\Omega\text{cm}$) y con reactivos de alta pureza de Merck (Alemania) y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). El material de vidrio empleado fue lavado con una solución acuosa de HNO_3 0,1% durante 24 h y se aclaró con agua desionizada tipo I (Sistema de Purificación de Agua, Younglin, Aqua MAX-Basic serie 360). Todas las muestras fueron extraídas y analizadas por duplicado.

3.3.2 Fracciones extraídas de elementos traza

Para determinar el contenido pseudo-total, a partir de ahora denominado contenido total se sometió a las muestras a un ataque con *aqua regia* y posterior digestión con microondas.

La determinación de las fracciones extraíbles de un *pool* de dieciséis elementos traza (As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Sb, Sn, V y Zn) se realizó mediante extracciones simples en un paso empleando compuestos químicos de distinta fuerza extractiva en muestras de tierra fina. Se han utilizado diferentes soluciones de extracción para evaluar las fracciones de metales móviles y potencialmente móviles, proporcionando información útil para evaluar la disponibilidad relativa del *pool* de elementos traza indicado.

La fracción potencialmente móvil se extrajo con una solución constituida por ácido dietileno-triamino-pentaacético (DTPA, 0,5 mM), trietanolamida (TEA, 0,1 M) y CaCl_2 (0,1 M), en una proporción tierra fina: solución extractante 2:1 (p/v) (Lindsay y Norwell, 1978); este procedimiento mantiene la presencia de Ca^{2+} libre impidiendo la disolución de los carbonatos. La fracción inmediatamente disponible se extrajo con una solución de CaCl_2 (0,1 M) en una proporción tierra fina: solución extractante 5:1 (p/v) (Van Erp *et al.*, 1998). En todos los casos,

las suspensiones se agitaron durante 2 horas en un agitador vibrador (Vibromatic, Selecta) a 400 oscilaciones por minuto y, posteriormente, se centrifugó el sobrenadante (3.500 rpm, 15 min) y se filtró (filtros de bajo contenido de cenizas, 5-7 μm).

Las concentraciones de los elementos traza en los distintos extractos (DTPA, CaCl_2 y total) fueron cuantificadas mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) por los laboratorios certificados de análisis de Eurofins (protocolo NEN-EN-ISO 17294-2, Eurofins Analytic, Países Bajos). Estas pruebas están acreditadas por el Consejo de Acreditación de los Países Bajos (RvA). Las medidas de control de calidad y control de calidad (QA / QC) realizadas por Eurofins Analytical incluyeron muestras, muestras de control de laboratorio (muestras de referencia estándar), controles del dispositivo (calibración, sensibilidad, interferencia), estándares internos, etc. (método de suelo TerrAttesT[®]).

3.3.3 Actividades enzimáticas

Los ciclos de los principales nutrientes en el suelo dependen de reacciones bioquímicas, químicas y/o físico-químicas catalizadas en su mayoría por enzimas (Tabatabai, 1982). Las enzimas que se encuentran en el suelo reciben el nombre de exoenzimas mientras que las que se encuentran en el interior de los microorganismos reciben el nombre de endoenzimas, cuando un microorganismo u organismo superior muere se liberan al medio las endoenzimas que tuviese (Kiss *et al.*, 1975). El periodo de vida útil de una exoenzima es reducido siempre y cuando no se encuentre adsorbida a arcillas, moléculas orgánicas (Burns, 1982) u óxidos de Fe (Turner *et al.*, 2014).

El estudio de distintas actividades enzimáticas ha demostrado la capacidad que tienen estos parámetros bioquímicos como indicadores del estado del suelo (Dick, 1997). Han demostrado su utilidad como indicadores de afección del suelo por presencia de metales pesados (Burges *et al.*, 2015; De Santiago-Martín *et al.*, 2013a; Dick, 1997; Gianfreda *et al.*, 2005; Martín Calvarro *et al.*, 2014) demostrándose que son sensibles a las fracciones más móviles de dichos metales (Chaudhuri *et al.*, 2003). Así mismo son capaces de mostrar diferencias propiciadas por el empleo de fertilizantes (Dick, 1997; Floch *et al.*, 2009) o por perturbaciones físicas causadas en el laboreo agrícola (Dick, 1997; Kandeler *et al.*, 1999; Montgomery *et al.*, 2000). Por estas razones pensamos que las actividades enzimáticas resultan claves como indicadores

de la funcionalidad de los suelos de estudio con el objetivo de conocer si esta funcionalidad se encuentra comprometida.

Para la determinación de las actividades enzimáticas se empleó suelo refrigerado en nevera y tamizado a <2 mm. Se determinaron un total de once actividades enzimáticas partícipes de los principales ciclos biogeoquímicos de nutrientes en los suelos: i) relacionadas con el ciclo del C: alfa-glucosidasa (*aglu*), beta-galactosidasa (*bgal*), beta-glucosidasa (*bglu*), fenoloxidasas (*phe*), ii) relacionadas con el ciclo del N: arilamidasa (*aryln*), N-acetil-glucosaminidasa (*nag*) y ureasa (*ure*), iii) relacionadas con el ciclo del P: fosfatasa (*phos*), fosfatasa ácida (*pac*) y fosfatasa alcalina (*pak*), iv) relacionada con el ciclo del S: arilsulfatasa (*aryls*) y la actividad enzimática deshidrogenasa (*dh*) como indicadora de microorganismos vivos. Para las actividades de *aglu*, *bgal*, *bglu*, *aryln*, *nag*, *ure*, *phos*, *pac*, *pak*, *aryls* se siguió la norma ISO 20130 (ISO, 2018). La actividad *phe* se determinó según de DeForest (2009) y según Schaefer (1963) para la actividad *dh*.

3.3.4 Perfil catabólico a nivel comunidad (CLPP) con Biolog EcoPlate

Las placas Biolog fueron introducidas por primera vez por Garland y Mills (1991) con el fin de comparar la estructura de las comunidades microbianas de distintos medios naturales. Posteriormente Zak *et al.* (1994) demostraron que las placas Biolog podían emplearse para cuantificar la diversidad funcional microbiológica de comunidades bacterianas. Inicialmente las placas Biolog existentes consistían en placas multipocillo con 95 substratos de C distintos y un pocillo de control sin ningún substrato, cada pocillo llevaba un tinte violeta de tetrazolio para detectar el NADH formado durante el consumo del substrato (Garland y Mills, 1991). Todos los reactivos se encuentran secos en la placa con lo que al entrar en contacto con la suspensión portadora de la población microbiana a analizar se rehumectan. La variedad de placas aumentó existiendo una placa para identificar microorganismos Gram positivos (placa GP), otra para Gram negativos (GN), sin embargo, ciertos autores demostraron la escasa importancia de ciertos substratos en la identificación de comunidades microbianas. Por tanto, se podía reducir la cantidad de substratos presentes en la placa sin perder capacidad de diferenciación, reduciéndolos a los ecológicamente significativos (Campbell *et al.*, 1997; Preston-Mafham *et al.*, 2002). Así se comercializó la placa Biolog EcoPlate en la que aparecen 31 substratos distintos de C y un pocillo en blanco, todos con el tinte de tetrazolio y por

triplicado en una misma placa de 96 pocillos. Estos 31 sustratos pueden agruparse según el tipo de carbono funcional en: carbohidratos (CH), ácidos carboxílicos (AcC), aminoácidos (aas), aminas/amidas (AmAm) y polímeros (pol). En la Tabla 2 aparecen los distintos sustratos presentes en las placas Biolog EcoPlate que conforman cada grupo.

Tabla 2: Sustratos de carbono presentes en las placas Biolog EcoPlate y grupo funcional al que pertenecen.

Grupos de los sustratos de carbono de las placas Biolog EcoPlate	
Carbohidratos (CH)	Aminoácidos (aas)
B1 Ácido ester metil pirúvico	A4 L-Arginina
G1 D-Celobiosa	B4 L-Asparagina
H1 α -D-Lactosa	C4 L-Fenilalanina
A2 β -metil-D-Glucósido	D4 L-Serina
B2 D-Xilosa	E4 L-Treonina
C2 i-Eritritol	F4 Ácido glicil-L-glutámico
D2 D-Manitol	
E2 N-Acetil-D-glucosamina	Aminas/Amidas (AmAm)
G2 Glucosa-1-fosfato	G4 Feniletilamina
H2 D,L- α -glicerol fosfato	H4 Putrescina
Ácidos carboxílicos (AcC)	Polímeros (pol)
F2 Ácido D-glucosamínico	C1 Tween 40
A3 Ácido D-galactónico, gamma-lactona	D1 Tween 80
B3 Ácido D-galacturónico	E1 α -Ciclodextrina
C3 Ácido 2-hidroxi-benzoico	F1 Glucógeno
D3 Ácido 4-hidroxi-benzoico	
E3 Ácido γ -amino-butírico	
F3 Ácido itacónico	
G3 Ácido α -keto-butírico	
H3 Ácido D-málico	

Esta técnica biológica permite una rápida y económica identificación de características funcionales de la población microbiana (Konopka *et al.*, 1998), sin embargo, muestra ciertos inconvenientes. Preston-Mafham *et al.* (2002) publicaron una revisión con los principales problemas y posibles soluciones del empleo de Biolog. Los principales problemas están asociados a: i) el mantenimiento de la misma densidad microbiana del inóculo en cada placa para permitir una comparación entre muestras, puesto que la densidad de inóculo influye en el color desarrollado por cada sustrato y en el tiempo que tarda en empezar a colorearse, ii) no es un método representativo de toda la comunidad microbiana puesto que pueden existir miembros de esas comunidades incapaces de emplear los sustratos de los micropocillos o

pueden no desarrollarse en esas condiciones, iii) los microorganismos r-estrategas, es decir los que están acostumbrados a desarrollarse rápidamente en entornos ricos en nutrientes, se benefician del propio método. Sin embargo, el empleo de las distintas placas Biolog ha demostrado su capacidad de discriminación de comunidades microbianas afectadas por: metales pesados (Kuzniar *et al.*, 2018; Martín Calvarro *et al.*, 2014), el efecto conjunto de metales pesados y compuestos orgánicos (Klimek *et al.*, 2016), distintos usos agrícolas (Cheng *et al.*, 2017; Xue *et al.*, 2008), distinto grado de labranza (Janusauskaite *et al.*, 2013), distintos medios naturales (Garland y Mills, 1991) y por distintos grados de maduración en compost (Insam *et al.*, 1996) entre otras casuísticas.

En la realización de esta Tesis se ha optado por emplear las placas Biolog EcoPlate por su facilidad de uso, por no necesitar varias placas para la obtención de réplicas (cada muestra sólo necesita una placa) y por la información que proporciona acerca del funcionamiento de las comunidades microbianas presentes en los suelos. No obstante, a lo largo de tanto la inoculación y lectura de las placas como del posterior tratamiento de datos e interpretación, se han tenido en cuenta las limitaciones que presenta este método.

La metodología que se ha empleado en el análisis de la respuesta de las placas Biolog EcoPlate se ha dividido en dos fases (Figura 5): i) inoculación de las placas y su medida y ii) tratamiento de los datos.

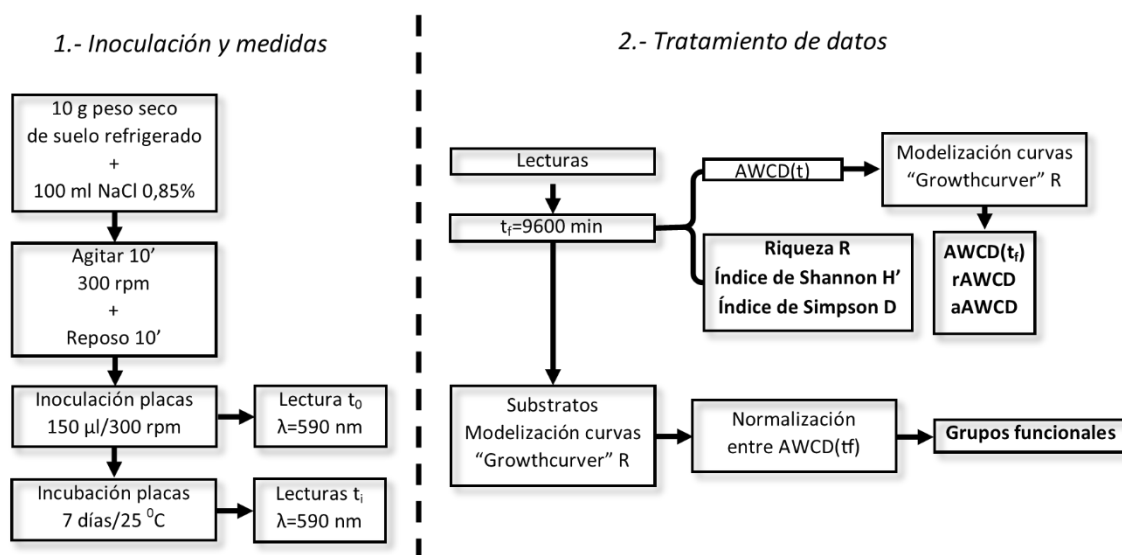


Figura 5: Esquema de la metodología empleada para la inoculación y medición de las placas Biolog EcoPlate y el tratamiento de los datos obtenidos en estas medidas.

1) Inoculación de las placas y su medida

Como se indica en la Figura 5, inicialmente a partir de las muestras de suelo refrigerado se pesó el equivalente a 10 g de suelo seco de cada muestra, al que se añadieron 100 mL de NaCl 0,85%. Cada muestra se agitó durante 10 minutos a 300 rpm y posteriormente se mantuvo en reposo 10 minutos, tras lo cual se trasvasaron 30 mL del sobrenadante a vasos de precipitados y bajo agitación continua a 300 rpm se trasvasó una alícuota de 150 μ L a cada pocillo de la placa, homogeneizando el contenido. Cuando una placa se completaba se realizaba la primera medida a tiempo inicial (t_0) de absorbancia en un espectrofotómetro TECAN NANOQUANT INFINITE M200 PRO a una longitud de onda de 590 nm. Después, las placas se incubaron durante 7 días a 25 °C realizándose medidas periódicamente a distintos tiempos (t_i) con la misma longitud de onda que en la medida inicial.

2) Tratamiento de los datos

Puesto que resultó técnicamente imposible realizar la última medida de todas las placas en el mismo tiempo, se procedió a elegir un tiempo final (t_f) de 9.600 min (6,67 días) como punto común a todas las placas. A partir de las medidas de cada placa para los distintos t_i , se procedió a calcular el color medio de pozo (AWCD, *average well color development*) para cada placa, obteniendo una medida del AWCD en función del tiempo t :

$$AWCD(t) = \frac{\sum_{i=1}^{31} M_i(t) - B(t)}{31}$$

Donde $M_i(t)$ es el valor de absorbancia del substrato i para el tiempo de lectura t y $B(t)$ el valor del blanco de la placa para el tiempo t , y 31 es el número de substratos en la placa. Las representaciones gráficas del AWCD(t) y de las medidas de $M_i(t)$ presentan la morfología de una curva de crecimiento según la ecuación:

$$M_i(t) = \frac{M_0 k}{M_0 + (k - M_0) e^{-rt}}$$

Dónde M_0 es el valor de absorbancia en t_0 del substrato M , k es la denominada capacidad de carga que coincide con el valor asintótico que toma la curva en la fase estacionaria de crecimiento microbiano y r es el ratio de crecimiento de la curva (valor de la tangente de dicha curva). La curva para AWCD(t) tiene la misma expresión sustituyendo los términos correspondientes. Los parámetros de la curva k y r tiene la virtud de no depender de la

densidad de inóculo empleada (Lindstrom *et al.*, 1998). Empleando el paquete "Growthcurver" del programa estadístico R se procedió a modelizar la curva de AWCD(t) para obtener una serie de parámetros empleados posteriormente en el análisis estadístico: valor asintótico k (kAWCD), el ratio de

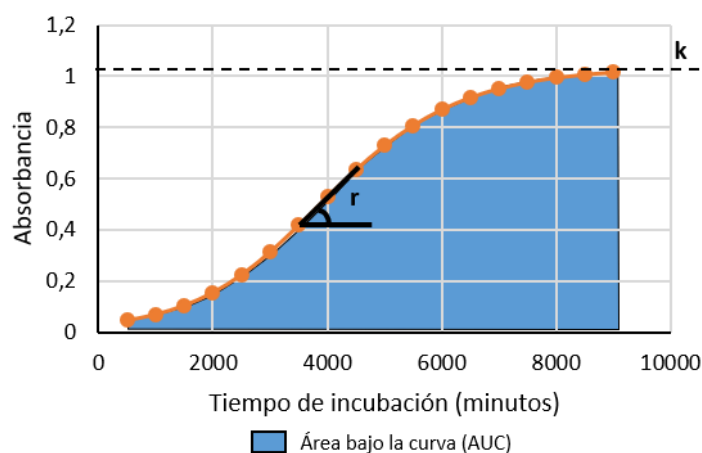


Figura 6: Esquema de una curva de crecimiento obtenida a través de múltiples medidas a lo largo del tiempo de incubación, y los principales parámetros obtenidos en su modelización a través del paquete "Growthcurver" de R.

crecimiento de la curva de AWCD (rAWCD) y el área debajo de la curva (AUC) de la curva de AWCD (aAWCD) como parámetro resumen de la información de la curva (Hackett y Griffiths, 1997). La representación gráfica de estos parámetros se encuentra en la Figura 6 para facilitar su comprensión.

Como medidas de diversidad, a partir de los valores de absorbancia de t_f se obtuvo el valor de la riqueza (R) calculado como la cantidad de pocillos con un valor de absorbancia igual o superior a 0,25 y se calcularon para cada suelo los índices de biodiversidad de Shannon (H') y de Simpson (D), según las ecuaciones:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i \quad D = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

Dónde p_i es el ratio de la absorbancia del sustrato i de la placa respecto a la suma de absorbancias de todos los pocillos de la placa. Cuanto mayor es el valor de H' la biodiversidad funcional es mayor y, similarmente, cuanto menor es D mayor diversidad de sustratos es capaz de emplear la comunidad microbiana. Con el fin de trabajar con un valor de absorbancia en t_f más robusto por parte de los sustratos se procedió, al igual que en el caso del AWCD(t), a modelizar las curvas de cada uno de los sustratos para cada una de las placas, el valor de k obtenido en la modelización fue tomado como el valor de la absorbancia a t_f . En los casos en los que las curvas de crecimiento no llegaron a la fase estacionaria se obtuvieron valores anormalmente altos de k procediendo a extraerlos del estudio posterior. Para evitar cualquier influencia de la densidad de inóculo se procedió a la normalización de los valores obtenidos

de k para cada sustrato por el correspondiente AWCD de la placa (Garland y Mills, 1991; Preston-Mafham *et al.*, 2002). Con el fin de facilitar el estudio y la interpretación de los resultados se agruparon los sustratos en función de los grupos funcionales tal y como aparecen en la Tabla 2, empleando los porcentajes que representaba cada grupo funcional respecto del total en el resto de los análisis.

3.3.5 Determinación de contenido de ADN de bacterias, hongos y arqueas

Las bacterias, hongos y arqueas desempeñan un papel fundamental en el suelo. Como se ha indicado antes, participan en los principales ciclos biogeoquímicos y participan activamente en la descomposición de la materia orgánica. Además, entre otras sustancias orgánicas producen polisacáridos que *aglutinan* partículas minerales generando agregados en el suelo o a través de sus propias estructuras, como en el caso de los hongos (Beare *et al.*, 1997; Rashid *et al.*, 2016). En los últimos años, debido al auge de las técnicas metagenómicas, se ha estudiado la interacción positiva de algunas bacterias, hongos y arqueas con algunas plantas, ejerciendo de protección contra agentes patógenos externos (Berg *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2019) o intercambiando nutrientes (Antonella Di Benedetto *et al.*, 2017; Richardson *et al.*, 2009). En los suelos agrícolas con un manejo tradicional se produce la alteración de estas poblaciones de microorganismos al incidir en: su distribución espacial, las condiciones de la atmósfera del suelo, el equilibrio de nutrientes y la diversidad vegetal, lo que afecta al balance y funcionamiento de bacterias, hongos y arqueas (Strickland y Rousk, 2010). Así mismo, estos microorganismos han sido identificados como indicadores de contaminación (De Santiago-Martín *et al.*, 2013a; Li *et al.*, 2017), si bien es cierto que cuando se trata de episodios de contaminación a largo plazo las comunidades microbianas tienden a regularse adaptándose a las nuevas condiciones o seleccionando poblaciones capaces de sobrevivir en el nuevo entorno (Li *et al.*, 2017; Wakelin *et al.*, 2014), pudiendo enmascararse los efectos de los contaminantes (Hagmann *et al.*, 2015; Kouchou *et al.*, 2017).

En la actualidad, debido a la relativa facilidad de las técnicas de extracción de ADN en muestras naturales, es posible cuantificar la cantidad de ADN procedente de distintos tipos de microorganismos en el suelo. A pesar de la gran potencia como bioindicador de este parámetro, es necesario tener en cuenta, en la interpretación, que existen una serie de indeterminaciones en el propio método analítico: i) la cantidad de ADN depende de la

extracción llevada a cabo siendo necesario un mantenimiento del método de extracción durante toda la investigación, ii) las cadenas de ADN pueden permanecer en el suelo como material biológico adsorbido a otros compuestos, lo que no implica que su procedencia sea única y exclusiva de microorganismos vivos en el momento de realizar el análisis (Strickland y Rousk, 2010) y iii) puesto que se trabaja con concentraciones de ADN muy pequeñas (ng/mL) se hace necesario un control exhaustivo para evitar contaminaciones en el análisis.

El ADN total se extrajo de 0,3 g de suelo empleando el kit de aislamiento de ADN PowerSoil (MOBIO laboratories Inc., Carlsbad, CA, EE. UU.) según su propio protocolo. Se empleó PCR cuantitativa (qPCR) para cuantificar la abundancia de genes relacionados con bacterias, hongos y arqueas. Los primers empleados y las condiciones de los ciclos de la qPCR se resumen en la Tabla 3. La qPCR se llevó a cabo en ABI Real-Time 7300 system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) con un marcador SYBR Green detection (KAPA SYBR Fast Master qPCR Kit Master Mix 2X Universal). De cada 20 µL empleados en la qPCR: 10 µL correspondían al SYBR Green; 0,4 µL a los primers correspondientes con una concentración de 10 µM; 0,4 µL a Rox High; 2 µL a las muestras de ADN (<20 ng) y 8,8 µL a agua. Las curvas patrón empleadas se generaron utilizando diluciones de plásmidos clonados linealizados. Las plantillas amplificadas con cada par de primers descritos en la Tabla 3 se clonaron en P-GEM T-easy (Promega, EE. UU.), las inserciones se secuenciaron para confirmar la longitud y la identidad correctas.

Tabla 3: Genes, primers y condiciones de ciclo empleados en las qPCR para determinar la cantidad de copias de ADN de Bacteria, Hongo y Arquea

Reino	Grupo de genes	Primer (secuencias 5'–3')	Condiciones de ciclo qPCR	Referencia
Bacteria	16S	Forward TCCTCCGTCTATTGATATGC Reverse ATTCCGCGGCTGGCA	10' 95 °C/ 40 ciclos de 15" 95 °C, 30" 60 °C y 30" 72 °C	López-Gutiérrez <i>et al.</i> (2004)
Hongo	ITS	Forward (ITS5) GGAAGTAAACTCCGTAACAAGG Reverse (ITS4) TCCTCCGTCTATTGATATGC	10' 95 °C/ 35 ciclos de 15" 95°C, 30" 52°C, 2" 72°C y 7' 72 °C	Schoch <i>et al.</i> (2012)
Arqueas	16S rDNA	Forward (Arc 771F) ACGGTGAGGGATGAAAGCT Reverse (Arc 957R) CGGCGTTGACTCCAATTG	10' 95 °C/ 40 ciclos de 15' 95 °C, 30" 55 °C, 30 " 72 °C y 30" 80 °C	Ochsenreiter <i>et al.</i> (2003)

3.3.6 Ensayos ecotoxicológicos

3.3.6.1 Ensayo de reproducción y bioacumulación con *Eisenia fetida*

Las lombrices ejercen un papel fundamental en el funcionamiento del suelo (Bohlen, 2017): i) participan en la mineralización de la materia orgánica ejerciendo un rol dual al aumentarla, pero también protegiendo a la materia orgánica al formar agregados órgano-minerales en sus deyecciones, ii) influyen en la distribución de nutrientes en el perfil del suelo, en la aireación y en la infiltración de agua al excavar sus túneles y iii) pueden acumular contaminantes como metales pesados pudiendo iniciar su entrada en la red trófica. Por esta última razón se hace necesario conocer si es posible la acumulación en estos animales de los elementos traza presentes en los suelos estudiados en esta Tesis doctoral, si dicha acumulación depende de la disponibilidad de los elementos traza y si las concentraciones de estos elementos traza ejercen algún efecto negativo sobre su reproducción. Con estos objetivos se llevó a cabo un test de reproducción con lombriz roja de California (*Eisenia fetida*) (Figura 7) por ser un organismo diana mundialmente utilizado, aunque no sea endémico de la zona de estudio. Así mismo, se estudió la bioacumulación en sus tejidos de los elementos traza analizados en el suelo y su relación con la disponibilidad de los mismos, y la posible pérdida de biomasa que pudiesen experimentar los animales durante el ensayo.



Figura 7: Ejemplar de *Eisenia fetida* con el clitelium desarrollado, indicando que es un individuo adulto.

Las lombrices empleadas en el test de reproducción, biomasa y bioacumulación provinieron de las cámaras de cría que se han desarrollado en la Unidad Docente de Edafología durante la realización de esta Tesis doctoral.

Las condiciones de cría fueron las detalladas en la norma OCDE 222 (partiendo inicialmente de una caja de cría de un proveedor local:

- Cajas de cría transparentes de 40 litros de volumen.
- Suelo artificial compuesto de:

- 10% turba de *sphagnum*.
- 20% caolín.
- 69 – 70% de arena de cuarzo, de la que un porcentaje superior al 50% presenta una granulometría entre 50 y 200 micras.
- Entre 0,3 – 1% de CaCO₃ pulverizado para obtener un pH inicial de 6,0 ± 0,5.
- pH regulado entre 6,0 - 7,0 durante todo el periodo de cría y controlado, mínimo, una vez a la semana.
- Temperatura 20 °C ± 2 °C.
- Humedad entre 50 – 60%.
- Iluminación en ciclos de 16 horas de luz con una intensidad entre 400 y 800 lux y ciclos de 8 horas de oscuridad.
- Alimentación a base de avena una vez por semana, regulando las cantidades añadidas en función de la presencia de restos de la semana anterior, se incluyeron también restos vegetales triturados y secados en estufa, para su almacenamiento, que fueron humectados al añadirse a las cajas de cría.

Para la realización del test (esquemático en la Figura 8) se emplearon, por triplicado, recipientes de vidrio en los que se introdujeron 500 g de cada suelo y se humectaron entre un 50 - 60% de su humedad a capacidad de campo. En cada recipiente se añadieron 10 lombrices adultas con pesos comprendidos 0,316 y 0,911 g, tomadas aleatoriamente del total de adultas. Las condiciones de luz y temperatura durante la realización del test fueron las mismas que durante la cría.

Al día siguiente de introducir las lombrices en los suelos, se añadieron 5 g de avena en la superficie del suelo y, posteriormente, una vez a la semana durante las cuatro iniciales del test, se añadieron 5 g de avena apartando los restos de comida de la semana anterior. Finalizadas las cuatro semanas iniciales se procedió a la separación, conteo y pesado de las lombrices adultas tras su lavado con agua destilada. Después, los suelos volvieron a ser introducidos en sus correspondientes recipientes de vidrio para continuar el test de reproducción y contabilizar los juveniles y huevos generados por los individuos adultos durante las cuatro semanas iniciales.

Las lombrices adultas fueron introducidas en envases de plástico con papel de filtro humedecido durante 24 h, con las mismas condiciones de temperatura y de luz que durante la cría y el test, para que depurasen los restos de suelo de su sistema digestivo. Posteriormente se lavaron, pesaron y congelaron para su posterior procesamiento. Éste consistió en el secado de las lombrices a 105 °C durante 24 h, su posterior pulverización y análisis de los elementos traza presentes en sus tejidos a través del mismo laboratorio que realizó las determinaciones en los suelos.

Para determinar la cantidad de juveniles y huevos de lombrices generados durante las cuatro semanas iniciales del test, en las cuatro semanas posteriores únicamente se proporcionó alimento después de reintroducir los suelos en los recipientes, manteniéndose las condiciones de temperatura y humedad del ensayo. Finalmente, se procedió al conteo de juveniles y huevos presentes en los suelos.

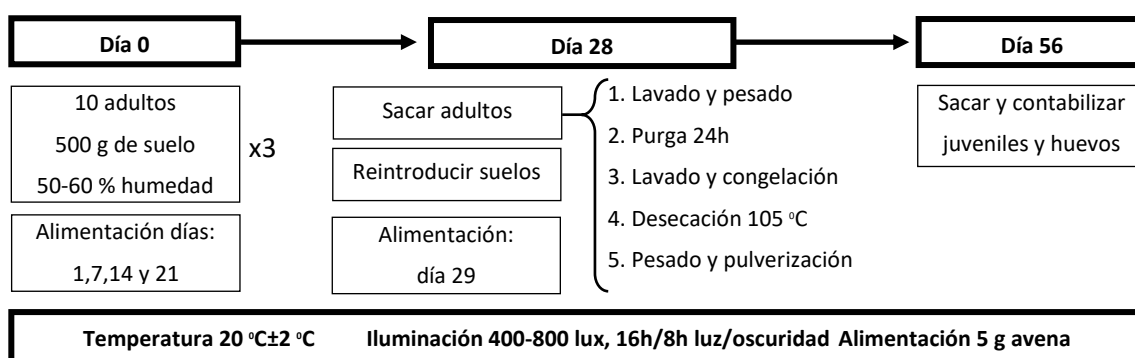


Figura 8: Esquema del test de reproducción llevado a cabo con ejemplares de *Eisenia fetida*, mostrando los pasos necesarios para llevarlo a cabo, su temporización y las condiciones bajo las que se realizó (elaboración propia).

Al final del test, se obtuvieron como parámetros de valoración: i) la variación de biomasa de la población adulta en el transcurso del test, ii) la cantidad de huevos sin eclosionar, iii) la cantidad de individuos juveniles y iv) las concentraciones de los elementos traza analizados en los tejidos de las lombrices.

3.3.6.2 Ensayo de elongación radicular con *Lactuca sativa*

Los ensayos de fitotoxicidad aguda con plantas son simples, sensibles y poco costosos de poner en funcionamiento. Los más empleados registran la germinación, elongación radicular y del hipocótilo. No obstante, la elongación radicular parece ser más sensible cuando se trata de metales pesados (Hou *et al.*, 2014; Kang y Kong, 2016) por delante de la del hipocótilo y la germinación (Kang y Kong, 2016). Entre todas las especies de plantas posibles, la lechuga (*Lactuca sativa*) es una de las especies más empleadas debido a su sensibilidad (Wang y Keturi, 1990). En la realización de esta Tesis doctoral se llevó a cabo un ensayo de fitotoxicidad crónico estudiando la germinación, la elongación radicular y la elongación de hipocótilo de semillas de *Lactuca sativa*.

Se emplearon semillas comerciales observando que la fecha de envasado fuese inferior a 6 meses para mantener su viabilidad. Antes de llevar a cabo el test se realizó un control inicial de la calidad de las semillas mediante su selección bajo lupa descartando aquellas deformes, con color distinto o con tamaños excesivamente grandes o pequeños, de forma que se consiguiese un conjunto de semillas lo más homogéneo posible.

La metodología del test (modificado de Sobrero y Ronco, 2004) consistió en incorporar en placas Petri un papel de filtro ajustado lo más perfectamente posible con el fin de evitar dobleces. Sobre este papel se dispusieron 25 semillas provenientes de la selección de forma que tuviesen la máxima separación entre ellas para no influir en el desarrollo de las semillas. Posteriormente se añadieron 4 mL de una solución suelo:agua en una relación 1:2 (p/v, 25g/50mL), se agitó durante 2 horas, se mantuvo en reposo otras 2 horas y se filtró. En los controles llevados a cabo se empleó agua destilada. Para cada muestra de suelo y controles se utilizaron cinco placas siguiendo las directrices anteriores. Tras añadir las soluciones suelo:agua, se sellaron los bordes de las placas Petri con Parafilm para mantener las condiciones de humedad durante los 5 días de incubación a 25 °C y en oscuridad. Al cabo de los cinco días, se observó si las semillas habían sufrido necrosis, crecimiento de hongos o malformaciones. En caso negativo, se congelaron a -20 °C hasta su posterior medida. A la hora de realizar las medidas se descongelaron las placas se contabilizó la cantidad de semillas germinadas y se dispusieron sobre papel milimetrado para realizar la medición de la elongación radicular y del hipocotilo.

3.4 Análisis estadístico

3.4.1 Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor

La utilidad del análisis de la varianza (ANOVA) de un factor radica en la posibilidad de identificar si las medias de dos poblaciones tienen valores estadísticamente distintos entre sí. Este análisis presenta dos supuestos que deben cumplirse: i) las poblaciones deben de seguir una distribución normal y ii) las varianzas deben de ser homogéneas.

El procedimiento para llevar a cabo el ANOVA se esquematiza en la Figura 9. Inicialmente, se extrajeron de las matrices de datos los valores que distaban del valor medio más o menos tres veces la desviación estándar, por considerarlos anómalos, y por tanto reducir su influencia en el resto de la distribución. Después, se estudió la normalidad de las variables empleado el test Kolmogorov-Smirnov (K-S test), posteriormente todas las variables no normales se logaritizaron según la expresión $x'(x)=\ln(x+1)$, siendo x el valor de la variable inicial y x' el valor logaritizado, y se estudió la normalidad de las variables logaritizadas con el test de Kolmogorov-Smirnov. Con las variables que seguían una distribución normal (tanto normal

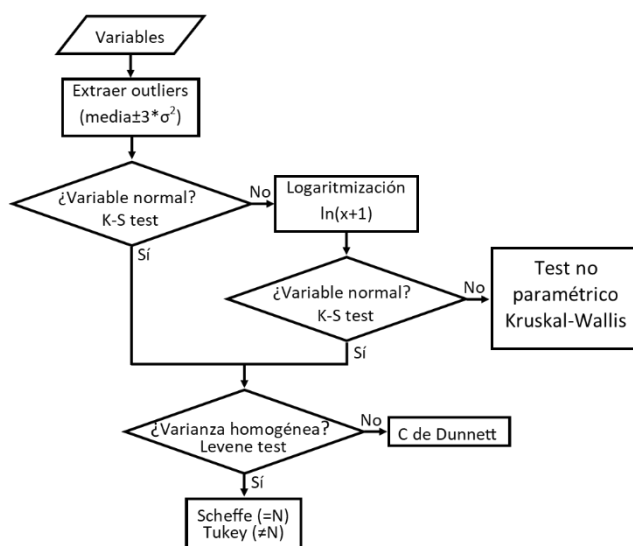


Figura 9: Esquema del análisis de la varianza (ANOVA) empleado en esta Tesis doctoral

como log-normal) se llevó a cabo la comprobación de la homogeneidad de las varianzas a través del test de Levene. Cuando las variables (normales o log-normales) mostraron varianzas homogéneas, se realizó el ANOVA empleando el post-hoc de Scheffe cuando las distintas poblaciones tenían un número de muestras (N) idéntico entre sí, o el post-hoc de Tukey cuando existían diferencias en N. Se empleó el post-hoc C de Dunnett cuando la varianza no era homogénea.

Cuando las variables no seguían una distribución normal se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para identificar diferencias significativas entre las medias de dos poblaciones.

En todos los casos se tomó $p < 0,05$. Para realizar el ANOVA se empleó el software *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.23.0*

3.4.2 Análisis de redundancia

El análisis de redundancia (RDA) permite explicar un conjunto de variables (denominado variables respuesta) a través de otro conjunto de variables (denominado variables explicativas). Debido a la imposibilidad de emplear una cantidad de variables explicativas superior al tamaño muestral (N) para cada RDA, se seleccionaron mediante criterios edafológicos las variables explicativas que podrían, *a priori*, influir más en las variables respuesta de cada RDA. Inicialmente, para llevar a cabo este análisis se normalizaron todas las variables (tanto respuestas como explicativas). Las variables explicativas fueron seleccionadas y ordenadas a través del método de selección *Forward*, de acuerdo a su importancia en la explicación de las variables respuesta de cada ordenación, y fue validado a través del test de permutación de Monte Carlo ($n=499$, p -valor $< 0,1$). Esta parte del análisis se llevó a cabo con el software Canoco 4.5.

Para evaluar gráficamente las relaciones entre las variables respuesta y explicativas, se utilizaron *biplots* en los que se muestran como vectores azules la ordenación de las variables respuesta y como vectores rojos la ordenación de las variables explicativas. Dependiendo del RDA se representaron variables explicativas que a nuestro juicio facilitaban o mejoraban la interpretación de los resultados, aunque no fuesen identificadas como significativas en el test de permutación de Monte Carlo. Estas representaciones gráficas fueron generadas por el software Canodraw.

3.4.3 Correlaciones

Las correlaciones se emplean para conocer si existen relaciones entre dos variables. Debido a la existencia de variables en este estudio que no seguían la distribución normal se empleó el coeficiente de correlación de Spearman bivariado puesto que es no paramétrico, es decir, no es necesario que la población siga una distribución normal para emplearlo. El coeficiente de Spearman toma valores en el rango $[-1,1]$, siendo -1 una correlación inversa perfecta entre las variables y 1 una correlación directa perfecta entre variables, por tanto, el signo muestra la dirección de la relación y el valor absoluto su potencia. Únicamente se tuvieron en cuenta las

correlaciones con una significación $p < 0,05$. Para este cometido se empleó el software SPSS v.23.0.

3.4.4 Análisis de redes

Este tipo de análisis surge de la necesidad de representar gráficamente las relaciones entre distintas variables. Las variables se muestran bajo la forma de puntos denominados nodos y las relaciones existentes entre las distintas variables o nodos se representan en forma de líneas, denominadas aristas, que conectan un par de nodos. A la representación gráfica de los nodos y aristas se le denomina red o grafo. Gracias a la mayor potencia de los equipos informáticos el empleo de este tipo de análisis ha proliferado en los últimos años, por su capacidad de analizar realidades complejas y con gran cantidad de variables involucradas, empleándose de forma cotidiana en estudios de diversa índole. En estudios relacionados con el suelo este análisis se ha utilizado para: estudiar la microbiología del suelo (Barberán *et al.*, 2012), relacionar la microbiología del suelo con usos (Creamer *et al.*, 2016), analizar cómo se relacionan bacterias y hongos con los parámetros del suelo (de Menezes *et al.*, 2014), obtener indicadores medioambientales (Karimi *et al.*, 2017) o analizar la dinámica de redes tróficas (Sauvadet *et al.*, 2016) entre otros usos.

La representación gráfica, o grafo de la red, facilita el reconocimiento de patrones relacionando los nodos a simple vista, pero también permite: i) estudiar cómo se relacionan los nodos entre sí, permitiendo realizar grupos que muestren un mayor grado de correlación entre ellos, ii) determinar qué nodos son importantes en la red, iii) comparar distintas redes y iv) comparar las funciones de unos mismos nodos en distintas redes. Desde el nacimiento de esta disciplina en los años 30 del siglo XX se han desarrollado distintos parámetros destinados a responder a estas cuestiones. Para facilitar su comprensión en este apartado metodológico se mostrarán, de forma separada, los parámetros empleados en la caracterización de las redes de forma global y los parámetros que caracterizan los roles que ejercen los nodos dentro de una red. Todas las redes generadas y los parámetros derivados de las redes han sido realizados con el software Gephi 0.9.2 a partir de los coeficientes de correlación significativos de las correlaciones bivariadas de Spearman, obtenidas con el software SPSS v.22.0.

3.4.4.1 Parámetros de red

A la hora de explicar los parámetros que definen una red y con el fin de facilitar su comprensión se empleará la Figura 10.

Los parámetros más simples que caracterizan a una red son muy intuitivos: si una red se conforma de nodos conectados por aristas, los primeros parámetros que definen una red son la cantidad de nodos y la cantidad de aristas. Si a la cantidad de aristas que tiene un nodo (cantidad de correlaciones que tiene una variable) se le denomina grado, se puede definir el grado medio como la cantidad de correlaciones (o grado) que muestran de promedio los nodos de la red. Al emplearse los coeficientes de correlación significativos, la importancia de cada arista en la red no es idéntica puesto que cada una se identifica con el coeficiente de correlación correspondiente, lo que le proporciona un peso distinto en la red. Por tanto, el grado medio no aporta información acerca de la calidad de esas correlaciones. Al tener en cuenta los pesos de las aristas y el grado de un nodo, se obtiene el grado medio con pesos, que se define como la media de la suma de los pesos de las aristas de los nodos de la red. En las redes de la Figura 10 todas las aristas tienen un peso igual a la unidad y por tanto el grado medio coincide con el grado medio con pesos, que es a su vez la mitad del número de aristas.









Parámetros de red	Redes ejemplo							
	"a"	"b"	"c"	"d"	"e"	"f"	"g"	"h"
								
Nodos	4	4	4	4	4	4	4	4
Aristas	6	4	3	2	1	0	5	2
Grado medio	3	2	1,5	1	0,5	0	2,5	1
Grado medio con pesos	3	2	1,5	1	0,5	0	2,5	1
Diámetro	1	2	3	2	1	0	2	1
Densidad de grafo	1	0,67	0,5	0,33	0,17	0	0,83	0,33
Componentes conexos	1	1	1	2	3	4	1	2
Longitud media de camino	1	1,33	1,67	1,33	1	0	1,17	1
Transitividad	1	0	0	0	0	0	0,83	0

Figura 10: Ejemplos de redes generadas a partir de cuatro nodos y un número variable de aristas con el fin de facilitar la comprensión del texto (modificado de Scott, 2000)

Si es posible diferenciar una red por la cantidad de aristas y nodos que presenta, es posible calcular la densidad de grafo expresado como el ratio de la cantidad de aristas existentes en la red con respecto al número máximo de aristas que unirían todos los nodos entre sí. Esto implica que la densidad de grafo se encuentra siempre entre 0 (ningún nodo está relacionado con otro) y 1 (todos los nodos están relacionados entre sí). Así en el caso de la red "a" de la Figura 10, el número máximo de aristas es 6, coincidiendo con el número de aristas que

muestra la red, por tanto su densidad de grafo es 1; sin embargo, en la red “b” el número de aristas de la red ha disminuido a 4 y teniendo en cuenta que el número máximo de aristas sigue siendo 6 resultaría $4/6 \approx 0,67$. En el resto de redes el razonamiento que lleva a la obtención de la densidad de grafo es idéntico.

Por regla general, las redes nunca son completas, lo que puede producir que cierta cantidad de nodos formen un subgrupo en la red separado del resto. Al total de estos grupos en una red se les conoce como componentes conexos puesto que muestran conexiones entre los nodos de un mismo subgrupo, pero no con los nodos de otros subgrupos de la misma red. En caso de una red con más de un componente conexo cada uno de los componentes se trata independientemente. Como puede observarse, la red “f” de la Figura 10 muestra cuatro nodos sin ninguna arista relacionándolos entre sí, estos cuatro nodos forman otros tantos componentes conexos; en la red “h” los nodos se encuentran unidos dos a dos generando que existan dos componentes conexos, mientras que en las redes “a”, “b”, “c” y “g” existe únicamente un componente conexo puesto que de una forma u otra todos los nodos se relacionan entre sí.

A la cantidad de aristas que separa un nodo cualquiera de otro nodo cualquiera en el grafo se le conoce como camino. Derivado de esta definición, otro parámetro que caracteriza una red es la longitud media de camino, es decir, la cantidad promedio de aristas que separan un nodo cualquiera de otro. Cuanto menor sea esta longitud media de camino los nodos de la red estarán más relacionados entre sí, por lo que una variación sobre un nodo podría afectar a una cantidad mayor de nodos. Si se comparan las redes “b” y “c” de la Figura 10 se puede observar que ambas son muy parecidas, a excepción de que la red “b” tiene una arista más que “c”. En ambos casos todos los nodos están relacionados, pero en el caso de la red “c” es necesario caminar por tres aristas para ir de un nodo al más alejado mientras que en la red “b” solo es necesario caminar dos aristas, por tanto, la longitud media de camino de “c” es superior a la de “b”.

Cuando en un triplete de nodos (A, B y C) el nodo A se relaciona con B, el nodo B se relaciona con C y el nodo A se relaciona con C, se dice que ese triplete es transitivo. Si esta idea se transporta a la escala de red, se podrá definir la transitividad de la red como la cantidad de tripletes existentes en la red relacionada con la cantidad de tripletes transitivos, lo que implica que la transitividad es la posibilidad de que dos nodos de la red seleccionados aleatoriamente

estén relacionados entre sí. Mayores valores de transitividad están relacionados con redes más estables, es decir existen menos nodos extremadamente importantes, y la red es más redundante: se puede llegar a un mismo nodo por distintos caminos, este aspecto es muy claro en rutas metabólicas cuando un mismo compuesto químico se puede formar a partir de distintas rutas. En la Figura 10 únicamente las redes “a” y “g” muestran triángulos transitivos. En la red “a” todos los vértices muestran todas las relaciones posibles por tanto la transitividad es 1, sin embargo, en la red “g” únicamente dos nodos muestran el total de relaciones posibles, 3 de 3 (3/3), mientras que otros dos nodos muestran 2 de 3 (2/3), calculando la media de posibilidades:

Es posible asociar los nodos en agrupaciones denominadas módulos de forma que los nodos de un mismo módulo muestran más relaciones entre sí de lo esperable únicamente por azar. La modularidad es un factor que define la calidad de las agrupaciones realizadas, muestra valores entre -1 y 1 en función de si se han generado los módulos de forma totalmente aleatoria (-1) o sin ningún grado de aleatoriedad (1). La identificación de módulos ha demostrado su utilidad identificando comunidades ecológicas (Lupatini *et al.*, 2014), grupos sociales (Girvan y Newman, 2002), en biología a la hora de identificar genes (Zhao y Liu, 2019) o en la delimitación de zonas marinas con sedimentos contaminados (Y. Wang *et al.*, 2018) entre otros.

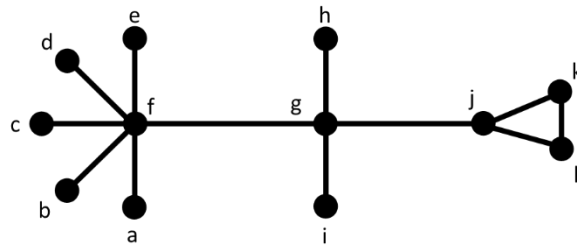
3.4.4.2 Parámetros de nodos

Al igual que existen distintos parámetros para definir las características de una red, existen diversos parámetros que explican la importancia que tiene un nodo dentro de la red. El grado o cantidad de aristas que tiene un nodo es un parámetro que define su importancia dentro de la red ya que un nodo con un grado alto está conectado a muchos otros nodos y, por tanto, será más importante. Tal y como se ha comentado, considerando la red de forma global, este parámetro no tiene en cuenta si las aristas tienen el mismo peso, por tanto, es necesario conocer el valor del grado medio con pesos de cada nodo. Sin embargo, que un nodo tenga altos sus valores de grado o de grado medio con pesos no implica que las conexiones que tenga este nodo sean de calidad, es decir que esas relaciones tengan coeficientes de correlación altos y además que esos nodos con los que está conectado tengan a su vez buenas

relaciones. Para responder a esta necesidad se emplea el parámetro centralidad de *eigenvector*, que tiene en cuenta tanto el grado del nodo al que nos estemos refiriendo como los grados de los vecinos a los que esté conectado, de esta manera se tiene en cuenta la cantidad y la calidad de las conexiones de un nodo.

Otra medida de centralidad referida a los nodos es la centralidad de intermediación (*betweenness centrality*). Este parámetro hace referencia a la cantidad de veces que un nodo actúa de puente entre otros dos nodos, es decir, la cantidad de veces que es necesario pasar por ese nodo para recorrer un camino cualquiera entre dos nodos. Dicho parámetro permite identificar los nodos por los que pasa una mayor cantidad de caminos y, por tanto, sobre los que cualquier variación podría magnificar su efecto al influir en gran parte de la red.

En la Figura 11 se muestra una red problema con el fin de facilitar la comprensión de estos parámetros. Como se puede observar hay tres nodos en la parte central de la red: “f”, “g” y “j”. Estos nodos actúan de unión entre el resto de nodos, tal y como reflejan sus valores de grado (sus valores de grado medio con pesos son los mismos que el grado puesto que no se han dado pesos distintos a las aristas), y son los únicos nodos con centralidad de intermediación distinta de cero, ya que por ellos tienen que pasar los caminos que unen a los nodos más periféricos de la red. En términos generales, tal y como recogen los valores de la centralidad de *eigenvector*, los nodos “f”, “g” y “j” son también los que tienen unas mejores conexiones dentro de la red, ejerciendo roles principales. También puede apreciarse como el algoritmo de determinación de módulos, siguiendo el funcionamiento descrito en el apartado anterior, ha generado dos módulos: el primer grupo incluye todos los nodos desde la “a” hasta la “h”, a causa de los valores superiores de *betweenness centrality* de los nodos “f” y “g” en comparación al nodo “j” que, junto con los nodos “k” y “l” forman el segundo grupo. Por último, al estar formando todos los nodos una única red el parámetro componente es nulo e idéntico para todos los nodos.



Nodo	Grado	Grado medio con pesos	Centralidad de intermediación	Módulo	Componente	Centralidad de eigenvector
a	1	1	0	0	0	0,371
b	1	1	0	0	0	0,371
c	1	1	0	0	0	0,371
d	1	1	0	0	0	0,371
e	1	1	0	0	0	0,371
f	6	6	40	0	0	1
g	4	4	37	0	0	0,830
h	1	1	0	0	0	0,310
i	1	1	0	0	0	0,310
j	3	3	18	1	0	0,597
k	2	2	0	1	0	0,370
l	2	2	0	1	0	0,370

Figura 11: Red ejemplo donde se observan los parámetros que definen los roles que ejercen cada uno de los nodos identificados con letras.

4. Resultados y Discusión

4. Resultados y Discusión

4.1. Parámetros físico-químicos de los suelos estudiados

En la Figura 1 se representan los triángulos texturales de los suelos estudiados, y en la Figura 2 se representan los boxplots correspondientes a las propiedades físico-químicas de dichos suelos.

De acuerdo con la clasificación textural de la Sociedad Internacional de la Ciencia del suelo (ISSS) son suelos de texturas medias (franco arcillosa y franco arcillo limosa) a finas (arcillosa gruesa y arcillo limosa) (Figura 12; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), sin diferencias significativas entre los usos (Figura 13). En general los suelos presentan bajos contenidos en materia orgánica, valores de pH, conductividad eléctrica (CE), así como de carbonato equivalente (CaCO_3) y Ca^{2+} de cambio acordes con su procedencia, ya que se desarrollan sobre materiales calcáreos pertenecientes a la Formación Calizas del Páramo. El uso no ha mostrado influencia en los contenidos de óxidos de Fe y Mn, ni en la mayoría de los cationes de cambio (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+), contenido en sales (CE, Cl^- , NO_3^- y SO_4^{2-}), y en CaCO_3 (Figura 13). Estas características reflejan la fuerte influencia del material original carbonatado en la química de estos suelos. La principal diferencia (Figura 13) que mostraron los suelos bajo los usos agrícolas con respecto a los forestales radica en el contenido en materia orgánica, así como en los parámetros relacionados con ella.

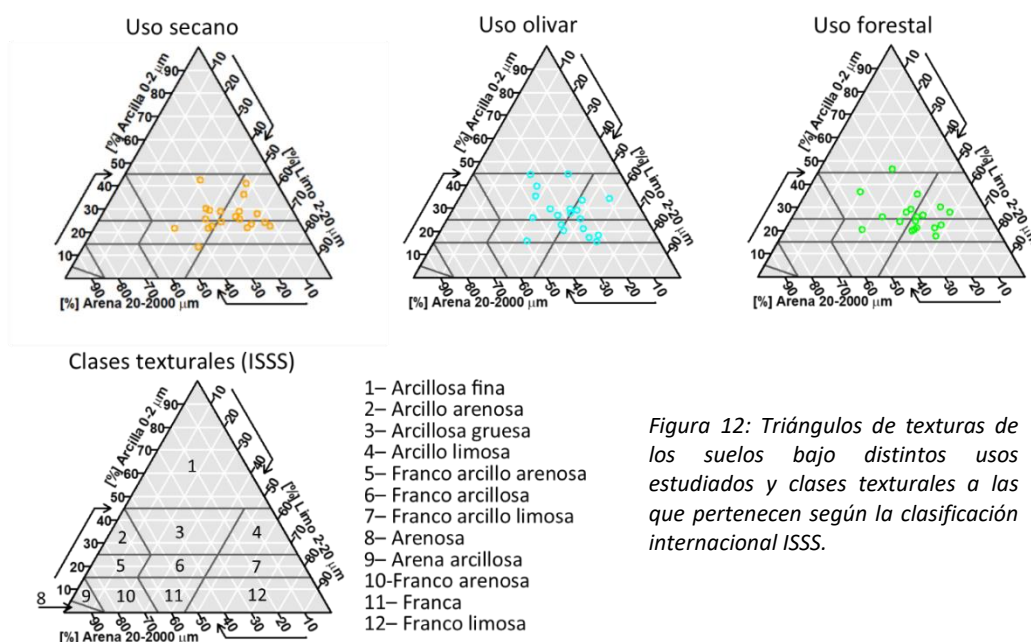
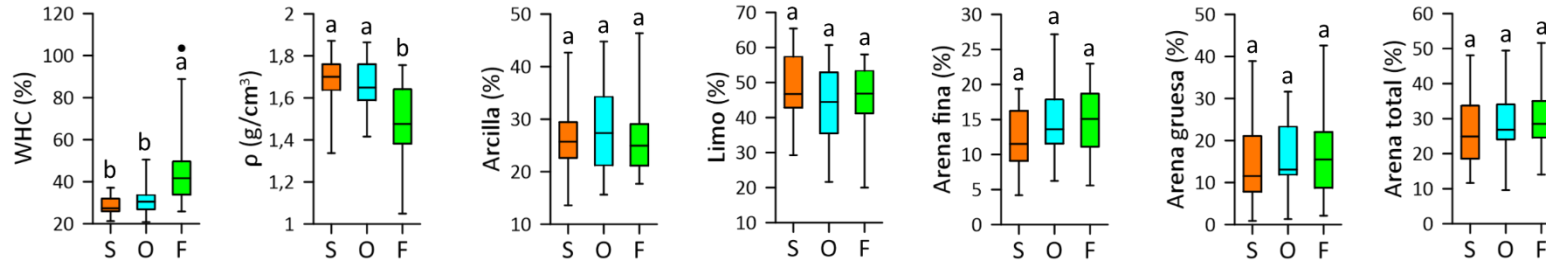
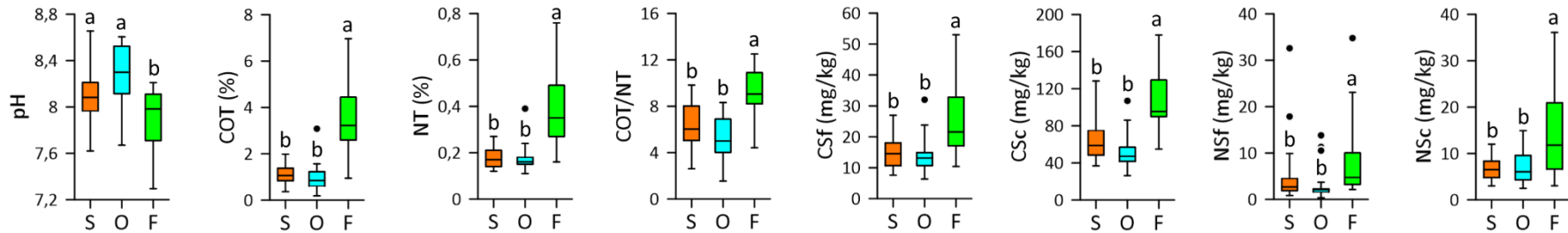


Figura 12: Triángulos de texturas de los suelos bajo distintos usos estudiados y clases texturales a las que pertenecen según la clasificación internacional ISSS.

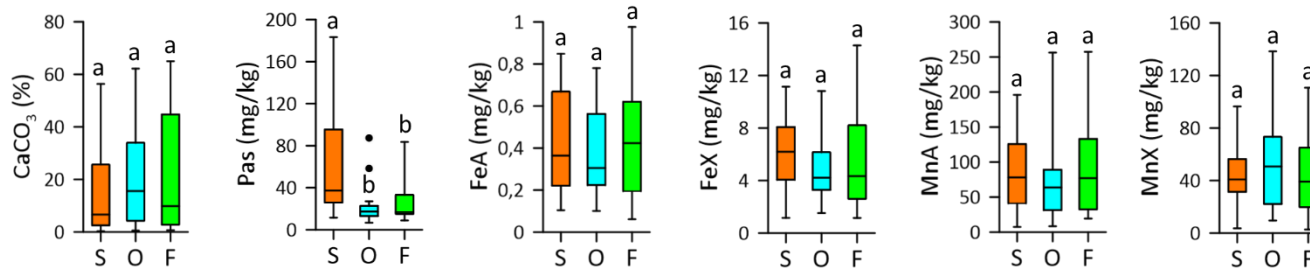
Parámetros físicos del suelo



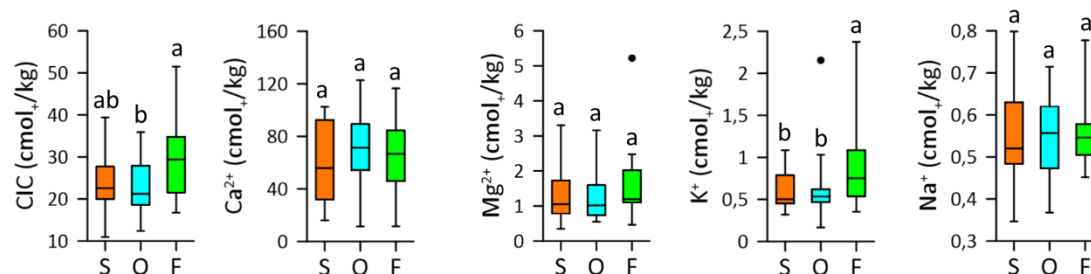
Parámetros orgánicos del suelo



Parámetros inorgánicos del suelo



Capacidad de intercambio catiónico y bases de cambio del suelo



Parámetros iónicos del suelo

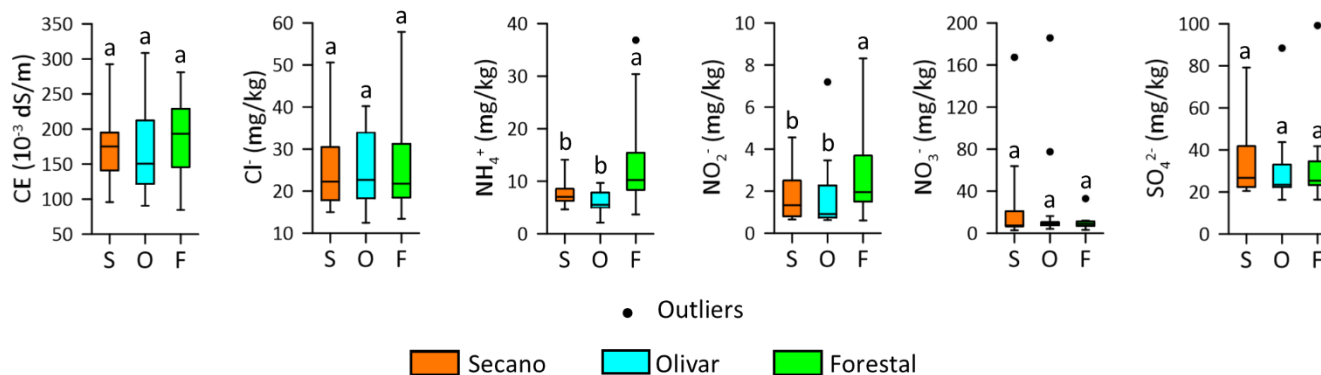


Figura 13: Boxplots de los parámetros físico-químicos de los suelos bajo uso de secano (S), olivar (O) y forestal (F) estudiados. Distintas letras indican diferencias significativas entre los usos ($P < 0,05$). Parámetros (siglas): humedad a capacidad de campo (WHC), densidad aparente (ρ), arcilla, limo, arena fina, arena gruesa, arena total, pH, carbono orgánico total (COT), nitrógeno total (NT), relación carbono nitrógeno (COT/NT), carbono soluble en frío (CSf), carbono soluble en caliente (CSc), nitrógeno soluble en frío (NSf), nitrógeno soluble en caliente (NSc), carbonato equivalente (CaCO_3), fósforo asimilable (Pas), óxidos amorfos de hierro (FeA), óxidos cristalinos de hierro (FeX), óxidos amorfos de manganeso (MnA), óxidos cristalinos de manganeso (MnX), capacidad de intercambio catiónico (CIC), bases de cambio: calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), potasio (K^+) y sodio (Na^+), conductividad eléctrica (CE), iones solubles: cloruros (Cl^-), amonio (NH_4^+), nitrato (NO_2^-), nitrato (NO^-) y sulfato (SO_4^{2-}).

El contenido en carbono orgánico (COT) y nitrógeno total (NT) de los suelos de uso forestal es superior a los de secano (un 69 %) y a los de olivar (76 %). En suelos agrícolas el labrado del suelo es recurrente, con lo que se produce un aumento de la oxidación de la materia orgánica (Brady y Weil, 2014), a causa de la mayor cantidad de oxígeno incorporado y la activación de la población bacteriana capaz de degradarla (Balesdent et al., 2000). Además, la materia orgánica se extrae del suelo en forma de cosecha y no retorna al mismo (McLauchlan, 2006). Si estas pérdidas en un suelo agrícola no se suplieran mediante el empleo de enmiendas orgánicas se produciría una disminución paulatina de la materia orgánica del suelo, reduciéndose su fertilidad y capacidad para producir cosechas (FAO y GTIS, 2015). Por el contrario, en los suelos de uso forestal se produce un reciclado de la materia orgánica existiendo un aporte continuo de ésta al suelo. Esta dinámica de la materia orgánica se pone de manifiesto en las diferencias significativas encontradas en los siguientes parámetros:

- i) La humedad a capacidad de campo (WHC) fue superior en el uso forestal, con un valor medio de 41% con respecto a los otros usos (28% y 30% para uso secano y olivar respectivamente). El mayor contenido en materia orgánica encontrado en el uso forestal promueve la formación de agregados estables que mejoran la porosidad del suelo (Huntington, 2006) disminuyendo la densidad aparente ($1,50 \text{ g/cm}^3$). Por el contrario, los suelos agrícolas de menor contenido en materia orgánica, y sujetos a compactación por el labrado generado por años de cultivo, muestran densidades aparentes mayores ($1,7 \text{ g/cm}^3$) (Osunbitan et al., 2005).
- ii) El pH en los suelos forestales (7,9) fue inferior al de los suelos de cultivo (8,1 y 8,2 para los usos secano y olivar, respectivamente) atribuido al contenido en materia orgánica, principal fuente de hidrogeniones en el suelo. Otras fuentes de hidrogeniones al medio, de forma continua, estarían asociadas a la respiración por parte de las raíces y microorganismos presentes en el suelo, incrementando la presión de CO_2 a través del equilibrio carbónico-carbonato, así como a procesos de nitrificación o exudados radiculares (Brady & Weil, 2014).
- iii) La materia orgánica soluble en agua fría (carbono soluble en agua fría, CSf y nitrógeno soluble en agua fría NSf) fue superior en el uso forestal (23,1 mg/kg para CSc y 7,5 mg/kg NSc) y menor en los usos de cultivo con valores para el uso de secano de 14,6 g/kg y 2,6 mg/kg de CSf y NSf, y con valores para el uso olivar de 13,9 y 3,3 mg/kg de

CSf y NSf. El contenido en carbono y nitrógeno soluble en agua caliente (CSc y NSc) siguió el patrón anterior con valores superiores en el uso forestal (102,9 mg/kg y 12,8 mg/kg) y menores en los suelos de cultivo (59,0 mg/kg y 6,6 mg/kg para secano y para uso olivar 48,6 mg/kg y 7,1 mg/kg). El labrado incorpora oxígeno en los suelos de cultivo acelerando la degradación de la materia orgánica (Bueno y Ladha, 2009), facilitando el acceso de microorganismos a materia orgánica previamente protegida (Beare et al., 1994) los cuales consumirán inicialmente los compuestos más lábiles (Qualls, 2005). Si a este proceso se le añade la falta de aportes orgánicos frescos se produce una disminución de la materia orgánica, tanto total como soluble. El CSf en los usos de secano y olivar muestra un descenso del 37% y del 40% con respecto al uso forestal, mientras el CSc muestra un descenso aún mayor (43% y 53%). El NSf en los usos secano y olivar es un 65% y un 56 % menor que en el uso forestal y el NSc un 48% y un 44,5% menor. Como puede verse en los porcentajes de CSf y NSf del uso de secano respecto al forestal existe una gran diferencia entre ellos, 37% con respecto a 65 %. Es posible que el labrado del suelo, que ejerce los efectos ya comentados y/o la incorporación de algún fertilizante orgánico, haya producido un aumento de la actividad microbiana que consumiría preferentemente materia orgánica soluble incorporando el C a su organismo. Esto implica la necesidad de utilizar N soluble para que los microorganismos puedan mantener su propio ratio C/N por lo que si no hay una cantidad suficiente de N soluble en el suelo se produciría un descenso de NSF (compuestos más lábiles de N) de forma acusada. Los porcentajes de variación en el uso olivar respecto al forestal de CSf y NSf muestran menores diferencias entre sí posiblemente a causa del distinto manejo o a una distinta población microbiana con respecto al uso de secano. Los descensos de CSc y NSc de ambos usos de cultivo respecto al forestal muestran menores diferencias entre CSc y NSc, posiblemente al incluir compuestos más complejos que los que se solubilizan en agua fría, dificultando su aprovechamiento por una cantidad menor de microorganismo capaces de degradarlos.

- iv) La CIC en el uso forestal (28,2 cmol₊/kg) fue un 20% superior que la CIC del uso de secano (23,5 cmol₊/kg) y un 24% superior a la del uso de olivar (22,2 cmol₊/kg), lo que corrobora la importancia de los coloides orgánicos en esta propiedad.

- v) La cantidad de K^+ en las posiciones de intercambio fue mayor en el uso forestal (0,92 $cmol_+/kg$) que en el resto (0,61 y 0,57 $cmol_+/kg$ para uso secano y olivar, respectivamente). Al ser la fuente mineral de K^+ similar en los suelos de estudio, es la degradación de la materia orgánica la principal fuente de K^+ disponible (Brady y Weil, 2014). Como era de esperar, los suelos forestales al tener un aporte continuo de materia orgánica fresca tienen mayor contenido de K^+ de cambio.
- vi) Las formas nitrogenadas NH_4^+ y NO_2^- muestran mayores valores en el uso forestal (10,8 mg/kg y 2,6 mg/kg) y menores en los usos de cultivo; 7,0 y 1,6 mg/kg , respectivamente, en el uso secano y 5,9 y 1,4 mg/kg en el uso olivar. Ambos parámetros forman parte de las etapas iniciales del ciclo del N por lo que se verán afectados positivamente en el uso forestal por la entrada continua de materia orgánica fresca, y más variada, que en los usos de cultivo debido a la mayor diversidad de flora y fauna y por una mineralización más lenta.

El único parámetro del suelo que mostró diferencias entre los usos a causa de factores ajenos al contenido en materia orgánica fue el contenido en fósforo asimilable (Pas). Las concentraciones de Pas fueron superiores en el uso de secano (42,2 mg/kg) respecto al uso forestal (21,9 mg/kg) un 253% y respecto al uso olivar (16,4 mg/kg) un 258%, lo que sugiere su origen antropogénico mediante el empleo de fertilizantes fosfatados.

4.2. Disponibilidad de elementos traza en los suelos en función del uso

Las concentraciones totales de los elementos traza analizados mostraron valores por debajo de los niveles genéricos de referencia (NGR en la categoría “otros usos” del suelo (distintos a industrial o urbano) para protección de la salud humana de metales pesados y otros elementos traza en suelos de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) (Orden 2770/2006), siendo, así mismo, muy parecidos a los valores obtenidos por De Miguel *et al.* (2002) estudiando los suelos de la zona (Tabla 4).

Tabla 4: Comparación entre las concentraciones totales de los elementos traza analizados en los suelos de secano, olivar y forestal con los niveles genéricos de referencia (NGR) de la Orden 2770/2006 de la Comunidad de Madrid y los valores obtenidos por De Miguel *et al.* (2002) en suelos de la zona de estudio. Unidades expresadas en mg/kg.

Elemento traza	Secano	Olivar	Forestal	Orden 2770/2006	De Miguel <i>et al.</i> (2002)
As	11,31 ± 2,27	11,22 ± 2,87	9,60 ± 2,85	24	10,18 ± 3,90
Ba	107,6 ± 24,4	111,6 ± 42,6	103,7 ± 30,9	4200	-
Be	1,12 ± 0,45	1,25 ± 0,552	1,18 ± 0,64	2	-
Cd	0,111 ± 0,042	0,108 ± 0,057	0,114 ± 0,0369	3	0,0999 ± 0,045
Co	7,05 ± 1,67	7,11 ± 2,13	6,68 ± 2,15	15	7,02 ± 1,88
Cr	20,45 ± 4,62	19,73 ± 5,95	20,59 ± 8,11	90	19,27 ± 6,17
Cu	11,14 ± 2,77	10,74 ± 2,90	9,64 ± 2,87	80	10,13 ± 2,39
Hg	0,048 ± 0,036	0,026 ± 0,011	0,037 ± 0,017	5	0,027 ± 0,014
Mo	0,288 ± 0,157	0,27 ± 0,136	0,282 ± 0,126	15	0,325 ± 0,337
Ni	13,95 ± 3,03	13,34 ± 3,74	12,78 ± 4,19	405	12,18 ± 3,59
Pb	16,21 ± 3,65	15,3 ± 3,66	19,3 ± 5,95	75	17,54 ± 7,56
Sb	0,453 ± 0,099	0,449 ± 0,128	0,491 ± 0,193	0,8	0,279 ± 0,092
Se	1,51 ± 1,77	0,94 ± 1,49	0,927 ± 1,416	85	-
Sn	1,86 ± 0,58	1,61 ± 0,555	1,45 ± 0,79	46730	-
V	25,55 ± 6,39	26,3 ± 7,87	25,4 ± 9,99	37	25,14 ± 7,78
Zn	43,05 ± 9,45	39,41 ± 12,68	41,93 ± 14,70	1170	31,15 ± 9,76

Como puede observarse en la Tabla 5 las concentraciones totales de los elementos traza se ordenan de forma muy similar en los tres usos, existiendo únicamente diferencias en la posición de As-Cu que aparecen intercambiadas entre sí en el uso forestal respecto a los usos de cultivo (secano y olivar) y a la posición de Se-Be que aparecen intercambiados en la ordenación del uso de secano respecto a la de olivar y forestal.

Las concentraciones totales de Cu difieren significativamente entre secano y forestal (Figura 14) siendo además superiores los valores de As en los suelos agrícolas, aunque no se encontró

significación estadística. El empleo de fungicidas y/o fertilizantes en los suelos de cultivo podría explicar el aumento de As y Cu en estos suelos (Alloway, 2013).

La concentración total de Se en los suelos de secano es superior, pero no estadísticamente, a las concentraciones de los otros suelos pudiendo provenir del empleo de fertilizantes (Alloway, 2013; Hooda, 2013). Este ligero aumento del Se en el uso de secano produciría que el Be cambiase de ordenación en estos suelos.

Aun con la misma posición en la ordenación de concentraciones totales en los tres usos (Tabla 5) el Pb es otro elemento para el que se encontraron diferencias significativas entre los usos secano y forestal fue el Pb. Los suelos ricos en materia orgánica tienden a retener mayores concentraciones de elementos traza (Murray McBride, 1994) y el Pb es uno de los que muestra mayor afinidad por este componente del suelo (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Esta característica se pone de manifiesto en las correlaciones positivas obtenidas entre el Pb y el carbono orgánico total ($P < 0,01$) y el nitrógeno total ($P < 0,05$), ambos componentes superiores en el uso forestal como se ha visto en el capítulo anterior.

Tabla 5: Concentraciones totales de los elementos traza analizados ordenadas de mayor a menor para los distintos usos. Resaltados en negrita los elementos traza cuya posición difiere entre usos.

Uso	Orden de los valores medios de las concentraciones totales
Secano	Ba > Zn > V > Cr > Pb > Ni > As > Cu > Co > Sn > Se > Be > Sb > Mo > Cd > Hg
Olivar	Ba > Zn > V > Cr > Pb > Ni > As > Cu > Co > Sn > Be > Se > Sb > Mo > Cd > Hg
Forestal	Ba > Zn > V > Cr > Pb > Ni > Cu ~ As > Co > Sn > Be > Se > Sb > Mo > Cd > Hg

Tal y como puede apreciarse en el cambio de unidades en el eje de ordenadas de la Figura 14 las concentraciones extraídas con DTPA son muy inferiores a las concentraciones totales lo que *a priori* implica, en general, una baja disponibilidad de los elementos traza analizados. No obstante, es necesario tener en cuenta que las concentraciones potencialmente disponibles de algunos elementos traza han representado porcentajes importantes respecto a su fracción

total

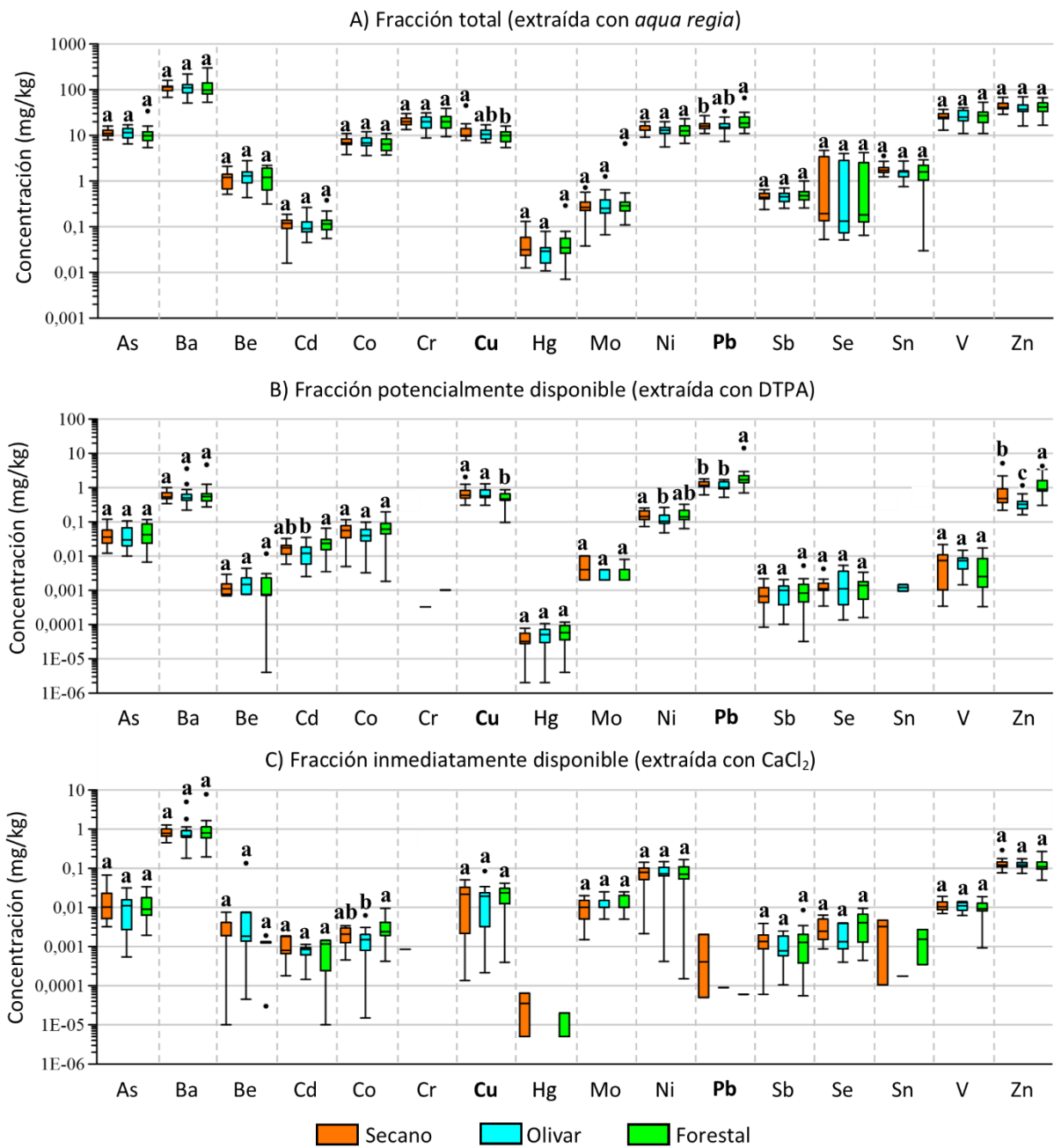


Figura 14: Concentraciones de los elementos traza analizados en la A) fracción total, extraída con *aqua regia*, B) fracción potencialmente disponible, extraída con DTPA y C) fracción inmediatamente disponible, extraída con CaCl_2 . Diferencias estadísticamente significativas entre usos identificadas con distintas letras ($P < 0,05$), elementos traza con diferencias significativas entre usos para los correspondientes índices de disponibilidad identificados en negrita.

Tabla 6), especialmente en el caso del Cd cuya fracción potencialmente disponible representa entre un 13,39 % de la fracción total en el uso de olivar, seguida de un 18,6 % en el uso de secano y mostrando los mayores porcentajes (20,83 %) en el uso forestal.

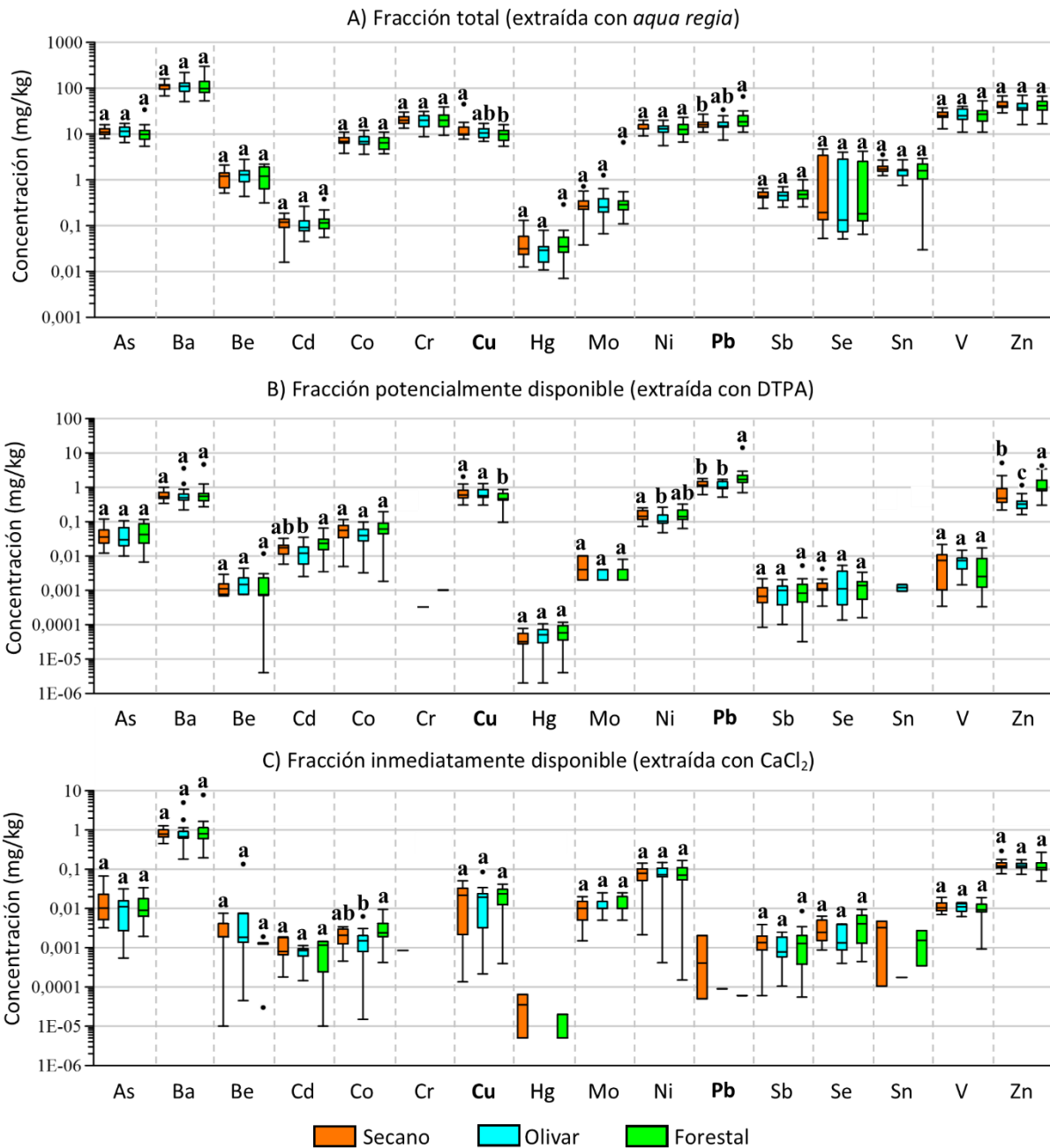


Figura 14: Concentraciones de los elementos traza analizados en la A) fracción total, extraída con *aqua regia*, B) fracción potencialmente disponible, extraída con DTPA y C) fracción inmediatamente disponible, extraída con $CaCl_2$. Diferencias estadísticamente significativas entre usos identificadas con distintas letras ($P < 0,05$), elementos traza con diferencias significativas entre usos para los correspondientes índices de disponibilidad identificados en negrita.

Tabla 6: Contribución del contenido de elementos traza potencialmente disponibles (DTPA) respecto al total.

Uso	Relación DTPA/total (%)															
	As	Ba	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mo	Ni	Pb	Sb	Se	Sn	V	Zn
Secano	0,39	0,58	0,16	18,60	0,82	-	5,84	0,09	1,45	1,12	7,58	0,20	0,86	-	0,03	1,33
Olivar	0,37	0,53	0,19	13,39	0,59	-	5,84	0,21	1,96	0,94	7,06	0,21	0,76	-	0,04	0,90
Forestal	0,49	0,66	0,13	20,83	1,00	-	5,23	0,14	0,95	1,22	8,93	0,23	0,83	-	0,02	2,87

En la Tabla 7 se recogen las concentraciones potencialmente disponibles ordenadas de mayor a menor en cada uso. Al igual que sucedía con las concentraciones totales, el orden seguido por los elementos traza en la ordenación es muy similar entre los tres usos, aunque distinto al de las concentraciones totales, difiriendo únicamente en la posición de Cu y Zn entre los usos de cultivo y el forestal. Por otro lado, se han obtenido diferencias significativas entre éstos elementos traza, siendo mayor la concentración potencialmente disponible de Cu en los dos usos de cultivo, presumiblemente por las mismas razones que para el cobre total (presencia en fertilizantes y/o fungicidas). Las concentraciones potencialmente disponibles de Zn son superiores en el uso forestal posiblemente a causa de su correlación positiva ($P < 0,05$) con la materia orgánica, seguido del uso de secano y finalmente del uso olivar. Posiblemente la diferencia en el contenido total de Zn entre los suelos de secano y olivar radique en el empleo de fertilizantes fosfatados en los que el Zn se puede encontrar como elemento traza (Alloway, 2013) ya que en el uso de secano se encuentra correlacionado con el contenido en fósforo asimilable ($P < 0,05$) el cual mostró niveles muy superiores con respecto a los otros dos.

Tabla 7: Concentraciones potencialmente disponibles de los elementos traza analizados ordenadas de mayor a menor para los distintos usos. Resaltados en negrita los elementos traza cuya posición difiere entre usos. Concentraciones expresadas en mg/kg.

Uso	Orden de los valores medios de las concentraciones potencialmente disponibles (DTPA)
Secano	Pb (1,21) > Cu (0,66) > Ba (0,59) > Zn (0,55) > Ni (0,15) > Co ($5,57 \cdot 10^{-2}$) > As ($4,28 \cdot 10^{-2}$) > Cd ($1,78 \cdot 10^{-2}$) > V ($7,42 \cdot 10^{-3}$) > Mo ($5,00 \cdot 10^{-3}$) > Se ($1,45 \cdot 10^{-3}$) > Be ($1,40 \cdot 10^{-3}$) > Sb ($8,48 \cdot 10^{-4}$) > Hg ($3,64 \cdot 10^{-5}$)
Olivar	Pb (1,11) > Cu (0,67) > Ba (0,49) > Zn (0,33) > Ni (0,12) > Co ($4,05 \cdot 10^{-2}$) > As ($4,04 \cdot 10^{-2}$) > Cd ($1,31 \cdot 10^{-2}$) > V ($7,23 \cdot 10^{-3}$) > Mo ($3,20 \cdot 10^{-3}$) > Se ($1,92 \cdot 10^{-3}$) > Be ($1,75 \cdot 10^{-3}$) > Sb ($8,84 \cdot 10^{-4}$) > Hg ($5,08 \cdot 10^{-5}$)
Forestal	Pb (1,69) > Zn (1,20) > Ba (0,57) > Cu (0,50) > Ni (0,15) > Co ($6,27 \cdot 10^{-2}$) > As ($5,08 \cdot 10^{-2}$) > Cd ($2,21 \cdot 10^{-2}$) > V ($5,44 \cdot 10^{-3}$) > Mo ($3,43 \cdot 10^{-3}$) > Se ($1,40 \cdot 10^{-3}$) > Be ($1,17 \cdot 10^{-3}$) > Sb ($9,03 \cdot 10^{-4}$) > Hg ($6,58 \cdot 10^{-5}$)

En los suelos forestales, en los que se alcanzaron mayores contenidos de Cd y Pb potencialmente disponibles, estos elementos traza proporcionaron con el carbono orgánico total y el nitrógeno total correlaciones positivas ($P < 0,05$ en todos los casos), mostrando de nuevo la afinidad de la materia orgánica por los metales pesados.

Las concentraciones potencialmente disponibles de Ni son estadísticamente superiores en el uso de secano, intermedios en el forestal e inferiores en el olivar, sin embargo, como se puede apreciar en la Tabla 7 los valores son muy parecidos entre sí.

Nuevamente, tal y como se aprecia en la Figura 14 las concentraciones inmediatamente disponibles representan una cantidad muy pequeña de la concentración total, al igual que Kelepertzis *et al.* (2015) y Sahuquillo *et al.* (2003). Teóricamente las concentraciones de los elementos traza extraídas con CaCl_2 deberían ser inferiores a las extraídas con DTPA puesto que en esta extracción se emplea DTPA con CaCl_2 (además de TEA, ver sección correspondiente en metodología). Sin embargo, existen elementos traza en los que las concentraciones inmediatamente disponibles han resultado superiores a las potencialmente disponibles, el caso más notable ha sido el Mo cuyas concentraciones potencialmente disponibles por debajo de 0,01 mg/kg han pasado a unas concentraciones inmediatamente disponibles superiores a 0,01 mg/kg. Pensamos que estos valores se han producido por varios causas: i) por cuestiones matemáticas, ya que la cantidad del número de muestras en algunos elementos traza no coinciden para las extracciones potencial e inmediatamente disponibles, pudiendo resultar por tanto un mayor valor en la extracción con CaCl_2 a causa de un menor número de muestras con concentraciones elevadas, ii) por un posible sesgo introducido en la medida de las cantidades tan pequeñas extraídas con CaCl_2 y iii) que el extractante empleado para la obtención de las fracciones potencial y/o inmediatamente disponibles hayan modificado determinados parámetros del suelo (p.ej. el pH) introduciendo variaciones en las extracciones, como posiblemente haya sucedido en el caso del Mo (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Para contrarrestar estos efectos se tendrán en cuenta para los futuros estudios los elementos traza con $N \geq 15$, aunque hayan mostrado variaciones a causa del método de extracción.

En la Tabla 8 se encuentran ordenadas de mayor a menor las concentraciones extraídas con CaCl_2 de los elementos traza con un $N \geq 15$. Como puede apreciarse la ordenación resultante es idéntica en los tres usos exceptuando la presencia de Mo que únicamente ocurre en el uso forestal al mostrar un $N > 15$, aspecto que no sucede en los otros dos usos.

Tabla 8: Concentraciones inmediatamente disponibles de los elementos traza analizados ordenadas de mayor a menor para los distintos usos. Resaltados en **negrita** los elementos traza cuya posición difiere entre usos. Concentraciones expresadas en mg/kg

Uso	Orden de los valores medios de las concentraciones inmediatamente disponibles (CaCl_2) ($N \geq 15$)
-----	---

Secano	Ba (0,80) >Zn (0,12) >Ni (7,06.10 ⁻²) >Cu (2,06.10 ⁻²) >As (1,27.10 ⁻²) >Co (2,05.10 ⁻³) >Sb (1,54.10 ⁻³)
Olivar	Ba (0,68) >Zn (0,12) >Ni (7,73.10 ⁻²) >Cu (1,52.10 ⁻²) >As (1,07.10 ⁻²) >Co (1,37.10 ⁻³) >Sb (1,02.10 ⁻³)
Forestal	Ba (0,81) >Zn (0,11) >Ni (7,71.10 ⁻²) >Cu (2,33.10 ⁻²) > Mo (1,27.10⁻²) ~As (1,23.10 ⁻²) >Co (2,57.10 ⁻³) >Sb (1,30.10 ⁻³)

La fracción inmediatamente disponible de Co es la única que ha mostrado diferencias significativas entre usos siendo superior en el uso forestal. Sin embargo, al no mostrar correlación alguna con otras variables y tratándose de diferencias muy pequeñas entre concentraciones muy bajas, creemos que su importancia es escasa.

La Tabla 9 recoge las regresiones lineales llevadas a cabo a partir de los contenidos de elementos traza potencial (DTPA) e inmediatamente (CaCl₂) disponibles analizados como variables dependientes, y el contenido total como variable independiente. Las ecuaciones de regresión expresan los modelos para los que se ha obtenido una significación $P < 0,05$ encontrándose así mismo en la tabla los coeficientes R^2 ajustado (correspondientes al porcentaje de explicación de cada uno de los modelos).

Como puede apreciarse las concentraciones totales de los elementos traza estudiados no suelen ser buenos indicadores de la disponibilidad potencial y mucho menos de la inmediata, ya que existen pocos elementos traza en los que su contenido total sea explicativo, aunque sea parcialmente, de los distintos índices de disponibilidad estudiados. Tanto en el uso de secano como en el olivar las concentraciones potencialmente disponibles de Cd, Cu y Pb han podido explicarse parcialmente por medio de las respectivas concentraciones totales, aunque con ajustes variables y porcentajes de explicación siempre inferiores al 40 %, por lo que para estos elementos traza existen otros parámetros que influyen en mayor medida en sus concentraciones potencialmente disponibles que sus concentraciones totales. Los usos de cultivo han sido los únicos en los que la concentración total de un elemento traza ha explicado parte de la fracción inmediatamente disponible de ese elemento traza, el Cu, al igual que observaron Kelepertzis *et al.* (2015) analizando la disponibilidad de elementos traza en suelos agrícolas dedicados al cultivo de cítricos achacando esta relación al empleo de fungicidas y fertilizantes con Cu.

Por otro lado, en el uso forestal las concentraciones potencialmente disponibles de los elementos traza As, Co, Cu, Ni, Pb y Zn han podido explicarse parcialmente por sus concentraciones totales, con porcentajes de explicación ligeramente superiores a los obtenidos en las regresiones lineales llevadas a cabo con los usos de cultivo (Tabla 9).

Tabla 9: Regresiones lineales significativas realizadas con los contenidos potencial (DTPA) e inmediatamente (CaCl_2) disponibles de los elementos traza analizados como variables dependientes y su contenido total como variable independiente.

Uso	Ecuación de la regresión	Significancia	R ² ajustado
Secano	$\text{Cd}_{\text{DTPA}} = 0,007 + 0,104 \text{ Cd}_{\text{Total}}$	0,020	0,237
	$\text{Cu}_{\text{DTPA}} = -0,610 + 0,447 \text{ Cu}_{\text{Total}}$	0,030	0,373
	$\text{Cu}_{\text{CaCl}_2} = -0,061 + 0,032 \text{ Cu}_{\text{Total}}$	0,037	0,198
	$\text{Pb}_{\text{DTPA}} = -0,3 + 0,383 \text{ Pb}_{\text{Total}}$	0,025	0,208
Olivar	$\text{Cd}_{\text{DTPA}} = 0,005 + 0,075 \text{ Cd}_{\text{Total}}$	0,048	0,155
	$\text{Cu}_{\text{DTPA}} = -0,43 + 0,385 \text{ Cu}_{\text{Total}}$	0,005	0,326
	$\text{Cu}_{\text{CaCl}_2} = -0,042 + 0,023 \text{ Cu}_{\text{Total}}$	0,013	0,324
	$\text{Pb}_{\text{DTPA}} = -0,274 + 0,36 \text{ Pb}_{\text{Total}}$	0,002	0,386
Forestal	$\text{As}_{\text{DTPA}} = -0,130 + 0,077 \text{ As}_{\text{Total}}$	0,005	0,348
	$\text{Co}_{\text{DTPA}} = -0,119 + 0,092 \text{ Co}_{\text{Total}}$	0,003	0,377
	$\text{Cu}_{\text{DTPA}} = -0,354 + 0,323 \text{ Cu}_{\text{Total}}$	0,001	0,449
	$\text{Ni}_{\text{DTPA}} = -0,236 + 0,147 \text{ Ni}_{\text{Total}}$	0,000	0,509
	$\text{Pb}_{\text{DTPA}} = -0,509 + 0,496 \text{ Pb}_{\text{Total}}$	0,004	0,368
	$\text{Zn}_{\text{DTPA}} = -0,983 + 0,466 \text{ Zn}_{\text{Total}}$	0,012	0,28

Las relaciones entre los elementos traza totales y los potencial e inmediatamente disponibles se han establecido por diversos autores para diferenciar la procedencia antropogénica de los mismos, basándose en los elevados porcentajes de explicación obtenidos con respecto a los elementos de procedencia geogénica (Kelepertzis y Argyraki, 2015). En este estudio, los porcentajes de explicación obtenidos no fueron tan elevados, posiblemente por el bajo contenido total de los elementos traza en los suelos analizados en contraposición con los contenidos encontrados por Kelepertzis y Argyraki (2015). Sin embargo, en el trabajo realizados hasta ahora hemos puesto de manifiesto que existe adicción antropogénica de elementos traza a través de fertilizantes y fitosanitarios empleados en los suelos agrícolas, sin olvidar la deposición aérea, por su situación periurbana a Madrid, que ha sido referenciada en trabajos anteriores (Vázquez de la Cueva *et al.*, 2014).

4.2.1 Relación de la disponibilidad de los elementos traza con los parámetros físico-químicos del suelo en función del uso

Para investigar qué factores físico-químicos del suelo pueden influir en la disponibilidad de elementos traza, considerando cada uso separadamente, se realizó un análisis de redundancia (RDA). Las variables físico-químicas del suelo: pH, carbonato, carbono orgánico total, nitrógeno total, cloruros, amonio soluble, fósforo asimilable, óxidos de manganeso amorfos y cristalinos, óxidos de hierro amorfos y cristalinos, contenido en arcillas, carbono soluble en agua fría y en agua caliente y nitrógeno soluble en agua fría y en agua caliente fueron empleadas como variables explicativas junto a la distancia a Madrid, mientras que las concentraciones totales, potencialmente disponibles (DTPA) e inmediatamente disponibles (CaCl_2) fueron utilizadas como variables respuesta de tres RDA para cada uso.

En la Tabla 10 se observa la varianza de los índices de disponibilidad explicada por los parámetros físico-químicos del suelo seleccionados a partir del test de Monte Carlo empleado en el RDA. En todas las extracciones dicha varianza explicada fue máxima en el uso forestal, disminuyendo en el uso olivar y alcanzando los menores porcentajes en el uso de secano. En éste uso, el porcentaje de varianza explicado disminuye conforme lo hace la fuerza extractiva de los reactivos utilizados. En los usos olivar y forestal se aprecia una diferencia entre los porcentajes de varianza explicados por las fracciones total y potencialmente disponibles (DTPA) con respecto a la inmediatamente disponible, cuyo porcentaje fue menor. El descenso en la varianza explicada de las concentraciones de los elementos traza inmediatamente disponibles puede deberse a que dichas concentraciones en los suelos estudiados fueron muy bajas, lo que produce una mayor incertidumbre en la medida. En cualquier caso, los resultados ponen de manifiesto que, *a priori*, las prácticas agrícolas de los suelos de cultivo modifican las relaciones entre sus propiedades físico-químicas y la disponibilidad de elementos traza.

Tabla 10: Porcentajes de varianza explicada para las concentraciones totales, potencialmente disponibles (DTPA) e inmediatamente disponibles (CaCl_2) por los parámetros físico-químicos del suelo identificados como variables explicativas significativas en el análisis de redundancia (RDA) ($p < 0,1$) para los tres usos del suelo estudiados.

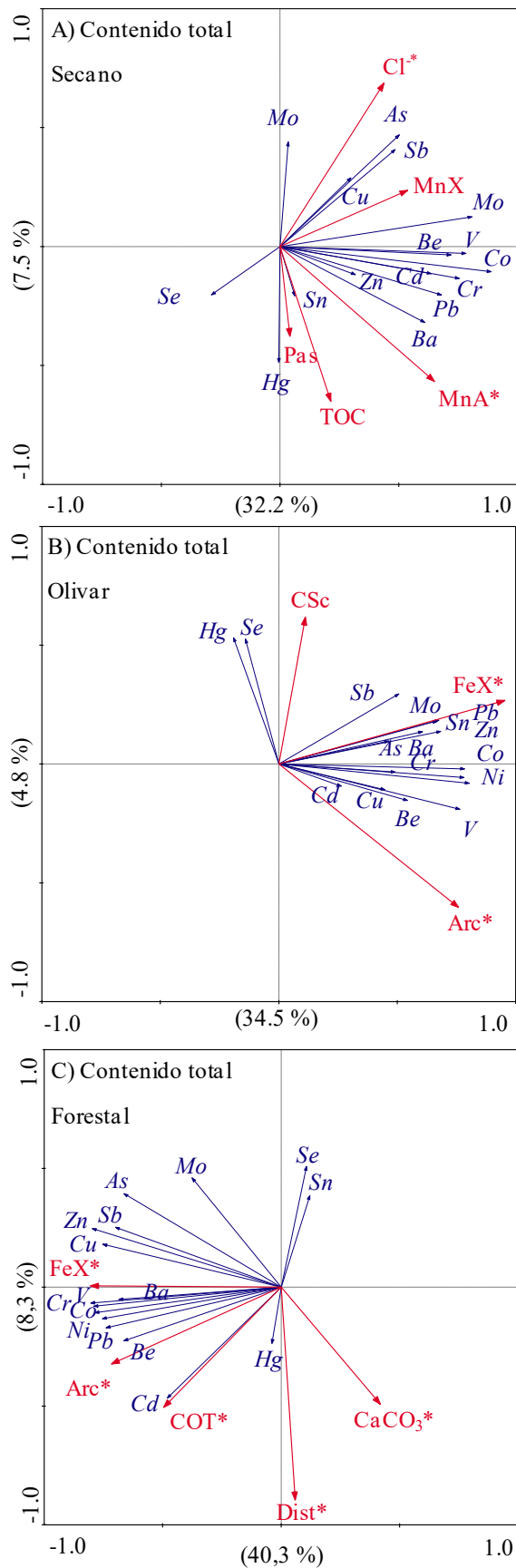
Uso	Porcentaje de varianza explicada		
	Totales	DTPA	CaCl_2
Secano	28,5%	22,6%	11,0%
Olivar	39,3%	40,5%	25,9%
Forestal	48,6%	49,0%	31,5%

4.2.2.1 Concentraciones totales de los elementos traza y su relación con los parámetros del suelo

A través del RDA se pone de manifiesto la influencia de los parámetros físico-químicos de los suelos ($P < 0,1$ identificados con * en los *biplots*) en el contenido total de los elementos traza analizados para los distintos usos (Figura 15), siendo por orden de importancia: i) óxidos de Mn-amorfo (MnA) y contenido en cloruro (Cl^-), para el uso seco (Figura 15.A); ii) óxidos de Fe-cristalino (FeX) y contenido en arcillas (Arc) para el uso olivar (Figura 15.B); y iii) óxidos de Fe-cristalinos (FeX), carbono orgánico total (COT), distancia a Madrid (Dist), contenido en arcillas (Arc) y contenido en carbonatos (CaCO_3) para el uso forestal (Figura 15.C).

Independientemente del uso, los óxidos de hierro y manganeso son variables explicativas significativas del contenido total. Estos óxidos se relacionan así mismo con el contenido en arcillas pudiendo precipitar alrededor de ellas o formando parte del cemento de los agregados (Goldberg, 1989) aspecto que se ha observado en los *biplots* del uso olivar y forestal (Figura 15.B y C). Estos óxidos pueden fijar los elementos traza en sus partículas minerales (según sus afinidades $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Co} > \text{Pb}$) o pueden adsorberlos en su superficie externa (según sus afinidades: $\text{Cu} > \text{Pb} > \text{Zn} > \text{Co} > \text{Cd}$) (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Las arcillas presentes en el suelo pueden a su vez adsorber elementos traza (con afinidades $\text{Cu} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Fe} = \text{Ni} = \text{Mn}$ según Farrah *et al.* (1980)), dependiendo del tipo de arcilla y del pH.

En el *biplot* del uso de seco (Figura 15.A) los vectores de las concentraciones totales de los elementos traza As, Sb, Cu y Mo se han alineado con el contenido en cloruro (Cl^-) y, además, se han obtenido correlaciones significativas positivas entre Cl^- y estos elementos traza (As, Cu y Mo con Cl^- $P < 0,05$; Sb con Cl^- $P < 0,01$). Estas correlaciones y ordenación de elementos podrían interpretarse como una procedencia común y su identificación en el suelo podría atribuirse a razones climáticas. En suelos de cultivo es común el empleo de fungicidas clorados para



proteger las cosechas, pudiendo ser As, Cu y Sb los principales componentes activos (Albanese *et al.*, 2015; Bünemann *et al.*, 2006; Kasuga *et al.*, 2006; Matschullat, 2000; Wightwick *et al.*, 2013). En cuanto al posicionamiento del vector de Mo en el RDA no se ha encontrado ninguna referencia al empleo de este elemento traza como plaguicida salvo referencias actuales en ensayos de laboratorio (Qureshi *et al.*, 2015), sí como fertilizante pero sin embargo en suelos carbonatados no suelen emplearse puesto que con los valores de pH de estos suelos la disponibilidad del Mo es alta (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). A la luz del RDA una posible explicación para la ordenación del Mo sería su oposición al Pas. Ambos iones (fosfato y molibdato) competirían por los sitios de sorción resultando en un aumento de Mo disponible en la solución del suelo (Vistoso *et al.*, 2012) favoreciendo el lixiviado de este elemento

Figura 15: Biplots de ordenación a partir del análisis de redundancia (RDA) realizado entre las variables físico-químicas del suelo (rojo) y las concentraciones totales (aqua regia) de los elementos traza estudiados (azul). Porcentajes de varianza explicada por las variables explicativas del gráfico entre paréntesis. Las variables explicativas significativas ($p < 0,1$) identificadas mediante un *. Abreviaciones: Cl^- contenido en cloruros, MnX óxidos de Mn cristalinos, MnA óxidos de Mn amorfos, COT carbono orgánico total, Pas fósforo asimilable, CSc carbono soluble en agua caliente, FeX óxidos de Fe cristalinos, Arc contenido en arcillas, $Dist$ distancia a Madrid y $CaCO_3$ contenido en carbonatos.

(Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Por otro lado, Ishikawa *et al.* (2015) estudiando la influencia de la fertilización con NH_4Cl en la acumulación de Cd en trigo observaron que 200 mm de lluvia simulada en un experimento en macetas lixivió únicamente la mitad del Cl^- añadido, quedando el resto retenido en el suelo. Así mismo, Pérez-Murcia *et al.* (2007) determinaron que en suelos bajo climas semiáridos con una precipitación inferior a 200 mm se produjo la acumulación de Cl^- procedente de la fertilización con purines de cerdo. Se podría concluir que a causa de las escasas precipitaciones recogidas en la zona de estudio en los seis meses anteriores al muestreo (≈ 122 mm, Estación de Arganda del Rey), se haya reducido la lixiviación de Cl^- permitiendo la identificación de este subgrupo de elementos traza. No obstante, estos resultados deben tomarse con precaución, debido a la ausencia de diferencias significativas en el contenido de Cl^- entre los tres usos del suelo.

Los vectores de las concentraciones totales de Sn, Se y Hg se han alineado con los vectores de las variables explicativas COT y Pas en el *biplot* del uso de secano (Figura 15.A). Estos tres elementos traza suelen estar sujetos a reacciones con compuestos orgánicos (metilación) (Kabata-Pendias y Pendias, 2001; Obrist *et al.*, 2009) aspecto que reforzaría la correlación positiva entre Hg y COT ($P < 0,05$). Por otro lado, un posible origen común para estos tres elementos traza sería su presencia como impureza en fertilizantes fosfatados (Alloway, 2013) aspecto que explicaría la posición del vector de Pas entorno a estos elementos traza, sin embargo no existen correlaciones que puedan afirmarlo.

En el *biplot* del uso olivar (Figura 15.B) los vectores Hg y Se se alinean con el de CSc en el eje 2, estos elementos traza se encontrarían en este uso relacionados con la materia orgánica soluble. En cambio, el vector de Sn se alinea con el de Fe-cristalinos, en vez de con parámetros relacionados con la materia orgánica y se encontraría, por tanto, más estabilizado en el suelo.

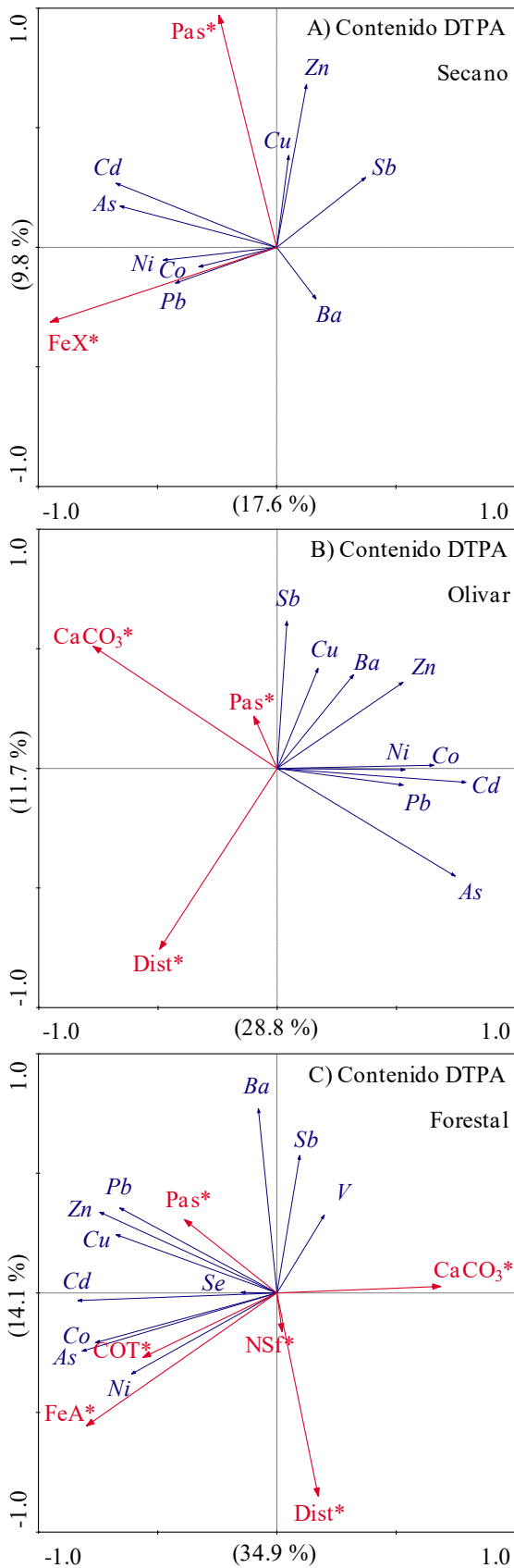
En la ordenación del uso forestal (Figura 15.C) el vector de Hg se encuentra en el eje 2 compartiendo dirección con el COT, junto al que se encuentra el vector de Cd, y la distancia a Madrid. En este uso la fracción total de Se y Sn parecen depender de la distancia a la ciudad de Madrid, a mayor distancia menor concentración, por lo que estos elementos traza pueden provenir de deposición aérea (Alloway, 2013).

4.2.2.2 Concentraciones potencialmente disponibles (DTPA) de los elementos traza y su relación con los parámetros del suelo

La capacidad de los parámetros físico-químicos para explicar el contenido potencialmente disponible de los elementos traza estudiados, porcentaje de varianza explicado, varía en función del uso, siendo mayor en el uso forestal (49 %), seguido del uso olivar (40,5 %) y por último el uso secano (22,6 %). Así mismo, las variables explicativas significativas varían entre los usos, pero mostrando algunas similitudes, por orden de importancia fueron (Figura 16): i) Fe-cristalinos (FeX) y fósforo asimilable (Pas) en el uso de secano (Figura 16.A), ii) CaCO_3 , distancia a Madrid (Dist) y fósforo asimilable en el uso de olivar (Figura 16.B), y iii) Fe-amorfos (FeA), distancia a Madrid, fósforo asimilable, nitrógeno soluble en agua fría (NSf), COT y CaCO_3 en el uso forestal (Figura 16.C). Como puede observarse, en los tres usos aparecen los óxidos de hierro o el contenido en carbonato y el fósforo asimilable como variables explicativas significativas.

Posiblemente la razón por la que los óxidos de Fe y/o el CaCO_3 aparezcan como variables explicativas significativas en los tres usos se debe al propio método de extracción. El tipo de extractante empleado (DTPA) impide, o al menos pretende reducir, la disolución de carbonatos presentes en el suelo (Lindsay y Norwell, 1978) que implicaría la liberación de cierta cantidad de elementos traza que pertenecería a una fracción menos disponible. El DTPA es un agente quelante con un funcionamiento similar al que desempeñan la materia orgánica y parte de los óxidos de hierro y manganeso. Por tanto, la materia orgánica junto con los óxidos de hierro tienen un comportamiento antagónico con respecto al contenido en carbonato equivalente, es decir, si un elemento traza se encuentra presente en los carbonatos no será extraído por el DTPA que simula la acción quelante de los óxidos de hierro (y manganeso) y de la materia orgánica. Como se puede ver en los tres *biplots* las concentraciones potencialmente disponibles de algunos elementos traza se alinean con los óxidos de hierro y/o la materia orgánica, no con el CaCO_3 . Cuando aparece el CaCO_3 en los *biplots* (uso olivar y forestal), el vector de este parámetro se opone a los vectores correspondientes a los elementos traza.

En torno a los óxidos de Fe u opuestos al CaCO_3 se alinean los vectores de: i) As, Cd, Co, Ni y Pb en el uso de secano (Figura 16.A); ii) As, Cd, Co, Ni y Pb en el uso de olivar (Figura 16.B); y iii) As, Cd, Co, Ni y Se en el uso forestal (Figura 16.C). Por tanto, la fracción potencialmente



disponible de estos elementos dependería de los óxidos de hierro al encontrarse presumiblemente adsorbidos a ellos o fijados en sus estructuras cristalinas, lo que influye en su disponibilidad y movilidad. Estas relaciones entre los óxidos de hierro y manganeso con los elementos traza se recoge también en las correlaciones existentes entre ellos, si bien es cierto que la cantidad de correlaciones en el uso forestal entre elementos traza y óxidos de Fe y Mn es mayor que en los otros usos. Esta relación entre disponibilidad de elementos traza y óxidos de Fe y/o Mn ha sido observada en suelos carbonatados por muchos autores: en suelos agrícolas dedicados al viñedo (Kelepertzis *et al.*, 2018), o en suelos urbanos, suburbanos y mineros (Argyaki *et al.*, 2018), o en suelos agrícolas calcáreos en entornos periurbanos (De Santiago-Martín *et al.*, 2013b). En el uso forestal a los efectos ya descritos de los óxidos de Fe habría que sumarle el relacionado con el COT, cuyo vector

Figura 16: Biplots de ordenación a partir del análisis de redundancia (RDA) realizado entre las variables físico-químicas del suelo (rojo) y las concentraciones potencialmente disponibles (DTPA) de los elementos traza estudiados (azul). Porcentajes de varianza explicada por las variables explicativas del gráfico entre paréntesis. Las variables explicativas significativas ($p < 0,1$) identificadas mediante un *. Abreviaciones: Pas fósforo asimilable, FeX óxidos de Fe cristalinos, $CaCO_3$ contenido en carbonatos, $Dist$ distancia a Madrid, COT carbono orgánico total, FeA óxidos de Fe amorfos, NSf nitrógeno soluble en agua fría.

se alinea con el de Fe-amorfos, variable con la cual existe una correlación positiva significativa ($P < 0,01$), esta ordenación y correlación supondría la existencia de complejos órgano-minerales en los que la materia orgánica estaría protegida por los óxidos de Fe-amorfos, además de por los Mn-amorfos y arcillas con los que el COT también muestra correlaciones positivas significativas ($P < 0,05$), lo que estabilizaría aún más la materia orgánica de estos suelos (Wiseman y Püttmann, 2006).

En los tres usos el vector del fósforo asimilable (Pas) se ordena en el eje 2 de los tres *biplots*, si bien es cierto que en el uso forestal (Figura 16.C) muestra una componente en el eje 1 mayor que en los usos de cultivo, posiblemente a causa de su correlación con el COT en este uso que se sitúa en el eje 1. En el entorno del vector de Pas se encuentran los vectores de distintos elementos traza: i) Cu y Zn en el uso de secano; ii) Ba, Cu, Sb y Zn en el uso olivar; y iii) Cu, Pb y Zn en el uso forestal. Tanto en el uso de secano como en el forestal el contenido potencialmente disponible de Zn se correlaciona significativa y positivamente con el Pas ($P < 0,05$ para los dos usos), lo que podría implicar la precipitación de este elemento traza bajo la forma de fosfatos en estos dos usos (Kumpiene *et al.*, 2008) y/o que este Zn potencialmente disponible en el uso de secano provenga del empleo de fertilizantes fosfatados (Escudey *et al.*, 2011). Sin embargo, en el uso olivar la existencia de estos precipitados fosfatados no es tan clara al no existir ninguna correlación entre el Pas y los elementos traza situados en torno suyo en el *biplot*, por lo que posiblemente la posición de este parámetro se deba a dos razones: i) su relación positiva y significativa con el CaCO_3 ($P < 0,01$), posiblemente debido a una mayor adicción de fertilizantes fosfatados necesarios para suplir la formación de fosfatos cálcicos que reducen la disponibilidad del fósforo y/o ii) por la posición del vector de distancia a Madrid que se encuentra en oposición directa a los elementos traza Ba, Cu, Sb y Zn, siendo además en este uso una variable explicativa más importante que el Pas.

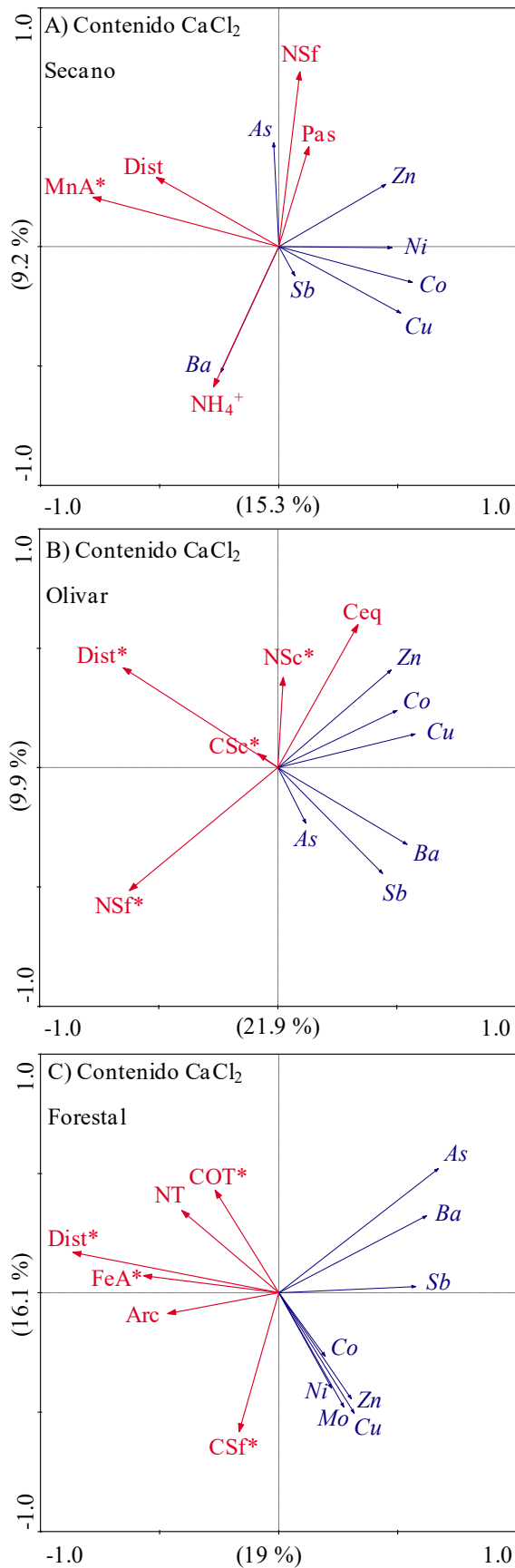
Como se acaba de mostrar, la distancia a la ciudad de Madrid influiría en el contenido potencialmente disponible de Ba, Cu, Sb y Zn, a lo que habría que añadirle en el uso forestal su incidencia en los contenidos potencialmente disponibles de Ba, Sb y V. Por tanto, en los usos olivar y forestal los contenidos potencialmente disponibles de estos elementos se deberían a deposición aérea (Alloway, 2013; Guéguen *et al.*, 2012), aspecto reforzado por las correlaciones negativas significativas entre la distancia a Madrid y las fracciones

potencialmente disponibles de Ba y Sb ($P < 0,01$ y $P < 0,05$ respectivamente para ambos usos), lo que implica que más cerca de la ciudad estas concentraciones son mayores.

4.2.2.3 Concentraciones inmediatamente disponibles (CaCl_2) de los elementos traza y su relación con los parámetros del suelo

Como se ha indicado anteriormente el porcentaje de varianza de las concentraciones inmediatamente disponibles de los elementos traza explicado por los parámetros del suelo es inferior en todos los usos a los registrados para los otros dos índices de disponibilidad. Este porcentaje, al igual que en los otros índices de disponibilidad, es superior en el uso forestal, seguido del uso olivar, siendo el uso de secano el que presenta el mínimo porcentaje. Por tanto, el uso influye en las concentraciones potencialmente disponibles de los elementos traza analizados a través de distintos parámetros físico-químicos del suelo (Figura 17), siendo por orden de importancia en el RDA: i) óxidos de Mn-amorfos (MnA) en el uso de secano (Figura 17.A); ii) carbono soluble en agua caliente (CSc), distancia a Madrid (Dist), nitrógeno soluble en agua fría (NSf) y nitrógeno soluble en agua caliente (NSc) en el uso olivar (Figura 17.B); y iii) distancia a Madrid (Dist), carbono soluble en agua fría (CSf), COT y Fe-amorfos en el uso forestal (Figura 17.C).

Tanto en el uso olivar como en el uso forestal se han identificado parámetros del suelo relacionados con la materia orgánica del suelo, en especial con la materia orgánica soluble (CSf, CSc, NSf, NSc), como variables explicativas significativas. En el uso olivar los vectores de Co, Cu y Zn se orientan en el sentido del vector NSc y en contra del Ncw, mientras que en el uso forestal los vectores de Co, Cu, Mo, Ni y Zn se alinean con el de Ccw y se oponen al de COT. Todos estos elementos traza tienden a relacionarse con la materia orgánica, formando complejos con ella (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Una interpretación a esta ordenación sería que en el uso forestal la distribución de los elementos traza sería mayoritaria en los compuestos orgánicos más lábiles, los extraídos en frío, mientras que la ordenación opuesta con el COT podría interpretarse cómo que esa fracción lábil es minoritaria con respecto al contenido en carbono orgánico total. Respecto al uso olivar, la alineación de los vectores de dichos elementos traza con el nitrógeno extraído con agua caliente indicaría una distribución mayoritaria de dichos elementos en la fracción más recalcitrante analizada, que quedaría en el suelo después de la mineralización que introducen las labores agrícolas.



En el uso de secano, los vectores de las concentraciones inmediatamente disponibles de los elementos traza Co, Cu, Ni y Zn se oponen al de MnA, parámetro correlacionado positiva y significativamente con los óxidos cristalinos de Fe ($P < 0,01$). Anteriormente, en el RDA del uso secano realizado con las concentraciones potencialmente disponibles los Fe-cristalinos se encontraban relacionados con los elementos traza As, Cd, Co, Ni y Pb, mientras que en el RDA del uso de secano para la extracción con CaCl₂ los óxidos de Mn amorfos, como se acaba de indicar muy relacionados con los Fe-cristalinos, se oponen a los elementos traza Co, Cu, Ni y Zn. Derivado de ambas ordenaciones, se podría deducir que los elementos traza Co y Ni se encuentran sorbidos en los óxidos de Fe y Mn, puesto que en el RDA de la extracción con DTPA se encuentran alineados entre sí y en la extracción con CaCl₂ los vectores de Co y Ni se

Figura 17: Biplots de ordenación a partir del análisis de redundancia (RDA) realizado entre las variables físico-químicas del suelo (rojo) y las concentraciones inmediatamente disponibles (CaCl₂) de los elementos traza estudiados (azul). Porcentajes de varianza explicada por las variables explicativas del gráfico entre paréntesis. Las variables explicativas significativas ($p < 0,1$) identificadas mediante un *. Abreviaciones: MnA óxidos de Mn amorfos, Dist distancia a Madrid, NSf nitrógeno soluble en agua fría, Pas fósforo asimilable, NH₄⁺ amonio soluble, NSc nitrógeno soluble en agua caliente, CSc carbono soluble en agua caliente, CaCO₃ contenido en carbonatos, COT carbono orgánico total, FeA óxidos de Fe amorfos, CSf carbono soluble en agua fría, NT nitrógeno total y Arc contenido en arcillas.

oponen al de Mn-amorfo, indicando que no se encuentran adsorbidos a estos óxidos en sus posiciones de intercambio (que es lo que muestra la extracción con CaCl_2) sino sorbidos dentro de ellos, siendo por tanto muy poco disponibles de forma inmediata, lo que reduce su riesgo potencial para el medio ambiente. Para los otros elementos traza (Cu y Zn) solamente se puede llegar a la conclusión de que la presencia de óxidos de Mn amorfos (o de Fe cristalinos debido a su correlación) influye negativamente en su disponibilidad inmediata. No obstante, es necesario recordar que el porcentaje de variación explicado por el RDA en el uso de secano es el menor (11 %) lo que implica que hay factores externos a los analizados que influyen en el contenido inmediatamente disponible.

Por último, tanto en el uso olivar como en el forestal la distancia a la ciudad de Madrid ha sido identificada como una variable explicativa significativa de las más importantes, encontrándose su vector en el eje 1 (el que absorbe un mayor porcentaje de varianza) o en su entorno. En ambos usos su vector (Dist) se opone a los de As, Ba y Sb lo que implicaría que la deposición aérea de estos elementos traza afecta a sus concentraciones inmediatamente disponibles. El carbono soluble en agua caliente reduciría la disponibilidad inmediata de estos elementos traza en el uso olivar, aunque su importancia es reducida debido al pequeño módulo de su vector. En el uso forestal el vector del contenido en Fe-amorfo (FeA) se alinea con la distancia a Madrid en contraposición a los vectores de As, Ba y Sb, con lo que este parámetro del suelo reduciría su disponibilidad inmediata. Al igual que sucedía en el uso de secano, el vector de As en el RDA del uso forestal llevado a cabo con las concentraciones potencialmente disponibles se orientaba con los Fe-amorfos mostrando que podía encontrarse adsorbido y/o sorbido a ellos, mientras que en el RDA llevado a cabo con las concentraciones inmediatamente disponibles ambos vectores (el de Fe-amorfos y As) se oponen, por lo que el As se encontraría principalmente sorbido a los óxidos de Fe amorfos y no en las posiciones de intercambio de éstos, siendo por tanto poco disponibles. Mientras, para las concentraciones inmediatamente disponibles de Ba y Sb sólo es posible indicar que se encuentran reguladas en el uso forestal principalmente por el contenido en óxidos de Fe amorfos además de por la distancia a Madrid.

En el uso de secano estos elementos traza (As, Ba y Sb) difieren en su ordenación, encontrándose en sentidos opuestos del eje 2. El vector de As coincide con los de Pas y NSf lo que podría indicar su posible retención por fosfatos (Kabata-Pendias y Pendias, 2001), aspecto reforzado por la correlación positiva entre As y Pas ($P < 0,05$), y que la existencia de As en

formas orgánicas los que facilitaría su movilidad. En el sentido contrario al vector de As se encuentra el vector de Ba alineado con NH_4^+ con el cual también se correlaciona positivamente ($P < 0,05$), no se ha encontrado ninguna referencia que pueda explicar esta ordenación. El vector de Sb, al igual que en los otros dos usos, se sitúa en oposición al vector de la distancia de Madrid lo que implicaría nuevamente la deposición aérea de este elemento traza. Estas variables respuesta en el uso de secano no han sido identificadas como estadísticamente significativas, sin embargo, parecen relacionarse coherentemente con los elementos traza indicados.

En resumen, las concentraciones totales, potencialmente disponibles e inmediatamente disponibles de los elementos traza analizados son muy parecidas entre usos. Sin embargo, las concentraciones de Cu en los usos de cultivo, secano y olivar, parecen mostrar un aumento respecto al uso forestal a causa de su empleo como fungicidas y/o fertilizantes. En el uso forestal se produce un aumento de las concentraciones totales y potencialmente disponibles de Pb, de las potencialmente disponibles de Cd, Ni y Zn y de las inmediatamente disponibles de Co posiblemente acumulados a causa de los mayores niveles de materia orgánica de estos suelos. La disponibilidad de los elementos traza muestra diferencias entre los usos dependiendo más de la fracción mineral en los suelos de cultivo, especialmente de los óxidos de Fe y Mn, y más de compuestos órgano-minerales en el uso forestal. En los tres usos la disponibilidad potencial de ciertos elementos traza parece estar controlada al menos en parte por su precipitación como fosfatos. La distancia a Madrid ha sido identificada como variable explicativa significativa especialmente para los elementos traza Ba y Sb en los usos olivar y forestal. La disponibilidad tanto potencial como inmediata es muy reducida, recalando la capacidad de amortiguación que tienen los suelos carbonatados a la presencia de contaminantes, al menos con las concentraciones actuales. Sin embargo, existen elementos traza (Co, Cu, Mo, Ni y Zn) que pueden estar formando compuestos móviles relacionados con la materia orgánica soluble por lo que sería necesario su observación y seguimiento.

4.3. Actividades enzimáticas de los suelos en función del uso

Con el objetivo de estudiar la afectación de la actividad biológica de suelos calcáreos periurbanos sujetos a los usos secano, olivar y forestal se determinaron las actividades de doce enzimas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos del C: α -glucosidasa (*aglu*), β -galactosidasa (*bgal*), β -glucosidasa (*bglu*), fenoloxidasa (*phe*); del N: arilamidasa (*aryln*), N-acetil-glucosaminidasa (*nag*), ureasa (*ure*); del P: fosfatasa (*phos*), fosfatasa ácida (*pac*) y fosfatasa alcalina (*pak*); y del S: arilsulfatasa (*aryls*); además, se determinó la actividad deshidrogenasa (*dh*) como medida indirecta de la biomasa microbiana del suelo. Como se observa en la Tabla 11, en todos los casos las actividades enzimáticas fueron superiores en el uso forestal, salvo la *phe* que fue superior en el uso de secano. El orden de las actividades enzimáticas (de mayor a menor, en Tabla 11) muestra similitudes en las enzimas con mayor actividad, mostrando solo diferencias entre *pac* y *bglu* que intercambian su posición entre los suelos de cultivo y el forestal, mientras que varía el orden entre los tres usos para las enzimas con menor actividad (*aryln*, *aryls*, *bgal*, *nag* y *ure*).

Tabla 11: Ordenación, de mayor a menor, de las actividades enzimáticas determinadas en este estudio en función del uso agrícola.

Uso	Ordenación de las actividades enzimáticas de mayor a menor (mU/g)
Secano	<i>phe</i> (0,160 U/g) > <i>phos</i> (0,624) > <i>pak</i> (0,322) > <i>bglu</i> (0,147) > <i>pac</i> (0,113) > <i>dh</i> (0,085) > <i>aglu</i> (0,038) > <i>aryln</i> (0,027) > <i>aryls</i> (0,013) ~ <i>bgal</i> (0,013) ~ <i>nag</i> (0,013) > <i>ure</i> (0,010)
Olivar	<i>phe</i> (0,147 U/g) > <i>phos</i> (0,324) > <i>pak</i> (0,211) > <i>bglu</i> (0,117) > <i>pac</i> (0,075) > <i>dh</i> (0,062) > <i>aglu</i> (0,029) > <i>aryln</i> (0,020) > <i>bgal</i> (0,013) > <i>ure</i> (0,009) > <i>aryls</i> (0,007) > <i>nag</i> (0,007)
Forestal	<i>phe</i> (0,146 U/g) > <i>phos</i> (1,133) > <i>pak</i> (0,891) > <i>pac</i> (0,527) > <i>bglu</i> (0,294) > <i>dh</i> (0,178) > <i>aglu</i> (0,053) > <i>aryls</i> (0,041) > <i>aryln</i> (0,036) > <i>nag</i> (0,025) > <i>bgal</i> (0,024) > <i>ure</i> (0,012)

*Las unidades se expresan en mU/g, excepto *phe* que se expresa en U/g

Con el fin de investigar el efecto del uso del suelo (secano, olivar y forestal) sobre estas actividades enzimáticas se llevó a cabo un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) (Figura 18). La aplicación de este análisis puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de los suelos de cultivo y el forestal. Las enzimas *nag*, *pak* y *aryls* distinguieron entre los tres usos, mientras que las enzimas *aglu*, *bglu*, *aryln*, *phos* y *pac* distinguieron entre usos de cultivo y forestal. Las actividades enzimáticas *bgal*, *phe* y *ure* no mostraron diferencias significativas entre usos. Las diferencias significativas encontradas para

la actividad deshidrogenasa (*dh*) entre el uso forestal y los de cultivo pusieron de manifiesto que la biomasa microbiana es superior en el uso forestal y menor en los suelos de cultivo.

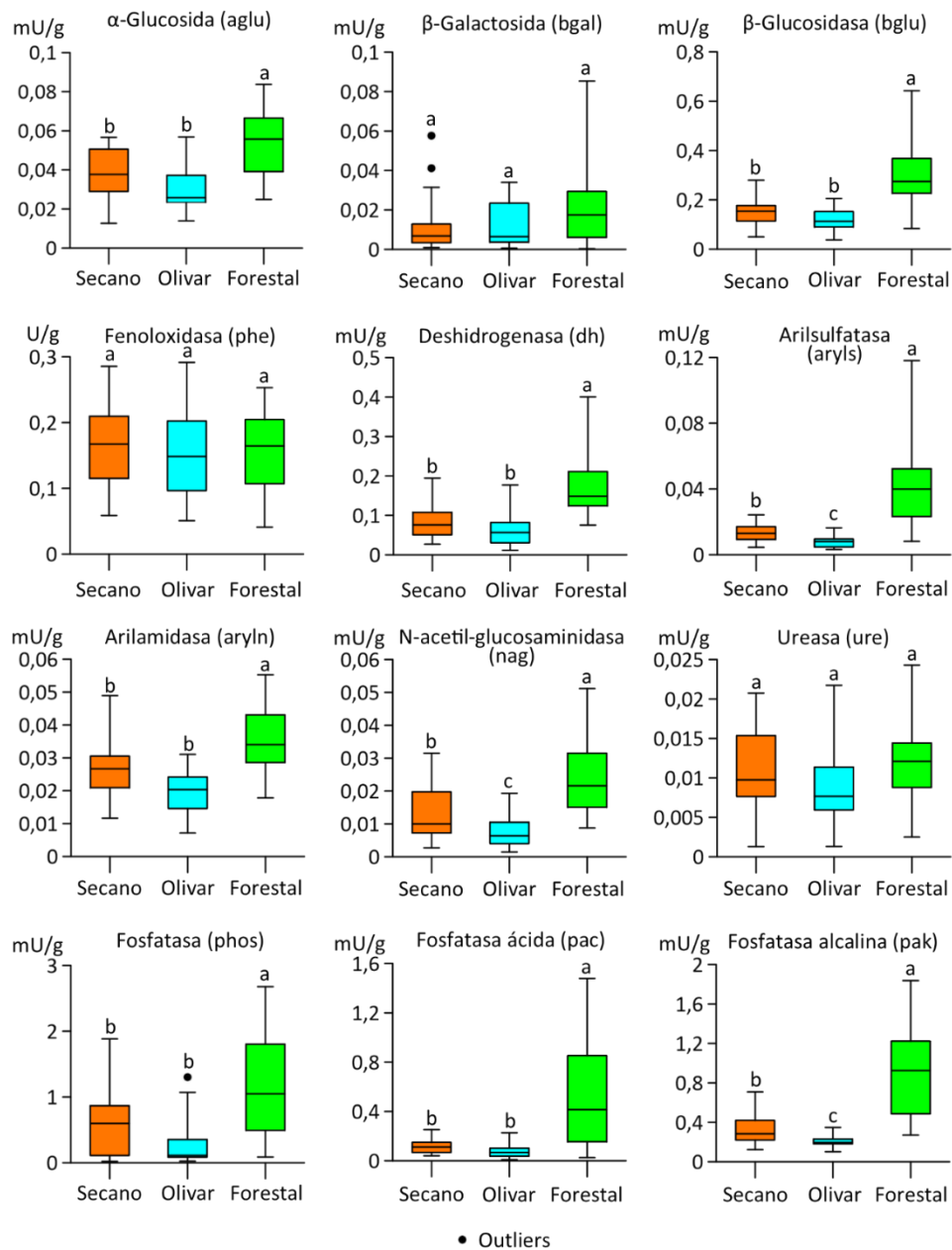


Figura 18: Actividades enzimáticas en función del uso agrícola. Diferencias estadísticamente significativas entre usos identificadas con distintas letras ($P < 0,05$).

Además de determinar las diferencias que introducen los distintos usos agrícolas en las actividades enzimáticas, es necesario determinar cómo se relacionan estas actividades enzimáticas entre sí en cada uso. El uso del suelo introduce un desequilibrio en los nutrientes presentes en el suelo, en la capacidad de almacenar agua y en la calidad de los recursos extraídos por la cosecha (Bissett et al., 2014) pudiendo modificar las relaciones entre las

actividades enzimáticas (Fanin et al., 2016). Con este objetivo se llevó a cabo un análisis de redes para las actividades enzimáticas de cada uso a partir de los valores de las correlaciones positivas bivariadas de Spearman. No se emplearon las correlaciones negativas con el fin de no deformar las redes generadas, puesto que la actividad fenoloxidasa fue la única en la que todas las correlaciones con el resto de enzimas fueron negativas. A partir de este análisis de redes se generaron tres gráficos, que se encuentran en la Figura 19, y la Tabla 12 de los parámetros de cada red.

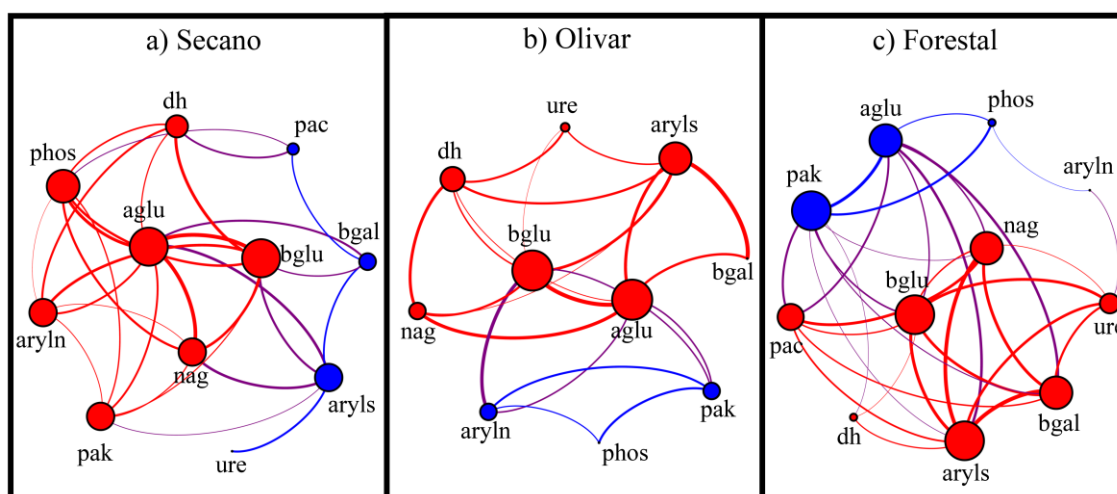


Figura 19: Representación gráfica (grafos) de las redes obtenidas a partir de las correlaciones bivariadas positivas entre las actividades enzimáticas analizadas. Distintos colores en un mismo uso implican grupos distintos empleados en los posteriores análisis.

En cada uso se identificaron dos grupos de actividades enzimáticas mediante la aplicación de algoritmos para identificar comunidades en el análisis de redes (ver Material y Métodos), denominados en adelante grupo 1 (rojo) y grupo 2 (azul) para todas las enzimas, siendo el grupo 1 el mayoritario. En el uso de secano el grupo 1 lo formaron las enzimas *aglu*, *bglu*, *aryln*, *nag*, *pak*, *phos* y *dh* y, por otro lado, *bgal*, *aryls*, *ure* y *pac* formaron el grupo 2. En el uso olivar el grupo 1 lo conformaron las enzimas *aglu*, *bglu*, *aryls*, *nag*, *ure* y *dh* y en el grupo 2 *aryln*, *pak* y *phos*. Por último, en el uso forestal el grupo 1 lo formaron las enzimas *bgal*, *bglu*, *aryls*, *nag*, *ure*, *pac* y *dh* mientras que en el grupo 2 se encontraban las enzimas *aglu*, *aryln*, *pak* y *phos*. Se observó una similitud entre los grupos generados en el uso olivar y forestal, compartiendo en sus grupos 1 las enzimas *bgal*, *bglu*, *aryls*, *nag*, *ure* y *dh*, y en el grupo 2 las actividades *aryln*, *phos* y *pak*. En secano las agrupaciones generadas difirieron de los otros

usos, posiblemente debido a sus relaciones entre las actividades enzimáticas con los parámetros físico-químicos en este tipo de suelos.

Como puede apreciarse en la Tabla 12, tanto el uso de secano como el forestal mostraron la misma cantidad de nodos, mientras que en el uso olivar fue algo menor ya que ni la fenoloxidasa ni la fosfatasa ácida se correlacionaron positivamente con ninguna otra enzima. La cantidad de aristas, el grado medio y la densidad de grafo fueron ligeramente superiores en el uso forestal mostrando por tanto que las actividades enzimáticas podrían estar más correlacionadas entre sí en el suelo natural que en los suelos de cultivo.

Tabla 12: Parámetros estadísticos principales de las redes.

Parámetros estadísticos de grafo	Uso del suelo		
	Secano	Olivar	Forestal
Nodos	11	10	11
Aristas	30	22	32
Grado medio	5,46	4,4	5,82
Densidad de grafo	0,55	0,49	0,58
Modularidad	0,09	0,164	0,07

4.3.1 Influencia de los parámetros físico-químicos de los suelos en las actividades enzimáticas en función del uso

Con el objetivo de evaluar qué parámetros físico-químicos ejercen más influencia en las actividades enzimáticas correspondientes a cada uso estudiado, se ha llevado a cabo una serie de análisis de redundancia (RDA). Como variables respuesta se tuvieron en cuenta todas las actividades enzimáticas determinadas en este estudio (α -glucosidasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, fenoloxidasa, deshidrogenasa, arilamidasa, N-acetil-glucosaminidasa, ureasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, fosfatasa y arilsulfatasa). Además, se llevaron a cabo dos RDA más por cada uso, utilizando como variables respuesta las actividades enzimáticas de los grupos 1 y 2 generados en el análisis de redes. En todos los RDA, como variables explicativas se emplearon los parámetros físico-químicos del suelo.

El RDA es un análisis estadístico multivariante que tiene en cuenta las relaciones entre las variables respuesta, entre las variables explicativas y entre ambos grupos de variables. Por tanto, es de esperar que, si las variables respuesta muestran un alto grado de correlación entre

sí la varianza explicada debería ser alta. Como puede apreciarse en la Tabla 13 el porcentaje de varianza explicada entre ambos ejes del RDA es siempre superior para el grupo 1, respecto a las actividades enzimáticas sin agrupar (“Todas” en la Tabla 13), lo que supone una mejora del porcentaje de explicación para el grupo 1 del 11-15% según el uso. Esta mejora no se mantiene en todos los grupos 2. Así, en el uso olivar el empleo de los grupos de actividades enzimáticas supone un aumento en el porcentaje de varianza explicada del 14,5%, mientras que en el uso forestal los porcentajes explicados son similares a los obtenidos sin agrupar (-0,5%) y disminuyen en el uso de secano (-23,6%). Estas variaciones en los porcentajes de explicación de las actividades enzimáticas agrupadas pueden deberse a la respuesta diferencial que tienen los distintos grupos, 1 y 2, respecto a los parámetros físico-químicos de cada uso y/o al efecto que puedan tener otras variables externas no contempladas en el RDA (como por ejemplo la disponibilidad de elementos traza).

Tabla 13: Comparación de los porcentajes de varianza explicada en los análisis de redundancia (RDA) tomando como variables explicativas los parámetros físico-químicos del suelo y como variables respuesta todas las actividades enzimáticas sin agrupar (Todas) y agrupadas (Grupo1 y Grupo 2) según los grupos que aparecen en la Figura 19. Entre paréntesis se muestran las variaciones en los porcentajes de los RDA con las actividades enzimáticas agrupadas respecto al RDA sin agrupar.

Uso	Ejes del RDA	Varianza explicada		
		Todas	Grupo 1	Grupo 2
Secano	Eje 1	39,7	58,8 (+19,1)	27,4 (-12,3)
	Eje 2	14	10 (-4)	2,7 (-11,3)
	Ambos	53,7	68,8 (+15,1)	30,1 (-23,6)
Olivar	Eje 1	34,7	51 (+16,3)	55,9 (+21,2)
	Eje 2	12,9	6,7 (-6,2)	6,2 (-6,7)
	Ambos	47,6	57,7 (+10,1)	62,1 (+14,5)
Forestal	Eje 1	43,8	60,9 (+17,1)	50,4 (+6,6)
	Eje 2	11,2	5,5 (-5,7)	4,1 (-7,1)
	Ambos	55	66,4 (+11,4)	54,5 (-0,5)

Se presentan los RDA correspondientes a los grupos 1 y 2 de actividades enzimáticas, dado que los porcentajes de varianza explicada fueron generalmente superiores a los porcentajes explicados considerando todas las actividades enzimáticas de forma conjunta.

En los RDA del uso de secano los parámetros físico-químicos del suelo empleados como variables explicativas para el grupo 1 de enzimas ($P < 0,1$) fueron, por orden: carbono orgánico soluble en agua caliente (CSc), contenido en arcilla (Arc), nitrógeno total (NT), amonio soluble (NH_4^+), óxidos de hierro cristalinos (FeX) y óxidos de hierro amorfos (FeA) (Figura 4, A.1). Los

parámetros físico-químicos más explicativos para el grupo 2 en este uso fueron, por orden: los óxidos de manganeso amorfos (MnA) y el contenido en carbono orgánico total (COT) (Figura 4, A.2). Para el uso olivar los principales parámetros físico-químicos del suelo explicativos en los RDA del grupo 1, por orden, fueron: pH, carbono orgánico total (COT), óxidos de hierro cristalinos (FeX) y nitrógeno soluble en agua caliente (NSc) (Figura 4, B.1). Para las actividades enzimáticas del grupo 2 las principales variables explicativas son el amonio soluble (NH_4^+), fósforo disponible (Pas), nitrógeno total (NT) y nitrógeno soluble en agua caliente (NSc) (Figura 20, B.2). En los RDA llevados cabo a con los datos de los suelos forestales, los principales parámetros físico-químicos explicativos del grupo 1 fueron, por orden de importancia: carbono orgánico total (COT), nitrógeno soluble en agua caliente (NSc), nitrógeno total (NT) y contenido en carbonato equivalente (CaCO_3) (Figura 20, C.1). Los principales parámetros físico-químicos explicativos del grupo 2, por orden, son: carbono orgánico total (COT), nitrato soluble (NO_3^-), contenido en carbonato cálcico equivalente (CaCO_3) y humedad a capacidad de campo (WHC) (Figura 20, C.2).

Como era de esperar, en todos los biplot llevados a cabo se han identificado parámetros relacionados con la materia orgánica en el suelo como variables explicativas importantes, ya que las enzimas son la herramienta que tienen los microorganismos del suelo para obtener de la materia orgánica los nutrientes y energía que necesitan (Sinsabaugh et al., 2008). Sin embargo, dichos parámetros no son los mismos en cada uso ni en cada grupo. Lo mismo sucede en cuanto a la fracción mineral u otros parámetros físico-químicos del suelo. Las variaciones encontradas dentro de cada uso (grupos 1 y 2 de enzimas) y entre los distintos usos marcan el efecto de cada uso en la funcionalidad del suelo.

En el grupo 1 del uso de secano el CSc se correlacionó positivamente con todas las actividades enzimáticas de este grupo ($P < 0,01$ para todas las correlaciones, salvo con la fosfatasa alcalina $P < 0,05$). Como se ha comentado anteriormente (4.1 Parámetros físico-químicos de los suelos estudiados) los microorganismos emplean inicialmente los compuestos orgánicos más fácilmente disponibles, que en nuestro estudio estaría representado por el carbono soluble en agua fría (CSf). Sin embargo, que en el uso de secano las actividades enzimáticas se encuentren relacionadas con el CSc, que contiene compuestos más recalcitrantes, indicaría un menor contenido en formas lábiles de carbono asociadas a la fracción de CSf, posiblemente como producto de una rápida mineralización microbiana potenciada por las labores agrícolas.

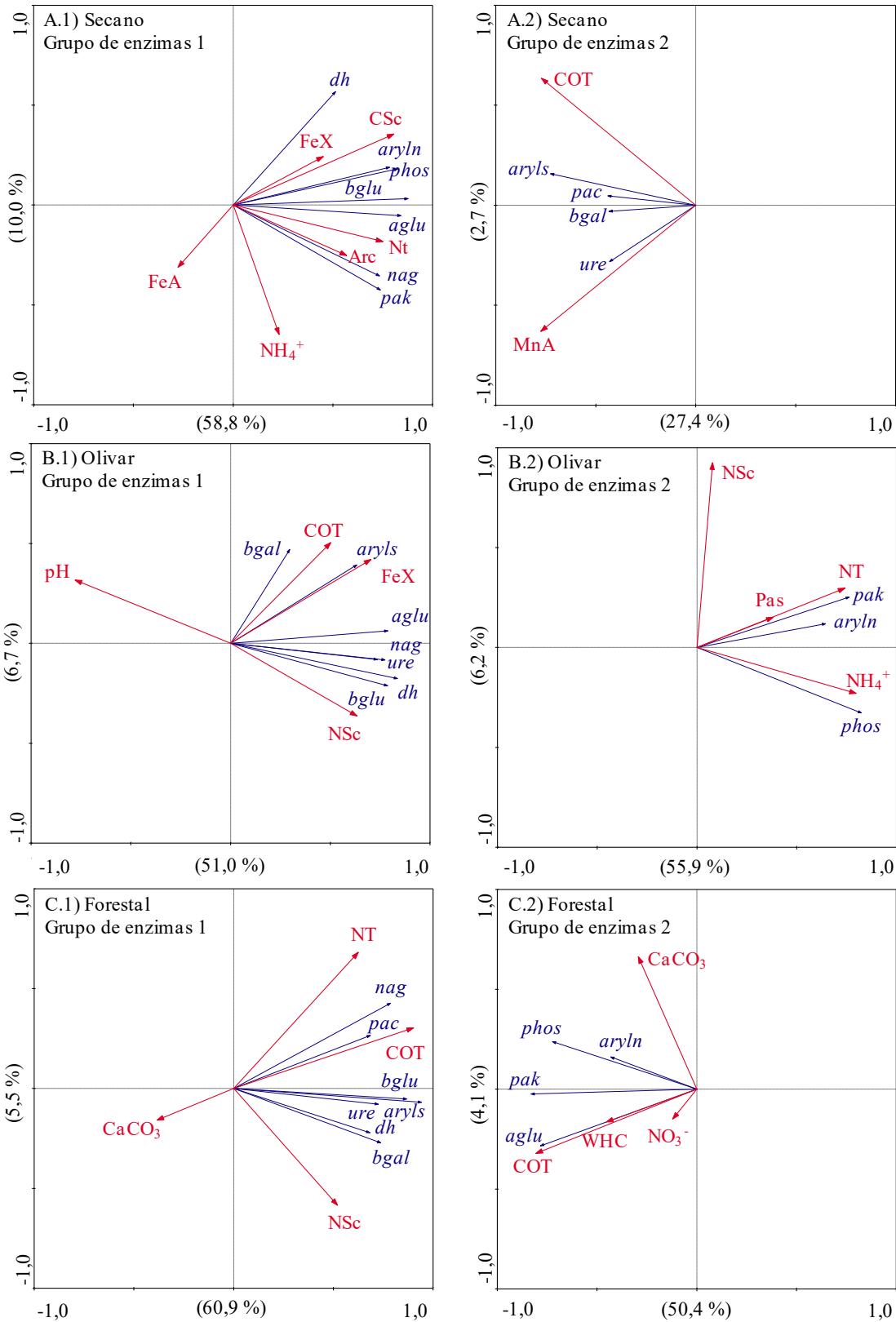


Figura 20: Ordenaciones generadas a partir del análisis de redundancia (RDA). Variables explicativas (parámetros físico-químicos del suelo) en rojo y variables respuesta (actividades enzimáticas) en azul. Todas las variables explicativas de los biplots son significativas ($P < 0,1$). Abreviaturas: CSc carbono orgánico soluble en agua caliente, FeX óxidos de Fe-cristalino, NT nitrógeno total, Arc contenido en arcillas, NH₄⁺ amonio soluble, FeA óxidos de Fe-amorfo, COT carbono orgánico total, MnA óxidos de Mn-amorfo, NSc nitrógeno soluble en agua caliente Pas fósforo asimilable, CaCO₃ contenido en carbonatos, NO₃⁻ contenido en nitratos, WHC humedad a capacidad de campo.

El mismo razonamiento puede aplicarse al NT que, asociado mayoritariamente a la materia orgánica, no constituiría, como parte de los compuestos más recalcitrantes, una forma primaria aprovechable por los microorganismos que emplearían compuestos más lábiles como el nitrógeno soluble en agua fría (NSf) o formas iónicas como NO_3^- y NH_4^+ . De hecho, el contenido en amonio se encuentra situado en el eje 2 del biplot, perpendicular a las actividades enzimáticas mostrando, por tanto, poca influencia en ellas, y las actividades *aglu*, *nag* y *pak* se correlacionaron positivamente con el contenido en nitrógeno soluble en agua caliente (NSc) ($P < 0,05$ para *aglu* y *nag*, $P < 0,01$ para *pak*). Por tanto, a similitud del caso del C, los microorganismos posiblemente estén empleando compuestos de N más complejos para llevar a cabo sus actividades. El posicionamiento del vector deshidrogenasa (*dh*), indicador de la biomasa microbiana, en el entorno del vector CSc, con el cual se correlaciona positivamente ($P < 0,01$), reforzaría la idea de que los microorganismos en el uso de secano estarían empleando compuestos de C más recalcitrantes, al no estar la *dh* relacionada con el CSf.

En el RDA los vectores de FeX y Arc se alinean con las actividades enzimáticas con las que guardan algunas correlaciones positivas: i) Arc con: *aglu* ($P < 0,05$), *bglu* ($P < 0,05$) y *nag* ($P < 0,05$) y ii) FeX con: *bglu* ($P < 0,05$) y *dh* ($P < 0,05$). Posiblemente estas enzimas se encuentren, también, adsorbidas en las superficies de Arc y FeX aumentando su protección frente a la degradación causada por agentes externos (variaciones de temperatura, pH, proteasas, etc.) (Burns, 1982; Datta et al., 2017). La ordenación del FeA, más móvil que FeX, situado en oposición a las actividades enzimáticas y parámetros minerales indicados anteriormente, y correlacionado negativamente con *aryln* ($P < 0,05$), refuerza la relación entre las actividades enzimáticas y las formas más difíciles de degradar de la materia orgánica.

En el RDA del grupo 2 del uso de secano las variables explicativas MnA y COT se ordenan en la misma dirección, a lo largo del eje -1. Las actividades enzimáticas *aryls* y *pac* se ordenan más cerca del vector COT debido a su correlación positiva con él ($P < 0,01$), mientras que el vector *bgal* se encuentra entre MnA y COT, al estar correlacionado con ambos ($P < 0,05$ para ambas correlaciones), y *ure* se alinea con MnA debido a que se encuentra correlacionada con este parámetro ($P < 0,05$) pero no con el COT. En esta ordenación las actividades enzimáticas estarían relacionadas con componentes más móviles (MnA) que en el grupo anterior.

En el RDA del grupo 1 de uso olivar el vector de pH se opone al de la mayoría de actividades enzimáticas de este grupo: *aryls*, *aglu*, *nag*, *bglu*, *dh* y *ure* con las que a su vez se correlaciona

negativamente ($P < 0,01$ para *bglu*, *dh*, *nag* y *ure*; $P < 0,05$ para *aglu* y *aryls*). Los valores de pH de estos suelos (8,23) pueden ser excesivamente altos para estas actividades enzimáticas afectando a su funcionamiento e, incluso, promoviendo su desnaturalización (Tabatabai, 1982). Al igual que ocurría en el uso de secano, en este uso de olivar la actividad deshidrogenasa se correlaciona también con el CSc ($P < 0,05$) por lo que los microorganismos en este uso estarían empleando compuestos de C más recalcitrantes al no correlacionarse *dh* con CSf.

En el RDA del grupo 2 del uso olivar los vectores de las actividades enzimáticas *aryln*, *pak* y *phos* se alinean con los vectores de NH_4^+ , Pas y NT. La ordenación conjunta de estas enzimas con estas variables explicativas puede deberse a la relación entre los ciclos del N y del P. Es conocido que en presencia de N disponible se produce un aumento de la fosfatasa al dejar de ser éste un factor limitante en la producción de enzimas (Olander y Vitousek, 2000), favoreciendo la transformación de compuestos orgánicos a inorgánicos con la consiguiente liberación de Pas. Como en el uso de secano la ordenación de las variables anteriores en el eje 1 del biplot estaría relacionada con la materia orgánica más lábil. Así, el vector de NSc se encuentra en el eje 2, prácticamente perpendicular a las actividades de este grupo, por lo que su influencia en ellas sería muy reducida.

En el uso forestal el biplot correspondiente al grupo 1 muestra las enzimas (*aryls*, *bgal*, *bglu*, *dh*, *nag*, *pac* y *ure*) alineadas en el eje +1 junto al vector del COT y flanqueadas por los vectores de NSc y NT. En dirección opuesta al conjunto se sitúa el vector de CaCO_3 . En este grupo 1 todas las actividades enzimáticas se correlacionaron positivamente con el COT ($P < 0,01$ para todas ellas excepto *dh* $P < 0,05$) y todas, salvo la *dh*, se correlacionaron positivamente con el NT ($P < 0,01$). Por el contrario, la ordenación del CaCO_3 en sentido opuesto al resto de variables en el biplot podría explicarse por su correlación positiva con el pH ($P < 0,05$) como en el uso olivar, que a su vez se correlacionó negativamente con *aryls* y *nag* ($P < 0,01$), con *ure* ($P < 0,05$), con el NT ($P < 0,01$) y con COT ($P < 0,05$). Contrariamente a lo que sucede en los usos de cultivo, en los suelos forestales la deshidrogenasa se correlacionó positivamente con el CSf ($P < 0,05$), en vez de con CSc como ocurría en los de cultivo, pudiendo indicar que los microorganismos en este uso se encuentran empleando compuestos lábiles de C provenientes de la fracción CSf. Si bien, el hecho de que *bgal* esté correlacionada con el NSc ($P < 0,05$) podría indicar que

la población microbiana utilizaría compuestos orgánicos lábiles, directamente, y recalcitrantes, a través de la degradación enzimática.

En el biplot del RDA del grupo 2 del uso forestal las actividades enzimáticas (*aglu*, *aryln*, *pak* y *phos*) se ordenan en el eje -1 alineadas con los vectores de COT, NO_3^- , WHC y en menor medida de CaCO_3 , que tiende a alinearse con el eje +2 de forma perpendicular. La posición de las enzimas podría deberse a su relación con el COT con el que se correlacionaron las enzimas *aglu* y *pak* ($P < 0,01$), y WHC con *aglu* ($P < 0,01$), *pak* y *phos* ($P < 0,05$ para ambas), ya que, WHC se correlacionó también con el COT, NT, Pas, Arc, NSc ($P < 0,05$ para todas estas correlaciones) y CSc ($P < 0,01$). Estas ordenaciones y correlaciones ponen de manifiesto la relación entre las actividades enzimáticas y en ciclo del carbono en particular, y la dependencia de estas actividades del contenido en humedad del suelo. El vector de NO_3^- se ordenó en el mismo sentido que el vector de *aryln* y, dada las correlaciones negativas obtenidas entre este anión y el NT ($P < 0,01$) y el NH_4^+ ($P < 0,05$), esta ordenación podría indicar que el proceso de nitrificación se encuentra favorecido en los suelos forestales. Ninguna de las enzimas de este grupo se correlacionó ni con el pH ni con el CaCO_3 lo que explicaría la posición del vector de CaCO_3 en el biplot.

En resumen, las actividades enzimáticas de los usos estudiados se encontraron muy relacionadas con parámetros vinculados con la materia orgánica y con otros coloides del suelo. El contenido en CaCO_3 y/o el pH incidió en los usos olivar y forestal, pudiendo influir en las enzimas *aglu*, *bglu*, *dh*, *aryls*, *nag* y *ure* en el olivar y *aryls*, *nag* y *ure* en el forestal. Los dos usos de cultivo han mostrado relación entre el carbono soluble en agua caliente y la actividad deshidrogenasa, mientras que en el uso forestal esta actividad enzimática se ha correlacionado con el carbono soluble en agua fría, indicativo del mayor contenido en formas solubles fácilmente disponibles para los microorganismos en los suelos forestales.

El empleo de los grupos de actividades enzimáticas generados a partir del análisis de redes ha permitido distinguir, con mayor claridad en los usos secano y olivar, dos patrones: i) uno de ellos asociado al grupo 1 de actividades enzimáticas, generado a partir del análisis de redes, que se relaciona con la fracción orgánica recalcitrante y, ii) otro patrón, asociado al grupo 2, asociado a la fracción orgánica lábil. En el uso forestal esta discriminación no ha sido tan clara, ya que en el grupo 1 tienen cabida las dos fracciones de materia orgánica y en el grupo 2 la interpretación se ha realizado al margen de estas fracciones.

4.3.2 Influencia de la disponibilidad de elementos traza en las actividades enzimáticas en suelos bajo usos agrícolas

En los análisis RDA realizados para conocer cómo se relacionan los distintos índices de disponibilidad de los elementos traza provenientes de su extracción total (*aqua regia*), potencialmente disponible (DTPA) e inmediatamente disponible (CaCl_2) con las actividades enzimáticas se ha seguido el mismo esquema metodológico que en el apartado anterior. Inicialmente, se ha llevado a cabo el análisis con todas las actividades enzimáticas juntas como variables respuesta, y después se han realizado los RDA dividiendo las actividades enzimáticas en los dos grupos identificados según el análisis de redes.

Como muestra la Tabla 14, en los RDA llevados a cabo con todas las actividades enzimáticas el porcentaje de varianza explicado por el contenido potencialmente disponible (DTPA) en los usos olivar y forestal es superior al explicado por los contenidos totales de los elementos traza. Esto mismo sucede en los grupos 1 de los usos olivar y forestal. Esta diferenciación indica de nuevo que las concentraciones totales no son buenos indicadores de la actividad biológica de los suelos.

Las concentraciones totales en el uso de secano explican un mayor porcentaje de varianza que en los otros dos usos utilizando como variables respuesta tanto “todas” las actividades enzimáticas, como separadamente en los grupos 1 y 2. En cambio, el uso forestal mostró los mayores porcentajes de varianza explicada con las concentraciones potencialmente disponibles (DTPA) de los elementos traza como variables explicativas, tanto con “todas” las actividades enzimáticas, como con las actividades de su grupo 1 como variables respuesta. Sin embargo, para el grupo 2 de enzimas el uso de secano mostró los mayores porcentajes de varianza explicada. En el caso de la fracción inmediatamente disponible (CaCl_2) únicamente en el grupo 2 de secano y olivar se identificó alguna variable explicativa como significativa, siendo ligeramente superior el porcentaje de varianza explicado en el uso de secano respecto al olivar.

Tabla 14: Comparación de los porcentajes de varianza explicada en los análisis de redundancia (RDA) tomando como variables explicativas los distintos índices de disponibilidad de los elementos traza ($P < 0,1$) y como variables respuesta las actividades enzimáticas sin agrupar y agrupadas siguiendo los grupos que aparecen en la figura 2

Variables explicativas en los análisis de redundancia (RDA)		Porcentaje de varianza explicada		
		Todas	Grupo 1	Grupo 2
Secano	Totales	27,3%	46,6% (+19,3%)	50,2% (+22,9%)
	DTPA	10,7%	- (-10,7 %)	27,7% (+17%)
	CaCl ₂	-	- (-)	16,7% (+16,7%)
Olivar	Totales	21,7%	23,8% (+2,1)	31,8% (+10,1%)
	DTPA	25,4%	40,9% (+15,5%)	- (-25,4 %)
	CaCl ₂	-	- (-)	14,5% (+14,5%)
Forestal	Totales	26,6%	27,8% (+1,2%)	14,9% (-11,7%)
	DTPA	55,3%	65,0% (+9,7%)	12,6% (-42,7%)
	CaCl ₂	-	- (-)	- (-)

No obstante, la distinción entre los dos grupos de enzimas ha introducido una mejora en el porcentaje de varianza explicada por las concentraciones totales de los elementos traza en los tres usos. Para el resto de las fracciones disponibles (DTPA y CaCl₂) el porcentaje de explicación varía entre los usos. Un aspecto importante a resaltar es la mejora introducida en la explicación de las actividades enzimáticas por parte de la fracción inmediatamente disponible (extraída con CaCl₂) identificando aportaciones estadísticamente significativas para los usos de secano y olivar (en el grupo 2) que no aparecían en los RDA con todas las variables respuesta.

Puesto que, como en el apartado anterior, el aporte en la explicación de las actividades enzimáticas por parte de los elementos traza en todos los usos es superior empleando los dos grupos de actividades enzimáticas, se utilizaron ambos grupos en el análisis RDA.

4.3.2.1 Concentraciones totales

Las ordenaciones generadas a partir del análisis RDA considerando como variables explicativas las concentraciones totales de elementos traza se muestran en la Figura 21. Las ordenaciones obtenidas pueden explicarse, en parte, por las correlaciones entre los parámetros físico-químicos del suelo y los contenidos totales de los elementos traza, y por las correlaciones entre los parámetros físico-químicos del suelo con las actividades enzimáticas, resultando relaciones indirectas entre el contenido de elementos traza y las actividades enzimáticas.

En el uso de secano, para el grupo 1 de actividades enzimáticas (Figura 21, A.1) el Sn se encuentra en sentido opuesto al conjunto de enzimas, siendo posible su influencia negativa sobre las enzimas de este grupo, especialmente sobre las actividades *aglu*, *bglu*, *aryln* y *phos* al encontrarse en una dirección diametralmente opuesta. Tampoco se ha encontrado ninguna correlación negativa entre el Sn y los parámetros físico-químicos del suelo que pudieran explicar indirectamente la ordenación. Los demás elementos traza identificados como variables explicativas significativas (Hg, As, Cu, Pb y Sb) se encuentran alineados con las actividades enzimáticas, o en el caso de As, Cu, Pb y Sb perpendiculares a algunas (*nag* y *pak*) poniendo de manifiesto la falta de relación entre estos elementos y estas enzimas.

En el grupo 2 de actividades enzimáticas (Figura 21, A.2) del uso de secano el Mo se encuentra alineado en el eje 2 del RDA en dirección opuesta a la actividad *ure*. La ordenación del Hg en el biplot concordante con las enzimas de este grupo en dirección y sentido se debería a las correlaciones positivas de este elemento con el COT y NT ($P < 0,05$), al igual que las actividades enzimáticas: i) *aryls*, correlacionada positivamente con NT ($P < 0,05$) y con COT ($P < 0,01$), ii) *bgal*, correlacionada positivamente con COT ($P < 0,05$) y iii) *pac*, correlacionada positivamente con el COT ($P < 0,05$). Idénticamente, la ordenación del Pb se debería a sus correlaciones positivas con los óxidos de Fe-cristalino y de Mn-amorfo ($P < 0,01$ en ambas) y negativa con el NSf ($P < 0,05$), relacionándolo con las enzimas: i) *aryls*, que se correlaciona positivamente con el FeX ($P < 0,05$), ii) *bgal*, que se correlaciona positivamente con el MnA y FeX ($P < 0,05$, ambas) y iii) *ure*, que se correlaciona positivamente con MnA y FeX ($P < 0,05$, ambas) y negativamente con el NSf ($P < 0,01$).

En el biplot del grupo 1 del uso olivar, los contenidos totales de Cr, Ni y Zn son los más importantes explicativamente para el grupo 1 de enzimas (Figura 21, B.1). Las correlaciones positivas significativas obtenidas entre estos elementos traza y los óxidos, amorfos y cristalinos, de Mn y Fe podrían explicar indirectamente la ordenación ya que las enzimas de este grupo se correlacionan también con estos parámetros del suelo. En el RDA correspondiente al grupo 2 de enzimas (Figura 21, B.2), el Sn se muestra opuesto a la actividades *phos* y *pak*, pudiendo indicar un efecto inhibitorio sobre dichas actividades enzimáticas o los organismos que las producen. La ordenación del vector de Cu respecto a las actividades enzimáticas no puede ser explicada mediante relaciones indirectas con

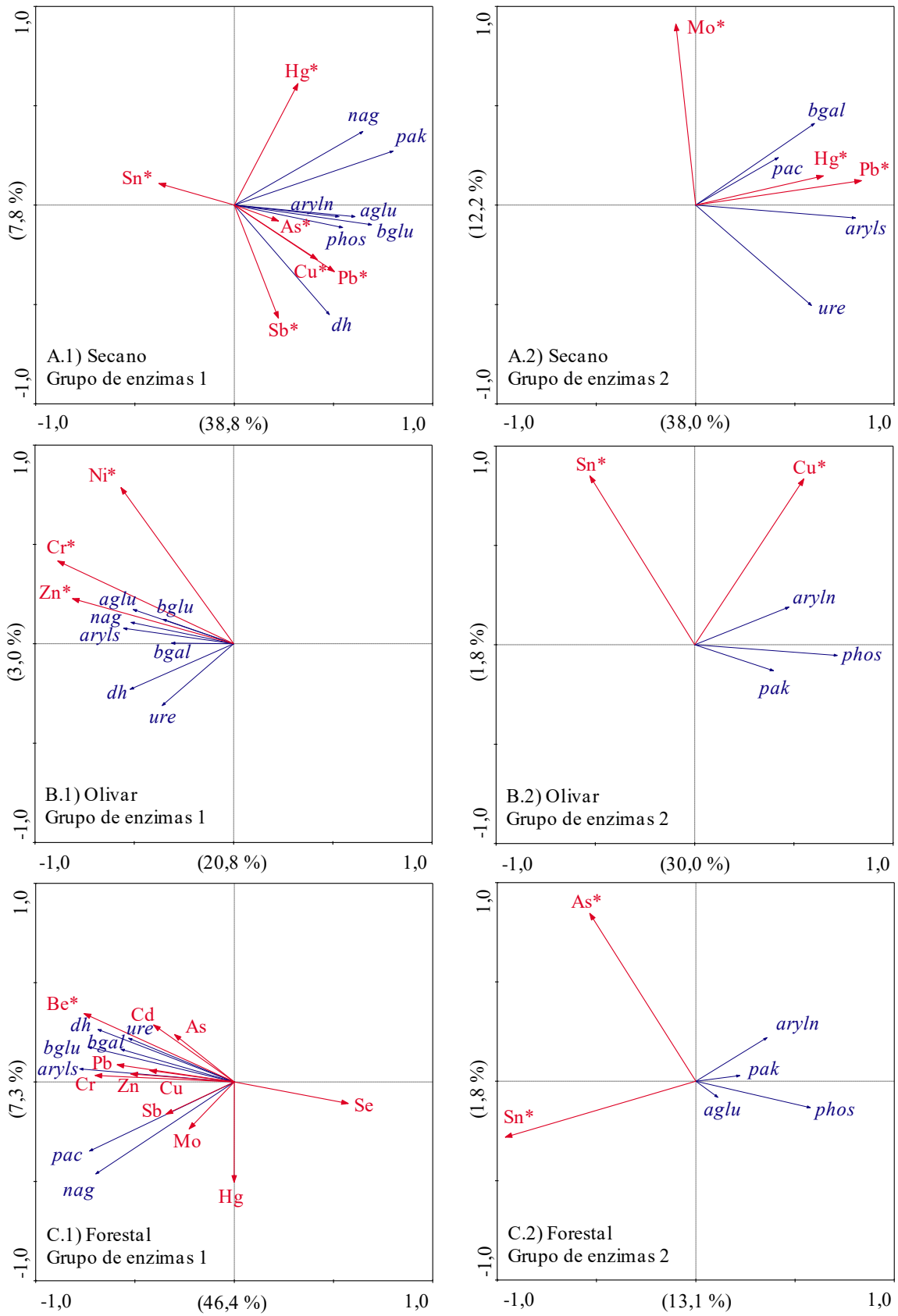


Figura 21: Biplots de las ordenaciones generadas a partir de las concentraciones totales de elementos traza (variables explicativas, en rojo) y las actividades enzimáticas (variables respuesta, en azul). Variables significativas ($P < 0,1$) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis.

parámetros del suelo, sin embargo, su posicionamiento en el biplot indica que su posible efecto sobre las enzimas de este grupo es reducido y que, en caso de existir, sería positivo.

En el uso forestal, en el RDA correspondiente al grupo 1 de enzimas (Figura 21, C.1), los vectores de las actividades enzimáticas *dh*, *ure*, *bgal*, *bglu* y *aryls* se ordenan en la misma dirección que los de los elementos traza As, Be, Cd, Cr, Cu, Pb y Zn, probablemente debido a las correlaciones de todas estas variables con los óxidos de Fe-amorfo. Por otra parte, la actividad *pac* se alinea con el Sb, acorde con las correlaciones positivas observadas entre ambos con el contenido en arcilla ($P < 0,05$ para ambas) y con los óxidos de Mn-amorfo ($P < 0,05$). Igualmente, la actividad *nag* se alinearía con el Mo por su mutua correlación con el NH_4^+ soluble ($P < 0,01$ para ambas). La presencia de Hg no influye en las actividades enzimáticas al situarse perpendicular sobre el eje 2 del biplot. Finalmente, el Se se opone a toda la ordenación indicada y tampoco presentó correlaciones indirectas con otros parámetros del suelo que permitieran una explicación. En el RDA del grupo 2 (Figura 21, C.2), As y Sn se encuentran ordenados opuestamente a las actividades enzimáticas de este grupo (*aglu*, *aryln*, *phos*, *pak*), por lo que su posición relativa podría indicar un efecto inhibitorio sobre estas enzimas. Tampoco, se han encontrado correlaciones significativas con parámetros físico-químicos del suelo que pudieran explicar de forma indirecta esta ordenación.

4.3.2.2 Concentraciones potencialmente disponible, extraídas con DTPA

En el uso seco, en la ordenación del RDA tomando como variables respuesta las actividades enzimáticas del grupo 1 (Figura 22, A.1) ninguna concentración potencialmente disponible (extraída con DTPA) ha sido identificada como variable explicativa ($P > 0,1$). Las actividades enzimáticas se posicionaron a lo largo del eje 1, mientras que los elementos traza lo hacen principalmente con el eje 2. Este patrón y la falta de significación refleja la escasa importancia de la fracción potencialmente disponible de los elementos traza de la ordenación en las actividades enzimáticas del grupo 1. En el RDA correspondiente al grupo 2 (Figura 22, A.2) las concentraciones potencialmente disponibles de As y Ni han sido identificadas como variables explicativas significativas ($P < 0,1$). Sus vectores en el biplot se encuentran orientados juntamente con las actividades enzimáticas en el eje 1 y compartiendo, además, el As y las actividades enzimáticas correlaciones con el contenido en óxidos de Mn-amorfo y Fe-cristalino. En la ordenación los vectores de Cu y al Ba muestran orientaciones opuestas a las

actividades *ure* y *pac*, respectivamente, aunque no son estadísticamente significativos, pudiendo indicar un efecto inhibitorio sobre estas enzimas. En este caso, tampoco se encontraron correlaciones significativas con parámetros físico-químicos del suelo que pudieran explicar de forma indirecta esta ordenación.

En el uso olivar, el Pb y Co han sido identificados como variables explicativas significativas ($P < 0,1$), orientados en la misma dirección que las actividades enzimáticas. Los elementos traza As, Cd, Co y Ni al igual que las actividades enzimáticas de este grupo, salvo *bgal*, muestran correlaciones negativas con el pH y/o CaCO_3 , esto daría explicación a que las variables respuesta y explicativas compartan sentido a lo largo del eje 1 del biplot. El vector asociado al contenido potencialmente disponible de Co se orientó exactamente con el vector de la actividad *ure*, esta ordenación podría indicar que este elemento traza actuase de cofactor en esta enzima sin embargo no se han encontrado referencias al respecto, por lo que la ordenación podía deberse a otros factores. El vector de Cu se orienta de forma opuesta a las actividades *ure*, *aryls*, *dh* y *bglu*, aun sin ser estadísticamente significativo, interpretándose esta ordenación como un efecto inhibitorio de este elemento traza.

En el grupo 2 del uso olivar, ninguna fracción potencialmente disponible de los elementos traza explicó de forma significativa el patrón de las actividades enzimáticas (Figura 22, B.2). La mayoría de los vectores de las fracciones potencialmente disponibles (Cu, Ba, Co, Zn, Sb y Ni) se ordenaron con las actividades enzimáticas de este grupo (*phos*, *aryln* y *pak*). Los vectores de las fracciones potencialmente disponibles de As, Cd y Pb se ordenaron de forma opuesta a *phos* y *aryln* y perpendicularmente a *pak*. En este caso, tampoco se encontraron correlaciones significativas con parámetros físico-químicos del suelo que pudieran explicar de forma indirecta esta ordenación.

En el uso forestal, la fracción potencialmente disponible de As, Zn, Cu, Se y Ni, en ese orden, explican un total del 65 % de las actividades enzimáticas del grupo 1 (Figura 22, C.1). Todas las variables explicativas alineadas en el eje 1 del biplot mostraron correlaciones indirectas con las actividades enzimáticas a través de parámetros físico-químicos. Hace excepción el Se que no muestra ninguna correlación con parámetros físico-químicos del suelo y además se alinea con el eje 2. Dichos parámetros físico-químicos fueron correlacionados positivamente los contenidos en óxidos de Fe y Mn, NT, COT, NH_4^+ , Arc y, negativamente, el pH y el contenido en CaCO_3 . Destacar que, para estas actividades enzimáticas, no se observó ningún efecto

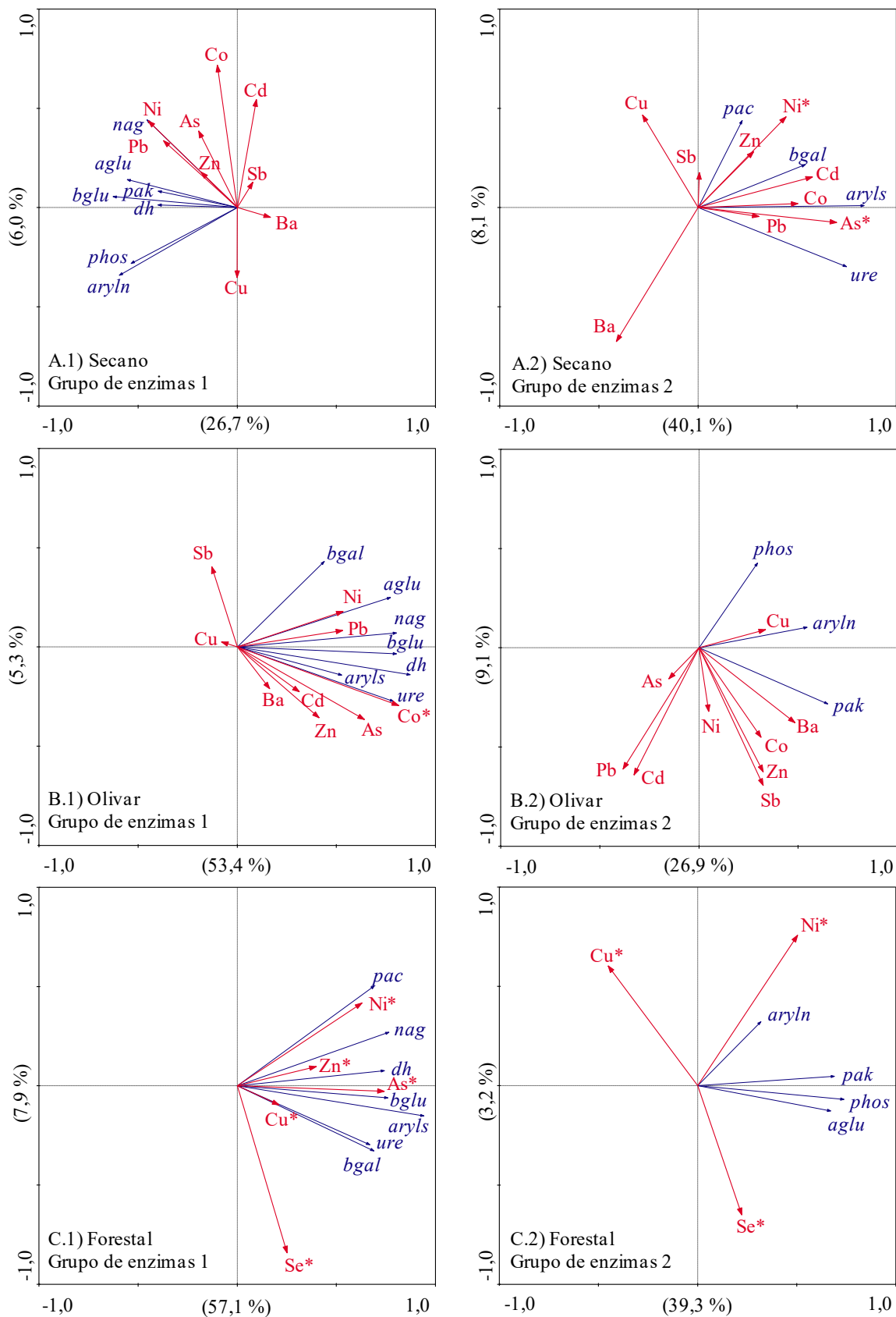


Figura 22: Biplots de las ordenaciones generadas a partir de las concentraciones potencialmente disponibles (DTPA) de elementos traza (variables explicativas, en rojo) y las actividades enzimáticas (variables respuesta, en azul). Variables significativas ($P < 0,1$) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis

negativo por parte de las fracciones potencialmente disponibles de los elementos traza analizados.

En el biplot del grupo 2 del uso forestal (Figura 22, C.2), las concentraciones potencialmente disponibles de Cu, Ni y Se fueron identificadas como variables explicativas significativas ($P < 0,1$). Las actividades enzimáticas de este grupo (*aryln*, *pak*, *phos* y *aglu*) se ordenaron opuestas al vector de Cu, y en la misma dirección que el de Ni y el Se. No se observan parámetros físico-químicos que expliquen la oposición parcial del vector de Cu a las actividades enzimáticas *aglu*, *phos* y *pak*, por lo que es posible que la fracción potencialmente disponible de este elemento produzca algún tipo de inhibición en estas enzimas en el uso forestal. En cambio, en el caso de *aryln* las concentraciones potencialmente disponibles de Cu y Ni podrían representar un papel positivo al orientarse en la misma posición en el biplot, sin embargo, serían necesario estudios posteriores para confirmarlo.

4.3.2.3 Concentraciones inmediatamente disponibles, extraídas con $CaCl_2$

En el uso seco para el grupo 1 de enzimas, ninguna fracción inmediatamente disponible de los elementos traza estudiados ha sido identificada como variable explicativa significativa ($P < 0,1$) (Figura 23, A.1). Únicamente destacar de este el biplot que el vector de Zn es el único cuya posición no puede explicarse con correlaciones indirectas entre actividades enzimáticas-propiedades/componentes del suelo, encontrándose opuesto a las actividades *aglu*, *nag* y *pak*. En el RDA correspondiente al grupo 2 de enzimas (Figura 23, A.2), el vector Zn se ha identificado como variable explicativa significativa. Su posición en el biplot opuesta a los vectores de *ure*, *pac* y *aryls* parece indicar efectos negativos de este elemento traza.

En el uso olivar, al igual que ocurría para seco en el RDA realizado con las actividades enzimáticas del grupo 1 (Figura 23, B.1) no se ha identificado ninguna fracción inmediatamente disponible como variable explicativa significativa. Teniendo en cuenta las posiciones relativas de todos los vectores en el biplot y sus correlaciones indirectas a través de los parámetros del suelo, únicamente las concentraciones inmediatamente disponibles de Cu y Zn parecen ejercer un efecto inhibitorio en las actividades enzimáticas *aglu*, *bglu*, *dh*, *nag*, *ure* y *aryls*. En el caso del grupo 2 (Figura 23, B.2) la fracción de As inmediatamente disponible ha sido la única identificada como variable explicativa significativa ($P < 0,1$), pudiendo indicar una inhibición de las actividades enzimáticas *aryln*, *phos* y *pak* por este elemento.

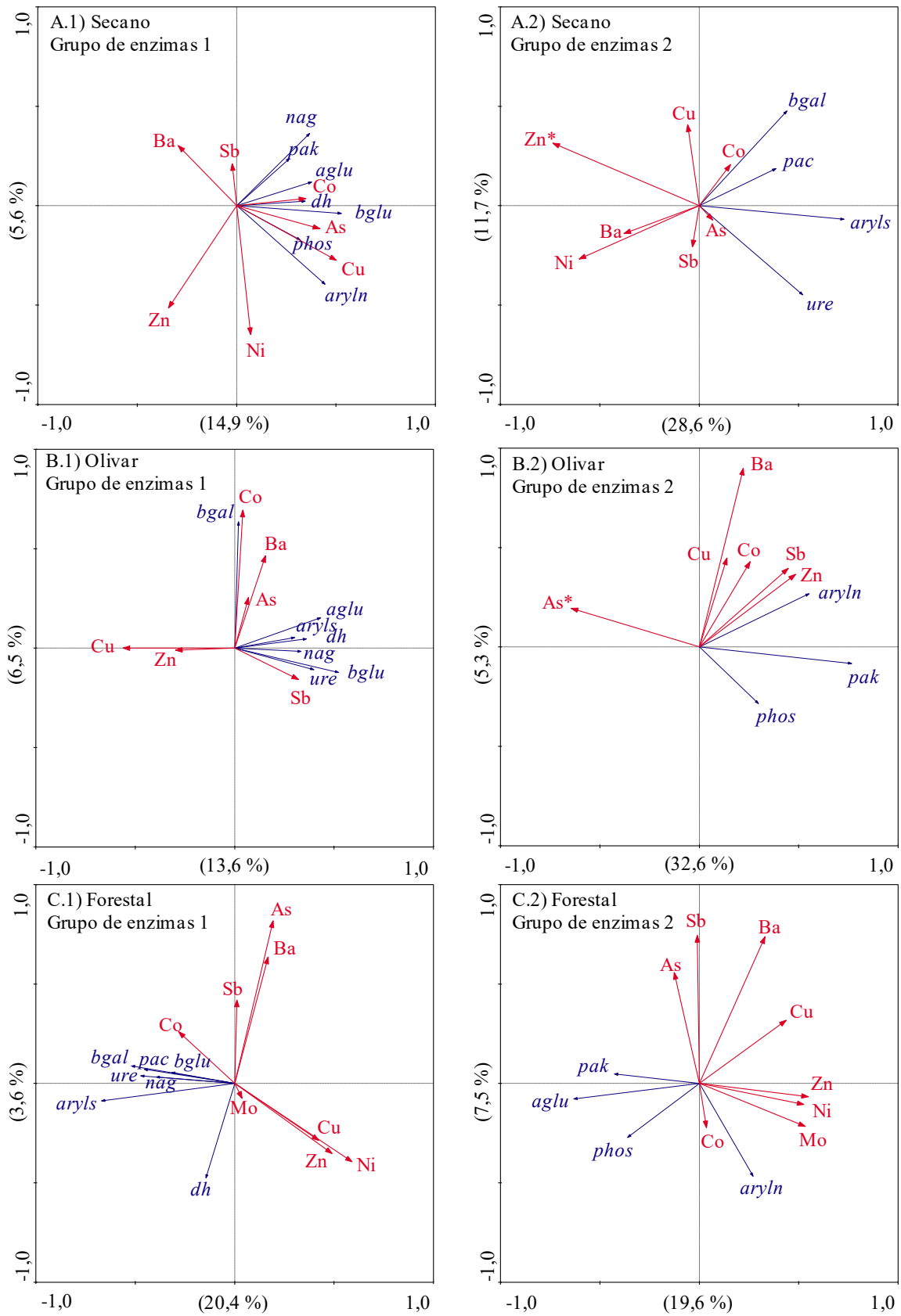


Figura 23: Biplots de las ordenaciones generadas a partir de las concentraciones inmediatamente disponibles (CaCl_2) de elementos traza (variables explicativas, en rojo) y las actividades enzimáticas (variables respuesta, en azul). Variables significativas ($P < 0,1$) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis.

Los RDA realizados en el uso forestal, para ambos grupos 1 y 2 de actividades enzimáticas, no mostraron ninguna fracción inmediatamente disponible estadísticamente significativa ($P < 0,1$) (Figura 23, C.1 y C.2). La posición de los vectores de los elementos traza en los dos biplots, se deben a las correlaciones indirectas con parámetros del suelo, especialmente con el NT y el COT, o con correlaciones entre los propios elementos traza. Por todo esto, no se han identificado efectos inhibitorios de las concentraciones inmediatamente disponibles de los elementos traza analizados en este uso sobre las actividades enzimáticas.

4.3.2.4 Regresiones lineales de las actividades enzimáticas no agrupadas

Las actividades enzimáticas fenoloxidasa, (*phe*), de los tres usos, y fosfatasa ácida (*pac*) del uso olivar no se emplearon en el RDA al no haber formado parte de ninguno de los grupos de enzimas obtenidos en el análisis de redes, grupos 1 y 2, dado que no mostraron correlaciones positivas con el resto de enzimas. Para estudiar la posible influencia de los parámetros físico-químicos del suelo y de los distintos índices de disponibilidad empleados en estas actividades enzimáticas se ha llevado a cabo una serie de regresiones lineales. Las variables independientes fueron los parámetros e índices indicados, mientras que las variables dependientes fueron la actividad *phe* de los tres usos y la actividad *pac* del uso olivar. En la Tabla 15 se recogen las ecuaciones generadas mediante las regresiones lineales, así como el nivel de significancia y el R^2 ajustado de los modelos obtenidos.

La actividad *phe* se encuentra muy relacionada positivamente en los tres usos con el pH o con el contenido en carbonato, al contrario que el resto de enzimas que tendían a mostrar relaciones negativas con estos parámetros del suelo. Sin embargo, otros parámetros físico-químicos del suelo interaccionan con esta enzima: i) en el uso olivar el contenido en arcilla podría indicar la adsorción de esta enzima en la fracción mineral (Burns, 1982) y el signo negativo del Pas pondría de manifiesto el efecto inhibitorio de este parámetro sobre la *phe*, y ii) en el uso forestal se relaciona positivamente con el COT, situación lógica puesto que la *phe* es la encargada de degradar compuestos fenólicos y en el caso del uso forestal es de esperar su presencia en restos vegetales.

Tabla 15: Regresiones lineales significativas realizadas con las actividades enzimáticas fenoloxidasas (*phe*), para los tres usos, y fosfatasa ácida, para el uso olivar, analizados como variables dependientes y los parámetros físico-químicos del suelo, las concentraciones totales, potencial (DTPA) e inmediatamente (CaCl_2) disponibles de los elementos traza como variables independientes.

Variables independientes	Uso	Ecuación de la regresión	Significancia	R ² ajustado
Parámetros físico-químicos del suelo	Secano	$phe = 0,028 \text{ CaCO}_3 + 0,087$	0,002	0,482
	Olivar	$phe = 0,194 \text{ pH} + 0,164 \text{ Arc} - 0,061 \text{ Pas} - 1,672$	0,000	0,778
		$pac = -0,104 \text{ pH} + 104 \text{ COT/NT} + 0,713$	0,004	0,566
	Forestal	$phe = 0,069 \text{ COT} + 0,169 \text{ pH} - 1,514$	0,000	0,726
Totales	Secano	$phe = -$	-	-
	Olivar	$phe = 0,135 \text{ Cu} - 0,037 \text{ Se} - 0,172$	0,012	0,44
		$pac = -0,112 \text{ Be} + 0,154$	0,002	0,51
	Forestal	$phe = -$	-	-
DTPA	Secano	$phe = -1,709 \text{ As} + 0,216$	-	-
	Olivar	$phe = -2,521 \text{ As} + 6,983 \text{ Cd} + 0,139$	0,000	0,617
		$pac = 0,931 \text{ Ni} - 0,037$	0,002	0,467
	Forestal	$phe = -$	-	-
CaCl ₂	Secano	$phe = -$	-	-
	Olivar	$phe = 43,076 \text{ Sb} + 0,115$	0,025	0,349
		$pac = -$	-	-
	Forestal	$phe = -$	-	-

En lo que respecta a la *pac* del uso olivar está influida negativamente por el pH, posiblemente a causa de su propio pH óptimo que se sitúa en 5,5 alejada casi tres puntos del pH que muestran estos suelos (8,23), además el entorno más ácido de la rizosfera promueve la actividad de la *pac*. La relación COT/NT ejerce una influencia positiva, a través del contenido en carbono orgánico por los radicales ácidos de éste.

Teniendo en cuenta los contenidos totales de los elementos traza, únicamente la *phe* del uso olivar ha mostrado un modelo significativo, apareciendo el Cu de forma positiva y el Se de forma negativa. Se observa una influencia positiva del Cu sobre la actividad *phe*. El Se refleja un efecto inhibitorio sobre la *phe* y, dada la correlación negativa entre el Se y el CaCO_3 ($P < 0,05$) éste efecto inhibitorio sería más pronunciado en los suelos con menor contenido en carbonato. Para la *pac* del uso olivar, el modelo muestra una influencia negativa del Be,

posiblemente debido a la correlación negativa de este elemento traza con el COT/NT ($P < 0,05$), al contrario que en el modelo obtenido con los parámetros físico-químicos del suelo (párrafo anterior).

Los contenidos potencialmente disponibles de As en los usos secano y olivar han mostrado una influencia inhibitoria sobre la *phe*, que es tanto más intensa cuanto menor es el contenido en carbonato de los suelos. La influencia positiva del Cd obtenida en el modelo de regresión de la *phe* en el uso olivar se podría explicar porque la formación de complejos entre el Cd y la materia orgánica, especialmente con ácidos húmicos, se favorece a medida que aumenta el pH del suelo (Kabata-Pendias y Mukherjee, 2007). En la regresión lineal de la *pac* del uso olivar la fracción potencialmente disponible de Ni mostró un signo positivo, que podría explicarse por el mismo mecanismo que en el caso del Cd (Kabata-Pendias y Mukherjee, 2007)

Por último, en el uso olivar el contenido inmediatamente disponible de Sb se relacionó positivamente en el modelo de regresión con la *phe*. Posiblemente a través de su unión a óxidos de Fe-Mn y la materia orgánica (Kabata-Pendias y Mukherjee, 2007).

4.3.2.5 Discusión sobre las relaciones encontradas entre actividades enzimáticas y elementos traza

Para facilitar la interpretación de los resultados se ha procedido a analizar individualmente cada elemento traza identificado que pueda ejercer algún tipo de efecto inhibitorio sobre las actividades enzimáticas analizadas. En la Tabla 16 se recogen los correspondientes elementos traza, su disponibilidad en función del extractante empleado y las actividades que pueden resultar afectadas.

Arsénico

El As se encuentra principalmente como arseniato (As(V)) o como arsenito (As(III)), el primero en condiciones óxicas y el segundo en anóxicas. Las formas de As más móviles son AsO_2^- , AsO_4^{3-} , HAsO_4^{2-} , H_2AsO_3^- , sin embargo, no son móviles al encontrarse fijados entre valores de pH de 7 y 9 (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). El As parece afectar negativamente a varias actividades enzimáticas en los usos olivar y forestal. Así, las actividades enzimáticas del uso forestal *aglu*, *aryln*, *phos* y *pak* parecen estar afectadas por la concentración total de As, mientras que en el uso olivar la concentración potencialmente disponible afecta a la *phos* y la concentración

inmediatamente disponible a *aryIn*, *phos* y *pak*. Welp (1999) estudiando la toxicidad de varios elementos traza sobre la actividad enzimática deshidrogenasa situó al As en el puesto 8 de 10. Varios autores han estudiado cómo afecta la presencia de As en las actividades enzimáticas del suelo. Eivazi y Tabatabai (1990) estudiaron el efecto inhibitorio del As, observando una reducción de la actividad enzimática α -glucosidasa (entre un 13 y un 25 %), β -glucosidasa (entre un 10 y 11 %) y β -galactosidasa (entre un 18 y un 60 %). Xian et al. (2015) analizando la respuesta de varias actividades enzimáticas frente a Pb, Cd y As determinaron que la arilsulfatasa es la actividad más sensible a la presencia de estos metales.

En nuestros suelos parece que la actividad enzimática fosfatasa es la más sensible al As, al encontrarse en todos los RDA donde se ha interpretado un posible efecto inhibitorio del As sobre las actividades enzimáticas. Esta influencia negativa sobre la fosfatasa puede deberse a un efecto tóxico directo o, bien, a la desorción del fosfato presente en los óxidos de hierro que sería desplazado por el As (Codling y Dao, 2007) liberando el fosfato al medio implicando una menor actividad fosfatasa. Las correlaciones positivas significativas entre la concentración total de As y FeA ($P < 0,01$) en el uso forestal y entre su fracción potencialmente disponible y FeX ($P < 0,01$) en el uso olivar podrían apoyar esta interpretación.

Bario

El Ba se encuentra de forma natural como Ba(II) formando sulfatos (baritina, BaSO_4), siendo el elemento más eficiente para el intercambio catiónico ya que desplaza al resto de elementos de las posiciones de cambio (Hooda, 2013). Se trata de uno de los elementos traza menos analizado. Recientemente se estudió su efecto positivo sobre la celulosa y la actividad esterasa (Muñoz-Rojas et al., 2016). Sin embargo, ha mostrado efectos tóxicos sobre *Lactuca sativa* y *Eisenia fetida* (Lamb et al., 2013). En nuestro estudio la concentración potencialmente disponible de Ba en el uso de secano parece afectar negativamente a la fosfatasa ácida, sin embargo, no se han encontrado en la literatura referencias que muestren esta relación ni correlaciones con otros elementos traza o parámetros del suelo en nuestro estudio. Una posible explicación podría darse teniendo en cuenta la capacidad del Ba de desplazar compuestos de las posiciones de cambio, siendo posible que desplace a compuestos de fósforo de las posiciones de cambio y éstos pasen a estar más fácilmente disponibles para las raíces (principales productoras de fosfatasa ácida), por lo que reducirían la generación de

fosfatasa ácida. No obstante, sería necesario un estudio posterior para confirmar esta hipótesis.

Tabla 16: Resumen de los elementos traza analizados en los RDA y las actividades enzimáticas a las cuales pueden estar afectando. (*) identifica a las variables explicativas significativas ($P < 0,1$).

Concentraciones de elementos traza	Uso	Elementos traza identificados	Actividades enzimáticas identificadas
Total	Secano	Sn*	<i>aglu, bglu, aryln, phos</i>
		Mo*	<i>ure</i>
	Olivar	Sn*	<i>phos, pac</i>
		Se	<i>phe</i>
Potencialmente disponible (DTPA)	Forestal	As*, Sn*	<i>aglu, aryln, phos, pak</i>
		Cu	<i>ure, nag</i>
	Secano	Ba	<i>pac</i>
		As	<i>phe</i>
Inmediatamente disponible (CaCl ₂)	Olivar	Cu	<i>ure, aryls, dh</i>
		As	<i>phe</i>
	Forestal	As, Cd, Pb	<i>phos, aryln</i>
		Cu*	<i>aglu, phos, pak</i>
Inmediatamente disponible (CaCl ₂)	Secano	Zn*	<i>bgal, aglu, aryls, nag, ure, pac, pak</i>
		Cu	<i>ure</i>
	Olivar	As*	<i>aryln, pak, phos</i>
		Cu, Zn	<i>aglu, bglu, dh, aryls, nag, ure</i>
Forestal	-	-	

Cadmio y Plomo

El Cd y el Pb son de los elementos traza más tóxicos en todos los compartimentos del medio ambiente. Se han agrupado puesto que geoquímicamente tienen algunas características semejantes y por el hecho de afectar a las mismas actividades enzimáticas, *phos* y *aryln*, y en el mismo uso, olivar. El Cd en el suelo suele aparecer como Cd²⁺, y en suelos carbonatados tiende a precipitar dependiendo su solubilidad principalmente del pH (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). El Pb en el suelo suele aparecer como Pb²⁺, correlacionándose con el contenido en arcillas, con los óxidos de Mn y Fe y la materia orgánica, pudiendo también

formar carbonatos (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). El Cd puede formar complejos con el Cl mejorando su movilidad y disponibilidad, y por tanto, facilitando su absorción por parte de la vegetación (Geilfus, 2019; Hooda, 2013; Ishikawa et al., 2015); al igual que puede ocurrir con el Pb (Hahne y Kroontje, 1973).

El Cd y el Pb inhiben las actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del carbono α -glucosidasa, β -glucosidasa, β -galactosidasa (Eivazi y Tabatabai, 1990); el Cd también inhibe las relacionadas con el ciclo del N como la arilamidasa (Acosta-Martínez y Tabatabai, 2001); ambos inhiben la ureasa (Nourbakhsh y Monreal, 2004; Wieczorek et al., 2015; Wyszowska et al., 2006; Yang et al., 2006); ambos también afectan al ciclo del P inhibiendo la fosfatasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina (Martin Calvarro et al., 2014; Renella et al., 2003; Wyszowska et al., 2006).

Las fracciones potencialmente disponibles de Cd y Pb, en el uso olivar de nuestro estudio, se encuentran positivamente correlacionados con los óxidos de Fe-cristalino ($P < 0,01$) indicativo de que estos óxidos juegan un papel determinante en la retención potencial de estos elementos, reduciendo el efecto de estos elementos sobre las actividades enzimáticas.

Cobre

El cobre puede presentarse con dos números de oxidación (+I, +II), en los suelos no anegados se encontrará como Cu(II) y muy relacionado con el contenido en materia orgánica y los óxidos de Fe y Mn (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Es un micronutriente esencial para la vida, sin embargo, en altas concentraciones es altamente tóxico. Forma parte de los núcleos metálicos de algunas enzimas como la polisulfuro-reductasa (Wittershagen et al., 1997) y la superóxido-dismutasa (Rae et al., 1999). En el estudio realizado por Eivazi & Tabatabai (1990) el Cu(II) inhibía la actividad de la enzima α -glucosidasa entre el 25-49 %, la β -glucosidasa entre el 6 y el 10 % y la β -galactosidasa entre el 21 y el 46 %. Welp (1999) determinó y ordenó la toxicidad para la biomasa microbiana de 10 elementos traza a partir de sus efectos sobre la actividad deshidrogenasa, el Cu ocupaba el segundo puesto como elemento más tóxico sólo detrás del Hg. La presencia de otros elementos, como el Pb, podría reducir la toxicidad del Cu al competir por los lugares de adsorción llegando incluso a estimular ciertas actividades enzimáticas como la deshidrogenasa y ureasa como demostraron Chaperon y Sauvé (2008).

En nuestro estudio la concentración potencialmente disponible de Cu (extraída con DTPA) en el uso de secano podría afectar a las actividades ureasa y N-acetil-glucosaminidasa, en el uso olivar a la ureasa, y en el uso forestal afectaría a las actividades enzimáticas α -glucosidasa, fosfatasa y fosfatasa alcalina.

Respecto a la fracción inmediatamente disponible de Cu (extraída con CaCl_2), podrían verse afectadas la actividad ureasa en el uso de secano, y las actividades α -glucosidasa, arilamidasa, deshidrogenasa, N-acetil-glucosaminidasa, β -glucosidasa y ureasa en el uso olivar. Por tanto, el contenido potencialmente disponible e inmediatamente disponible de Cu parece afectar a las actividades enzimáticas, especialmente a la ureasa en los usos de cultivo (secano y olivar). Cabe indicar que los valores de Cu potencialmente disponible en los usos de secano y olivar eran estadísticamente superiores a los del uso forestal. En este contexto, Wieczorek et al. (2015) estudiando la sensibilidad de la ureasa frente a distintos elementos traza (Zn, Cu, Cd, Pb, Ni) estableció que el Cu era uno de los elementos traza que más afectaba a la ureasa. Wyszowska et al. (2017) al evaluar la sensibilidad de las actividades ureasa, deshidrogenasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina frente a la adición de Cu(II), observó que las actividades ureasa y deshidrogenasa eran las más sensibles a dicho elemento.

Estaño

La distribución de Sn en el suelo y sus efectos sobre los microorganismos no ha recibido mucha atención, siendo escasos los trabajos publicados sobre los efectos del Sn sobre las actividades enzimáticas en los suelos. Eivazi & Tabatabai (1990), analizando la inhibición producida por elementos traza en glucosidasas, comprobaron cómo el Sn producía una inhibición entre el 16-28 % en la α -glucosidasa, entre el 7-15% en la β -glucosidasa y entre un 16-54% en la beta-galactosidasa. Acosta-Martínez & Tabatabai (2001) comprobaron que añadiendo 5 $\mu\text{mol/g}$ de suelo de Sn, es decir 593,55 mg/kg, se producía una inhibición entre 19-37 % de la actividad arilamidasa.

Aun siendo las concentraciones totales en los suelos de estudio inferiores a las indicadas por estos autores, <2 mg/kg, es posible que el Sn se encuentre en los suelos mayoritariamente bajo orgánica, mucho más tóxica que la forma inorgánica (Boyer, 1989), especialmente en el uso de secano donde se relacionó positivamente con el COT en el RDA, pudiendo ejercer un efecto inhibitorio sobre los microorganismos del suelo (Paton et al., 2006).

Molibdeno

El Mo es un elemento traza distinto al resto, al aumentar el pH aumenta su solubilidad, al unirse con radicales OH^- encontrándose en suelos básicos bajo la forma de ión MoO_4^{2-} , y es un nutriente esencial en el desarrollo de animales y plantas, especialmente en el metabolismo del N. En el suelo se encuentra adsorbido a los óxidos de Fe y arcillas (Goldberg et al., 1996). Acosta-Martínez & Tabatabai (2001), estudiando el efecto que ejercían una serie de elementos traza sobre la actividad enzimática arilamidasa, mostraron que el Mo(VI) podía actuar como activador de la arilamidasa en muestras de suelo secadas al aire pero que, sin embargo, inhibía entre un 7-40 % la actividad de dicha enzima en muestras con la humedad de campo. En los suelos de este estudio la concentración total de Mo parece afectar negativamente a la actividad enzimática ureasa en el uso de secano. El Mo forma parte de las enzimas nitrogenasa, gracias a la cual se fija el N atmosférico al suelo, y nitrato reductasa, a través de la cual tanto plantas como microorganismos, hongos y bacterias, transforman el NO_3^- a NO_2^- para después obtener NH_4^+ para la generación de aminoácidos (Gupta y Lipsett, 1981; Marschner, 2012), mientras que la ureasa cataboliza la reacción de urea a NH_4^+ . Existe la posibilidad de que la relación opuesta entre Mo y *ure* se deba a que ambos se relacionan, por diferentes mecanismos, para obtener NH_4^+ y por tanto se autoexcluyan, es decir, si la planta o los microorganismos obtienen NH_4^+ a partir de la ureasa no necesitan generarlo a partir de la nitrogenasa o nitrato reductasa, procesos más complicados que requieren una mayor cantidad de pasos intermedios.

Selenio

El Se se encuentra en suelos neutros bajo la forma de selenito $\text{Se}(4+)$ estando fuertemente unido con óxidos de Fe y con materia orgánica, a pH alcalinos se encuentra como selenato $\text{Se}(6+)$ siendo más móvil al no absorberse por los óxidos de Fe o materia orgánica (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Este elemento traza es un micronutriente esencial para plantas, animales y el ser humano, pero que, sin embargo, puede ser tóxico a altas concentraciones (Brodowska et al., 2016). Respecto a cómo influye en las actividades enzimáticas del suelo las referencias bibliográficas son escasas, reduciéndose, por lo general, al estudio de la función del Se en la respuesta enzimática de la peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa frente al estrés oxidativo (Gomes et al., 2007; Yao et al., 2010). No se han encontrado referencias

acerca de la inhibición de la fenoloxidasa a causa de la presencia de Se, tal y como ocurre en este estudio.

Zinc

La disponibilidad de Zn(2+) en el suelo depende principalmente del contenido en arcilla, de la presencia de óxidos de Fe y Mn, y de la materia orgánica, con la cual puede formar complejos muy estables (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Es un micronutriente esencial y participa en la actividad de muchas enzimas como la fosfatasa alcalina, la anhidrasa carbónica, la alcohol-deshidrogenasa, la superóxido-dismutasa, la ARN-polimerasa, además de activar y regular el funcionamiento de otras enzimas (Marschner, 2012). A pesar de su importancia como nutriente, en cantidades excesivas puede ser tóxico. Eivazi & Tabatabai establecieron que el Zn reducía la actividad de la α -glucosidasa entre un 50-54 %, de la β -glucosidasa un 6-14 % y de la β -galactosidasa un 32-52 %. Coppolecchia et al. (2011) indicaron que la β -galactosidasa es una de las enzimas más sensibles a este elemento. El Zn también puede afectar a la ureasa (Wieczorek et al., 2015; Wyszowska et al., 2006; Yang et al., 2006), deshidrogenasa, arilsulfatasa, fosfatasa ácida, y fosfatasa alcalina (Coppolecchia et al., 2011; Wyszowska et al., 2006).

En los suelos estudiados, la fracción inmediatamente disponible de Zn parece afectar en los usos secano y olivar a las actividades *aglu*, *aryls*, *nag* y *ure*; en el uso secano, además, a las actividades *bgal*, *pac* y *pak*; y el uso olivar, además de las indicadas en primer lugar, a las actividades *bglu* y *dh*.

4.4. Perfil catabólico a nivel comunidad en función del uso del suelo

4.4.1 Color medio de pozo (AWCD), riqueza (S) e índices de biodiversidad

En la Tabla 17 se recogen los valores medios de los distintos parámetros obtenidos en el análisis de las placas Biolog EcoPlate: el color medio de pozo (AWCD, por sus siglas en inglés, *Average Well Color Development*), ratio de crecimiento de la curva de color medio de pozo (rAWCD), área debajo de la curva de color medio de pozo (aAWCD), riqueza (S), tiempo medio de la curva de color medio de pozo (t_mid), índice de biodiversidad de Simpson (D) e índice de biodiversidad de Shannon (H').

Tabla 17: Valores medios \pm desviación típica de: color medio de pozo (AWCD), ratio de crecimiento de la curva de color medio de pozo (rAWCD), área debajo de la curva de color medio de pozo (aAWCD), riqueza (S), tiempo medio de la curva de color medio de pozo (t_mid), índice de biodiversidad de Simpson (D) e índice de biodiversidad de Shannon (H'). Distintas letras indican diferencias significativas entre usos ($P < 0,05$).

Uso	AWCD	rAWCD ($\times 10^{-4}$)	aAWCD	S	t_mid (min)	D	H'
Secano	1,0 \pm 0,1 a	7,8 \pm 1,1 ab	5200 \pm 930 a	28 \pm 1 a	4276 \pm 398 ab	0,959 \pm 0,002 a	3,29 \pm 0,03 a
Olivar	0,9 \pm 0,1 b	7,7 \pm 1,5 b	4376 \pm 1158 b	27 \pm 1 a	4479 \pm 537 a	0,957 \pm 0,003 b	3,25 \pm 0,05 b
Forestal	1,0 \pm 0,2 ab	9,1 \pm 1,9 a	5476 \pm 1157 a	27 \pm 3 a	4036 \pm 550 b	0,958 \pm 0,005 ab	3,26 \pm 0,09 ab

El color medio de pozo (AWCD) muestra diferencias significativas entre los usos secano y olivar (Figura 24 y Tabla 17). Probablemente la mayor diversidad vegetal del uso forestal (Myers et al., 2010) sea la responsable de la mayor desviación típica del AWCD de este uso con respecto a los usos de cultivo, los cuales están sujetos a monocultivo. Por ello, a pesar de tener un valor de AWCD en forestal similar al uso de secano, no se muestran diferencias estadísticamente significativas con el AWCD del uso olivar.

El ratio de crecimiento de la curva del AWCD (rAWCD) es significativamente superior en el uso forestal y menor en el olivar, mientras que el uso de secano no muestra diferencias significativas con estos usos. El tiempo en el que la curva del AWCD alcanza la mitad de su valor asintótico modelizado (t_mid) es superior en el uso olivar e inferior en el forestal. El área bajo la curva del AWCD (aAWCD) es mayor en los usos forestal y secano, y menor en el uso olivar. La cantidad de pozos positivos o riqueza (S) no difiere entre usos. Se calcularon los índices de biodiversidad funcional de Simpson (D) y de Shannon (H'), para ambos el uso de secano muestra mayores valores, el uso olivar menores y el uso forestal similar a ambos usos.

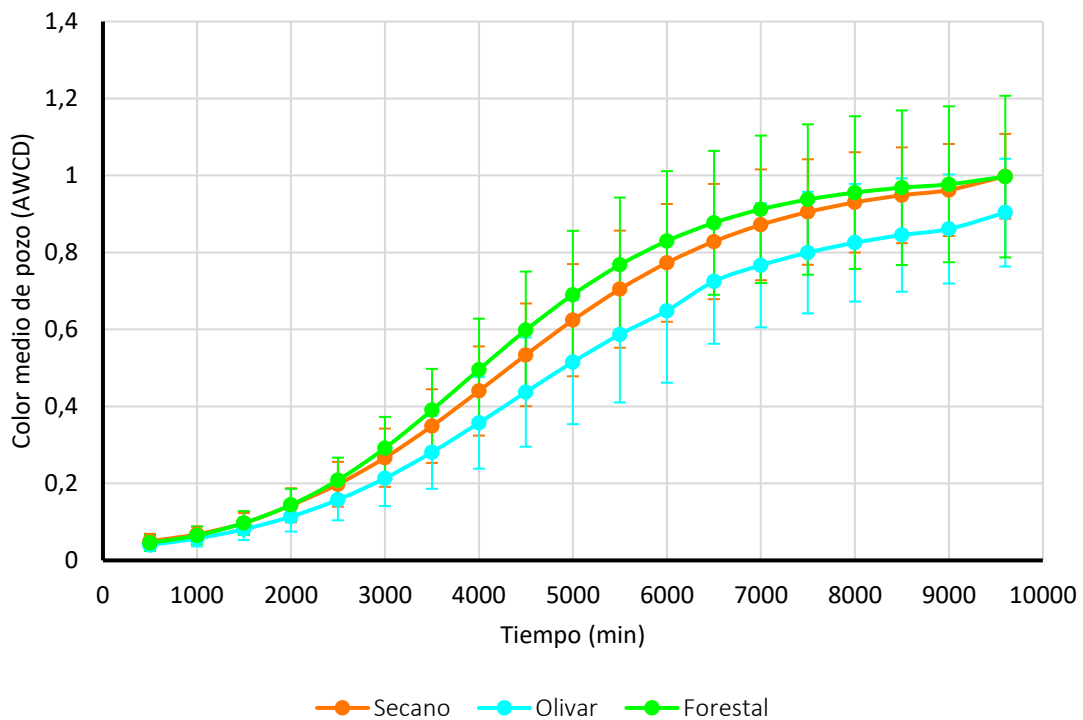


Figura 24: Color medio de pozo (Average Well Color Development, AWCD) de los tres usos estudiados a lo largo del tiempo de incubación

En la literatura existen discrepancias en el efecto que produce el cultivo del suelo, en especial el labrado, en las comunidades microbianas. Se han relacionado los suelos de cultivo con pérdidas en la biodiversidad de especies, en la biodiversidad funcional y en la capacidad catabólica de las comunidades bacterianas (Chaer et al., 2009; Degens et al., 2000; Diosma et al., 2006; Lupwayi et al., 1998; Manoharan et al., 2017; Nsabimana et al., 2004). Sin embargo, otros autores no han observado diferencias en el AWCD entre suelos cultivados y naturales (Bissett et al., 2011), ni entre suelos agrícolas bajo manejos convencionales o más sostenibles (Sofo et al., 2019), incluso se han observado mayores valores de H' y AWCD en suelos bajo manejo convencional respecto a manejo reducido (Janusauskaite et al., 2013). Posiblemente el labrado del suelo ejerza más de un efecto sobre la población microbiana, y en especial en la bacteriana, puesto que: i) provoca una mayor oxidación de la MO reduciendo la fuentes de carbono más fácilmente disponibles, ii) aumenta la aireación del suelo facilitando la presencia de oxígeno en los poros (Kainiemi et al., 2016) y iii) modifica la propia comunidad microbiana si el labrado es recurrente en el tiempo (Calderón et al., 2000). Por tanto, es posible que en los suelos estudiados, tras su uso continuado, las poblaciones bacterianas se hayan modificado taxonómicamente reduciendo su biodiversidad, pero sin encontrarse influida su biodiversidad funcional (Sofo et al., 2019).

4.4.2 Diferencias en la utilización de sustratos y de grupos de sustratos de carbono entre usos

Existen diferencias significativas en la capacidad de catabolizar determinados sustratos por las comunidades bacterianas de los distintos usos (Figura 25 y Tabla 18): i) el carbohidrato i-eritritol (C2) es catabolizado mejor por las comunidades bacterianas de los usos forestal y seco; ii) los ácidos carboxílicos D-galacturónico (B3) y D-málico (H3) son catabolizados mejor por la comunidad bacteriana de los usos de cultivo, existiendo también diferencias significativas entre los cultivos en el caso del H3, siendo superior en el uso olivar; iii) el aminoácido L-treonina (E4) es catabolizado mejor en el uso olivar y peor en el uso forestal, y el glicil-L-glutámico (F4) es catabolizado mejor en el uso de seco, seguido del forestal y por último del olivar; y iv) entre los sustratos de C identificados como polímeros el tween 40 (C1) es catabolizado mejor en el uso olivar, seguido del forestal y por último del seco.

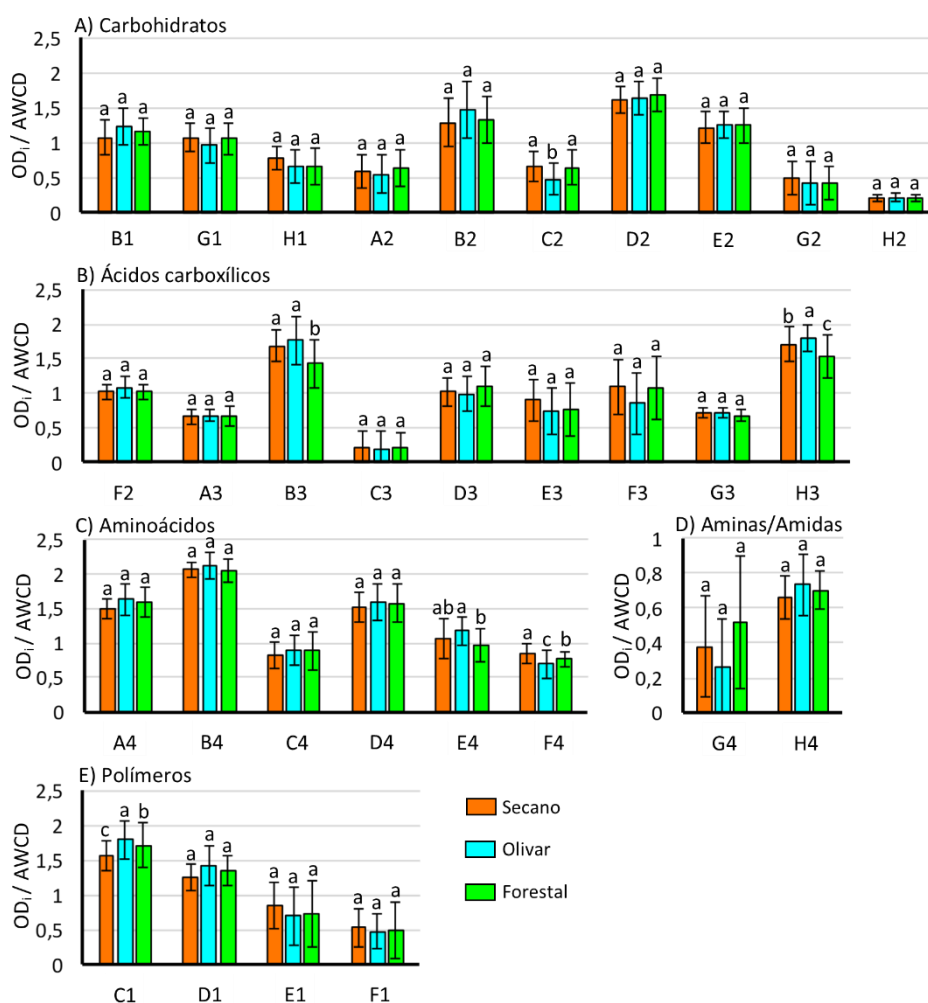


Figura 25: Valores medio \pm desviación típica de la densidad óptica (OD) de cada sustrato de la placa Biolog EcoPlate normalizados por el color medio de pozo (AWCD), agrupados en función del grupo funcional de carbono al que pertenecen. Distintas letras indican diferencias significativas entre usos ($P < 0,05$).

Tabla 18: Grupos de los sustratos de carbono de las placas Biolog EcoPlate

Grupos de los sustratos de carbono de las placas Biolog EcoPlate	
Carbohidratos (CH)	Aminoácidos (aas)
B1 Ácido ester metil pirúvico	A4 L-Arginina
G1 D-Celobiosa	B4 L-Asparagina
H1 α -D-Lactosa	C4 L-Fenilalanina
A2 β -metil-D-Glucósido	D4 L-Serina
B2 D-Xilosa	E4 L-Treonina
C2 i-Eritritol	F4 Ácido glicil-L-glutámico
D2 D-Manitol	
E2 N-Acetil-D-glucosamina	Aminas/Amidas (AmAm)
G2 Glucosa-1-fosfato	G4 Feniletilamina
H2 D,L- α -glicerol fosfato	H4 Putrescina
Ácidos carboxílicos (AcC)	Polímeros (Pol)
F2 Ácido D-glucosamínico	C1 Tween 40
A3 Ácido D-galactónico, gamma-lactona	D1 Tween 80
B3 Ácido D-galacturónico	E1 α -Ciclodextrina
C3 Ácido 2-hidroxi-benzoico	F1 Glucógeno
D3 Ácido 4-hidroxi-benzoico	
E3 Ácido γ -amino-butírico	
F3 Ácido itacónico	
G3 Ácido α -keto-butírico	
H3 Ácido D-málico	

Teniendo en cuenta los porcentajes de utilización de los funcionales, existen algunas diferencias significativas (Figura 26): i) ácidos carboxílicos, superior en los usos de cultivo (secano y olivar) respecto al forestal, y ii) carbohidratos y aminas/amidas, superiores en el uso forestal y menores en el uso olivar, mientras que el uso de secano muestra una capacidad intermedia. Estos resultados se encuentran en consonancia con los obtenidos por otros autores. Así, Chaer et al. (2009), analizando la respuesta de la población bacteriana a sucesivos labrados estableció que a mayor labranza se produce un aumento en el porcentaje de utilización de ácidos carboxílicos y polímeros, a la vez que un descenso en el porcentaje de utilización de carbohidratos y aminas/amidas. Rutgers et al. (2016) analizaron las

comunidades bacterianas de distintos suelos de Europa y concluyeron que una mayor utilización de ácidos carboxílicos se relacionaba con suelos bajo manejo agrícola. La mayor capacidad de la comunidad microbiana en la degradación de carbohidratos parece estar ligada a la presencia de cubierta vegetal permanente en pastizales (van Eekeren et al., 2008) por lo que podría, junto a la reducción de la cantidad de carbohidratos en los usos de cultivo por acción del labrado (Llorente et al., 2017), explicar las diferencias en los porcentajes de utilización de estos grupos de carbono entre los suelos de cultivo y forestal de este estudio.

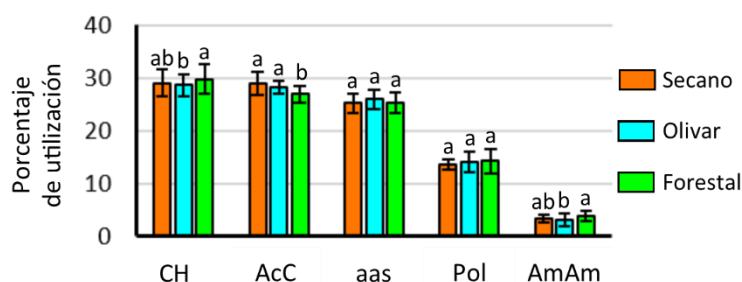
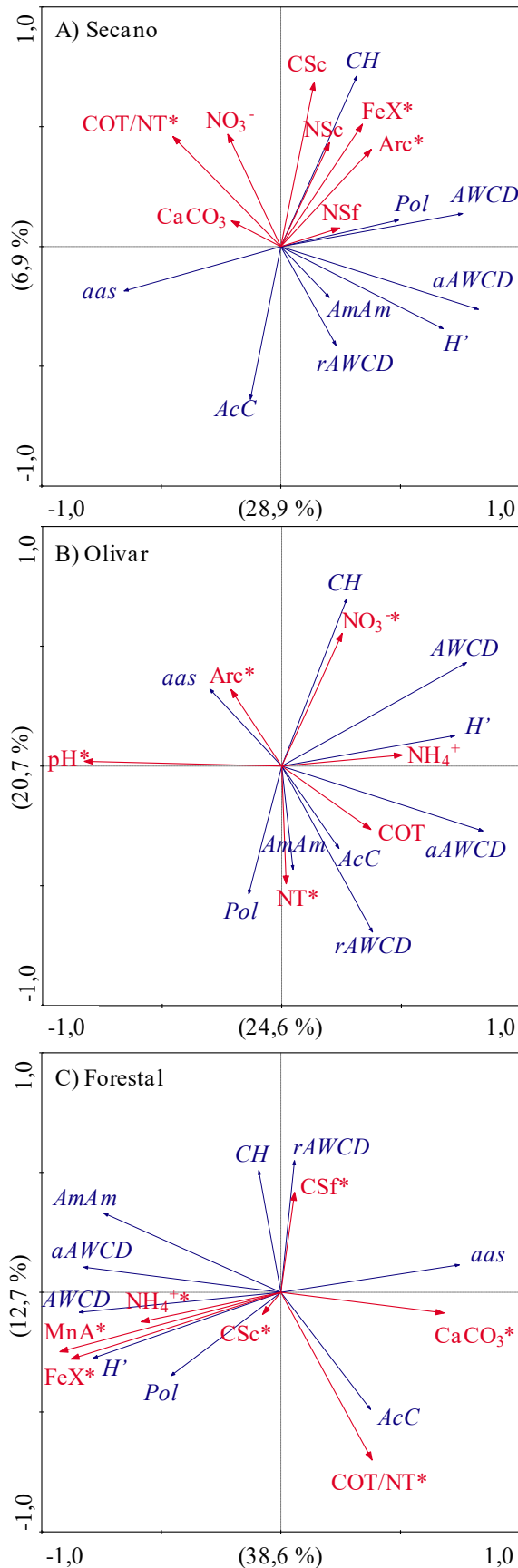


Figura 26: Valor medio \pm desviación típica de los porcentajes de utilización de los grupos de carbono de los substratos de las placas Biolog EcoPlate: carbohidratos (CH), ácidos carboxílicos (AcC), amino-ácidos (aas), polímeros (Pol) y aminos/amidas (AmAm). Distintas letras indican diferencias significativas entre usos ($P < 0,05$).

4.4.3 Influencia de los parámetros físico-químicos del suelo en el perfil catabólico a nivel comunidad en función del uso

Se han llevado a cabo tres análisis de redundancia (RDA) empleando como variables respuesta iniciales los parámetros físico-químicos (Figura 27): pH, humedad a capacidad de campo (WHC), capacidad de intercambio catiónico (CIC), contenido en C orgánico total (COT), N total (NT), relación COT/NT, amonio soluble (NH_4^+), nitrato soluble (NO_3^-), C y N solubles en agua fría (CSf y NSf), C y N solubles en agua caliente (CSc y NSc), carbonato cálcico equivalente (CaCO_3), fósforo asimilable (Pas), arcilla (Arc), óxidos de hierro amorfos (FeA) y cristalinos (FeX), y óxidos de manganeso amorfos (MnA) y cristalinos (MnX). Las variables respuesta empleadas en estos análisis han sido: color medio de pozo (AWCD), área de la curva del color medio de pozo (aAWCD), ratio de crecimiento de la curva del color medio de pozo (rAWCD), porcentaje de utilización de carbohidratos (CH), porcentaje de utilización de ácidos carboxílicos (AcC), porcentaje de utilización de amino-ácidos (aas), porcentaje de utilización de aminos-amidas (AmAm) y porcentaje de utilización de polímeros (Pol). Las variables S, t_mid y D no se han empleado en los RDA al tener altas correlaciones con el resto de variables respuesta, lo que podría dificultar el análisis.



Los parámetros físico-químicos que explican significativamente las variables respuesta han sido, por orden de explicación: i) en el uso secano (Figura 27.A): FeX, COT/NT y Arc, ii) en el uso olivar (Figura 27.B): pH, NT, Arc y NO₃⁻, y iii) en el uso forestal (Figura 27.C): MnA, COT/NT, FeX, CaCO₃, CSc, NH₄⁺ y CSf. Los porcentajes de varianza explicada por estos parámetros físico-químicos del suelo han sido superiores en el uso forestal (51,3%), seguido del uso olivar (43,6%) y por último, el uso de secano (23,8%). Las ordenaciones resultantes del análisis de redundancia presentan en los tres usos unas características parecidas. Las variables respuesta analizadas se relacionan entre sí positivamente, a excepción de: i) el porcentaje de utilización de los aminoácidos (aas) que se opone al AWCD, aAWCD, porcentaje de utilización de polímeros (Pol) y a H', pudiendo deberse a la presencia de bacteriocinas, péptidos generados por microorganismos para atacar a otros

Figura 27: Ordenaciones generadas a partir del análisis de redundancia (RDA). Variables explicativas (parámetros físico-químicos del suelo) en rojo y variables respuesta (actividades enzimáticas) en azul. Abreviaturas: COT/NT ratio carbono orgánico total-nitrógeno total, NO₃⁻ contenido en nitratos, CSc carbono soluble en caliente, NSc nitrógeno soluble en caliente, FeX óxidos de Fe-cristalino, Arc contenido en arcillas, NSf nitrógeno soluble en frío, CaCO₃ carbonato cálcico equivalente, COT carbono orgánico total, NT nitrógeno total, NH₄⁺ amonio soluble, CSf carbono soluble en frío, MnA óxidos de Mn-amorfo. Variables significativas (P<0,1) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis

microorganismos con el fin de reducir la competencia en entornos con pocos nutrientes (Alvarez et al., 2018), lo que generaría que la diversidad se redujese, únicamente, al desarrollo de microorganismos con capacidad de degradar esos péptidos formados de aminoácidos y ii) el porcentaje de utilización de carbohidratos (CH) que se oponen al de ácidos carboxílicos (AcC), representaría la influencia del labrado. Todas las variables respuesta se ordenan en el eje 1 siguiendo por un lado el CaCO_3 o el pH y por el otro lado la existencia de nutrientes en el suelo como COT, NT, NH_4^+ y otras fracciones solubles de C y N (CSf, CSc, NSf y NSc).

Los óxidos (FeX y MnA) siempre se oponen al CaCO_3 o al pH, coincidiendo con los vectores de las variables respuesta y los correspondientes a los nutrientes anteriormente citados. Esta ordenación puede deberse a que en estos óxidos se encuentren asociados a la materia orgánica y, por tanto, sean lugares preferentes para la colonización microbiana. Destacar en el uso olivar que el vector Arc se opone a rAWCD, AmAm, AcC, NT y COT, pudiendo poner de manifiesto los procesos de estabilización de la materia orgánica en el suelo a través de la formación de compuestos arcillo-húmicos más recalcitrantes al ataque microbiano (Baldock y Skjemstad, 2000; Bolan et al., 2011).

En el eje 2 de los *biplot* en los tres usos se encuentran los vectores de los porcentajes de utilización de carbohidratos enfrentados al vector de utilización de los ácidos carboxílicos. En este eje, además, se encuentra el vector rAWCD, orientado en función del uso: en los usos de cultivo orientado hacia los AcC y en el uso forestal hacia los CH.

El contenido en N parece ser limitante en los usos seco y forestal. En estos usos, el vector del ratio COT/NT se enfrenta al vector de rAWCD, implicando que a menor cantidad de NT y, por tanto mayor ratio COT/NT, menor velocidad de crecimiento de la curva de AWCD representando, a su vez, una ralentización de la capacidad microbiana para metabolizar los substratos. De acuerdo con el *biplot* del uso olivar, se observa un efecto contrario dado que el rAWCD se encuentra relacionado positivamente con el COT y el NT. En los usos forestal y olivar (en este último no significativamente) el contenido en NH_4^+ favorece a la biodiversidad funcional (H'), al AWCD y al aAWCD, en definitiva, favorece la capacidad metabólica microbiana. En el uso de seco el contenido en nitrógeno soluble en frío (NSf), relacionado con las formas orgánicas de N más lábiles, se ordena junto con el AWCD, aAWCD y H' , indicando una alta actividad metabólica asociada a dichas formas orgánicas. La ordenación del NSf junto con la capacidad de degradación de polímeros (Pol), los substratos más complejos, podría indicar que los microorganismos utilizan las formas fácilmente disponibles de N y C ya

existentes en el suelo para sintetizar las enzimas necesarias en el metabolismo de dichos substratos.

Resultan interesantes las posiciones de los vectores de los compuestos de C soluble en agua en el uso forestal. La fracción orgánica más lábil (CSf) del suelo relacionados positivamente con rAWCD en el *biplot*, podrían indicar una estimulación de los procesos de metabolización de los substratos, en particular de los HC. La fracción orgánica más recalcitrante (CSc) se relaciona con el porcentaje de utilización de los más complejos polímeros (Pol).

4.4.4 Influencia de la disponibilidad de elementos traza en el perfil catabólico a nivel comunidad en función del uso

El porcentaje de varianza explicada en los RDA por los distintos índices de disponibilidad de los elementos traza fue variable entre los usos (Tabla 19). En olivar y forestal el mayor porcentaje de varianza explicada fue superior con la concentración potencialmente disponible (DTPA) como variable explicativa (30,3 y 36,6%, respectivamente), mientras que en secano el mayor porcentaje fue con la fracción total (36,4 %).

Tabla 19: Porcentajes de varianza explicada en los análisis de redundancia (RDA) tomando como variables explicativas las concentraciones totales, potencialmente disponibles (DTPA) e inmediatamente disponibles (CaCl_2) y como variables respuesta los parámetros del perfil catabólico a nivel comunidad obtenidos a partir de placas Biolog EcoPlate.

Concentración	Uso	Varianza explicada (%)		
		Eje 1	Eje 2	Total
Total	Secano	22,6	13,8	36,4
	Olivar	16,3	5,6	21,9
	Forestal	19,5	-	19,5
Potencialmente disponible (DTPA)	Secano	5,8	-	5,8
	Olivar	18,9	11,4	30,3
	Forestal	28,9	7,7	36,6
Inmediatamente disponible (CaCl_2)	Secano	11,1	-	11,1
	Olivar	-	-	-
	Forestal	12,1	-	12,1

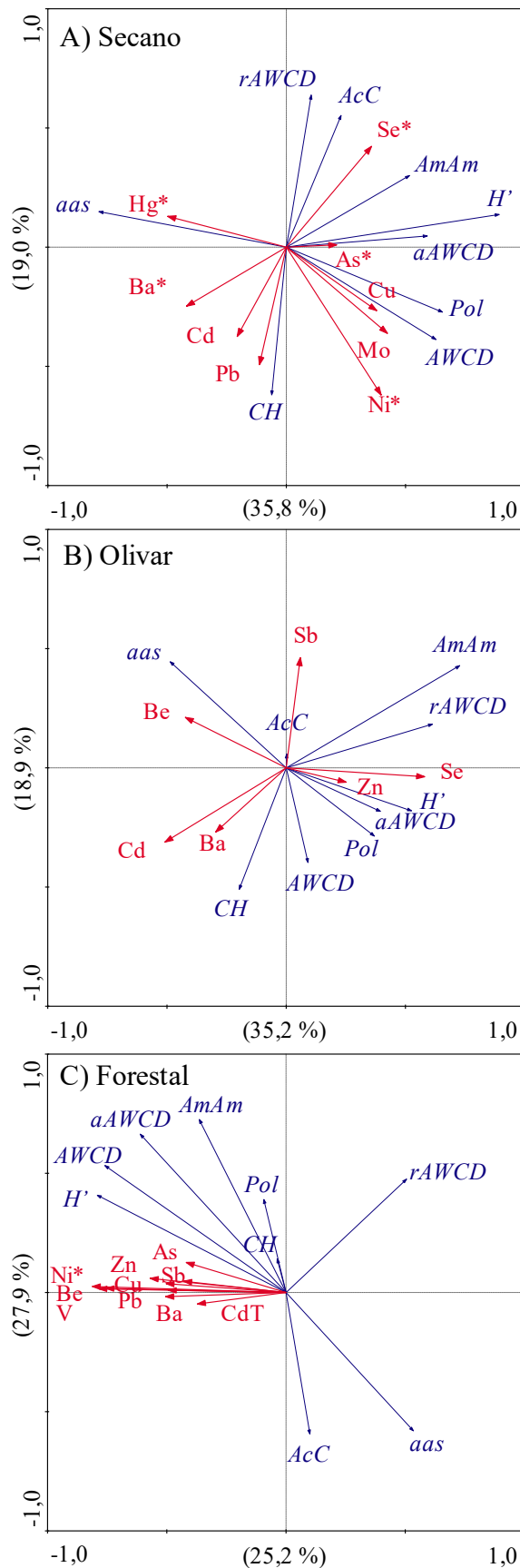
4.4.4.1 Concentraciones totales

En la Figura 28 se presentan los *biplots* correspondientes a los RDA con las concentraciones totales de los elementos traza como variables explicativas y los parámetros obtenidos del estudio de las placas Biolog como variables respuesta.

La influencia de las concentraciones totales de los elementos traza analizados sobre el perfil catabólico a nivel comunidad de los suelos estudiados parece ser reducida dado que: i) en los tres *biplots*, la mayoría de los vectores de las concentraciones totales de los elementos traza tuvieron menor módulo que los vectores de las variables explicativas, ii) en el RDA del uso olivar no obtuvo ninguna variable explicativa significativa ($P < 0,1$), y iii) el eje 1 del *biplot* del uso forestal, en el que se encuentran los vectores de las concentraciones totales, representó un menor porcentaje de varianza explicada respecto al eje 2.

En el uso de secano (Figura 28.A) las concentraciones totales de Ba, Se, Ni, As y Hg fueron identificadas como significativas. En el eje 1 de la ordenación se situó la variable explicativa As en la dirección +1 junto a las variables H' y aAWCD, esta ordenación podría explicarse a través de la correlación del As con el NH_4^+ ($P < 0,05$) ya que las variables respuesta H' y aAWCD se ven incrementadas por formas solubles de N tal y como se observó anteriormente en el *biplot* de secano de la Figura 27.A. En el eje -1 se situaron los vectores de las variables explicativas Hg y Ba coincidiendo con la variable respuesta aas. El Ba ha mostrado correlación positiva con el ratio COT/NT ($P < 0,05$), lo que podría indicar su ordenación en sentido opuesto a AmAm, H' y aAWCD ya que estas tres variables se han relacionado de forma negativa con dicho ratio anteriormente (Figura 27.A). Por último, en este eje 1 la ordenación del Hg en el *biplot* no parece deberse a correlaciones indirectas con los parámetros físico-químicos del suelo por lo que podría afectar al AWCD, aAWCD, H' y a la capacidad catabólica de los polímeros (Pol) con la que además se correlaciona negativamente ($P < 0,01$).

En el eje 2 del *biplot* de este uso el vector de la concentración total de Ni se alinea con el CH en sentido opuesto al Se que se alinea con rAWCD y AcC. La ordenación del Ni puede deberse a su correlación positiva con el FeX ($P < 0,01$), el cual mostró un alineamiento conjuntamente con el vector de CH, como se ha observado previamente (Figura 27.A), por lo que su posicionamiento podría deberse a esta relación indirecta.



La ordenación de Se parece ejercer un efecto positivo en la capacidad catabólica de ácidos carboxílicos (AcC) y de aminas/amidas (AmAm) principalmente con los que se ordenó conjuntamente en el *biplot*, una posible causa es la utilización del Se como cofactor en la respuesta enzimática de la glutatión-peroxidasa, además de su posible influencia positiva en la reacción de la superóxido dismutasa y catalasa frente al estrés oxidativo (Gomes et al., 2007; Yao et al., 2010) que pueda causarse a raíz de la metabolización de este tipo de substratos, sin embargo, serían necesarios estudios posteriores.

Prácticamente en la bisectriz del cuarto cuadrante del *biplot* se sitúan los vectores Cu y Mo, aunque no son estadísticamente significativos se ha optado por representarlos puesto que en el estudio de actividades enzimáticas y de su disponibilidad parecen proceder del empleo de fungicidas. En este caso, tanto Cu como Mo se alinean con el AWCD. En caso de afección de la población bacteriana por parte de estos elementos traza no se podría dar esta relación positiva en el

Figura 28: Biplots de las ordenaciones generadas a partir de las concentraciones totales de elementos traza (variables explicativas, en rojo) y el perfil catabólico a nivel comunidad (variables respuesta, en azul). Variables significativas ($P < 0,1$) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis.

RDA y tampoco hay ninguna otra variable (parámetro físico-químico del suelo) que pueda explicar esta alineación. Ambos elementos traza, Cu y Mo, son micronutrientes por lo que podrían estar en concentraciones suficientemente bajas como para beneficiar a la población bacteriana pero no a tan altas concentraciones como para ser tóxicos (He et al., 2005). Por tanto, parece que Cu y Mo no afectan negativamente a la funcionalidad de las comunidades microbianas en el uso de secano.

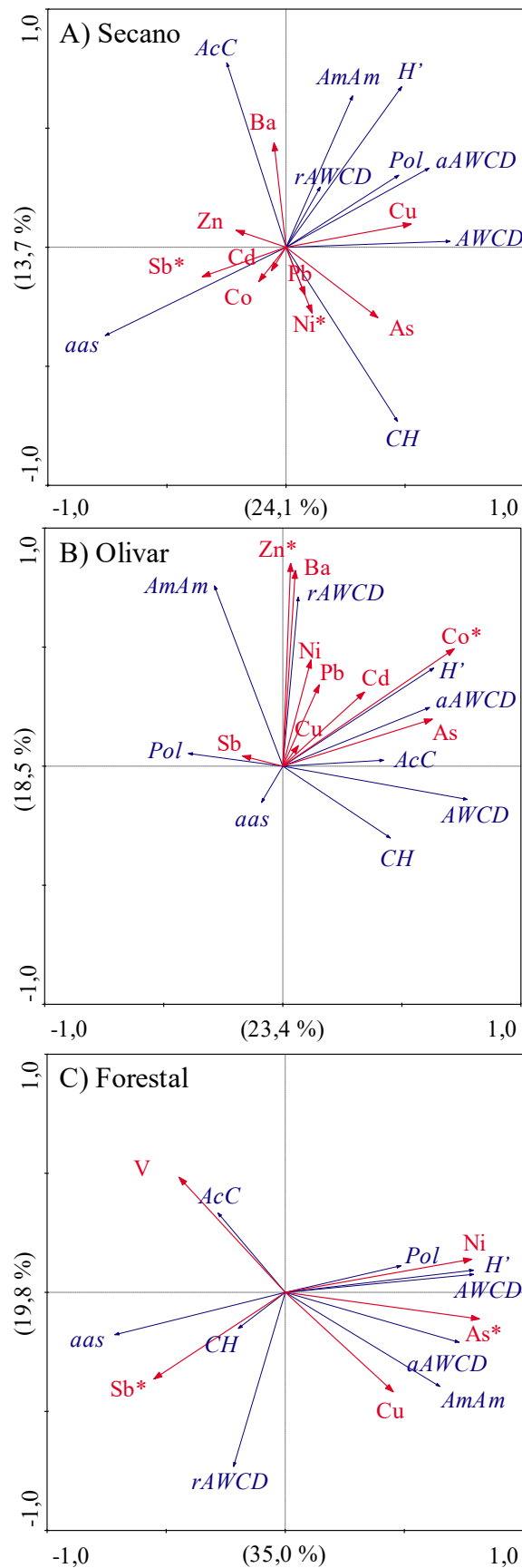
En el RDA del uso olivar (Figura 28.B) ninguna concentración total de elementos traza fue identificada como significativa. En el *biplot* correspondiente se muestran los elementos traza que tuvieron un mayor módulo, sin embargo, aun así, siguen siendo menores en comparación con los vectores de las variables respuesta. En estas condiciones dar una explicación de los posibles efectos carecería de significación.

En el RDA del uso forestal la concentración total de Ni fue la única identificada como estadísticamente significativa (Figura 28.C). En el *biplot* el vector de Ni y del resto de elementos traza se ordenan en el eje 1 que presentó un porcentaje de explicación inferior que el eje 2, dominado por las variables respuesta del RDA. La ordenación resultante podría explicarse por la relación indirecta del Ni con AmAm, aAWCD, AWCD, y H', a través de las correlaciones positivas entre todas estas variables con los óxidos de Fe y Mn. Por lo que las concentraciones totales en el uso forestal no parecen afectar al perfil catabólico de la comunidad microbiana.

4.4.4.2 Potencialmente disponibles (DTPA)

Las concentraciones potencialmente disponibles identificadas como variables explicativas significativas en los RDA realizados (Figura 29) fueron, por orden, en los distintos usos: i) secano Sb y Ni, ii) olivar, Co y Zn, y iii) forestal, As y Sb.

Las variables explicativas, Sb y Ni, en el *biplot* del uso de secano (Figura 29.A) muestran de nuevo vectores de menor módulo que las variables respuesta y, por tanto, podemos pensar en su escasa influencia en el perfil catabólico de la comunidad microbiana. Destacar de esta ordenación que de nuevo el Ni es identificado como variable significativa, orientándose junto con el vector de CH tal y como sucedía con las concentraciones totales. La fracción potencialmente disponible de Ni parece ejercer una influencia positiva sobre la comunidad microbiana a la hora de catabolizar carbohidratos ya que no muestran relaciones indirectas a través de parámetros físico-químicos del suelo, posiblemente por su procedencia como



fertilizante (Alloway, 2013; Nicholson et al., 2003; Williams et al., 1985). La otra variable explicativa significativa, el Sb, se opone en la ordenación a los vectores AWCD, aAWCD y Pol principalmente. En el análisis de la relación entre disponibilidad de los elementos traza y los parámetros físico-químicos del suelo, el Sb se identificó como posible compuesto proveniente del empleo de fungicidas o de algún agroquímico, en tal caso, la ordenación que nos atañe podría indicar cierto efecto negativo sobre la funcionalidad de la comunidad por parte de estos agroquímicos, sin embargo, debido a la poca significancia de la ordenación sería necesario un estudio posterior al respecto. En el *biplot* del uso olivar (Figura 29.B) la ordenación de las concentraciones potencialmente disponibles de Co y Zn se sitúan en el eje +1 y +2 del *biplot*, respectivamente. Ambos se ordenan positivamente junto a los vectores de las variables respuesta, hacen excepción los vectores de Pol y aas situados en oposición.

Figura 29: Biplots de las ordenaciones generadas a partir de las concentraciones potencialmente disponibles (DTPA) de elementos traza (variables explicativas, en rojo) y el perfil catabólico a nivel comunidad (variables respuesta, en azul). Variables significativas ($P < 0,1$) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis.

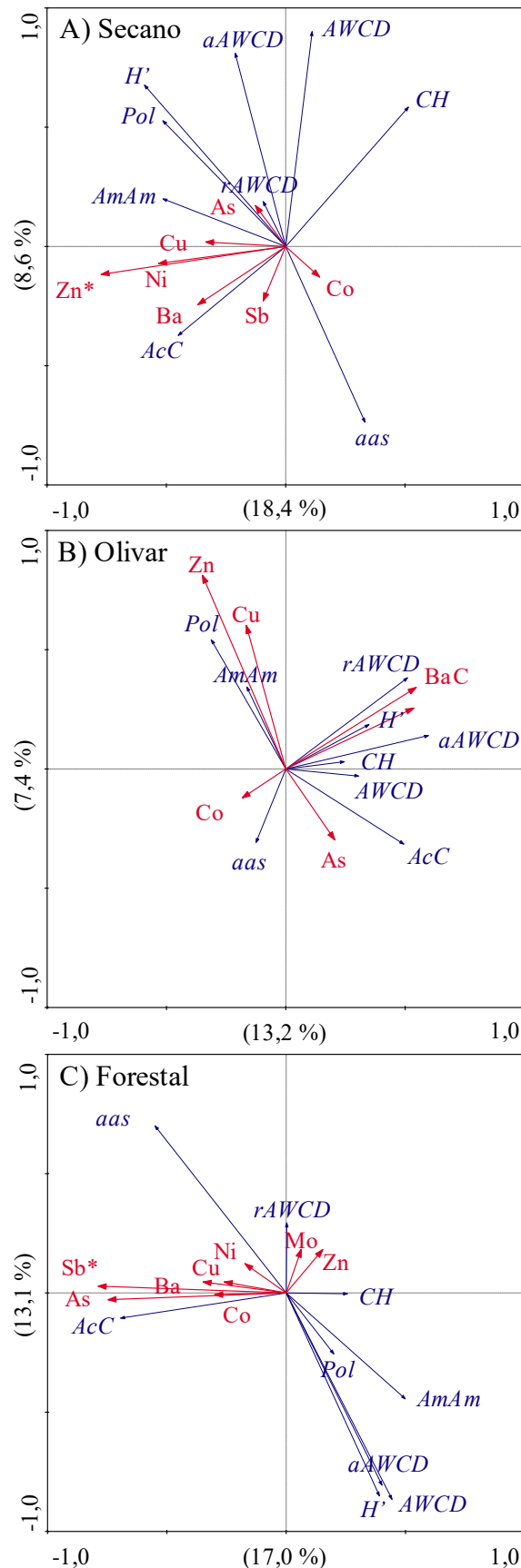
Posiblemente la ordenación de estos elementos traza pueda deberse a la correlación positiva de ambos con el CSc ($P<0,01$), e individualmente del Zn con el COT ($P<0,01$) y del Co con NSf ($P<0,05$, respectivamente) ya que, como se observó en el análisis de redundancia realizado con los parámetros físico-químicos del suelo, las variables respuesta Pol, AmAm, rAWCD, AcC, aAWCD y H' se encuentran favorecidas por los contenidos de N, COT y NH_4^+ , tratándose por tanto de relaciones indirectas entre las concentraciones potencialmente disponibles de Co y Zn y las variables respuesta. Por tanto, las concentraciones potencialmente disponibles del uso olivar no parecen afectar al perfil catabólico de la comunidad microbiana.

En el *biplot* del uso forestal (Figura 29.C) los vectores de As y Sb se ordenan en el eje 1 en sentidos opuestos, alineándose por un lado con los vectores de Pol, H', AWCD, aAWCD y AmAm, y por otro con los vectores de aas y CH, respectivamente. Los módulos de los vectores As y Sb son similares a los de las variables respuesta por lo que la explicación que proporcionan de dichas variables sería reducida. Posiblemente la ordenación del As se deba a sus correlaciones positivas con los parámetros físicos: MnA, FeX y NH_4^+ ($P<0,01$) y su correlación negativa con el CaCO_3 ($P<0,01$). Todos estos parámetros del suelo fueron identificados como variables explicativas significativas ordenándose de una forma similar en el *biplot* correspondiente (Figura 27.C). La ordenación de Sb podría deberse a su correlación negativa con FeX ($P<0,05$) lo que le llevaría su oposición frente al As en el *biplot*. Por tanto, las concentraciones potencialmente disponibles de los elementos traza no supondrían una afectación a la capacidad catabólica de la comunidad microbiana en el uso forestal.

4.4.4.3 Inmediatamente disponibles (CaCl_2)

En los RDA realizados con las concentraciones inmediatamente disponibles (Figura 30) de los elementos traza como variables explicativas únicamente se identificaron como tales el Zn en el uso de secano y Sb en el forestal, en el olivar ninguna variable explicativa fue significativa. En todas las ordenaciones, en general, los módulos de los vectores correspondientes a las variables explicativas fueron menores que los de las variables respuesta, indicativo de lo que sería una escasa influencia.

En el uso de secano el Zn se ordena en el eje -1 compartiendo dirección y sentido con las variables respuesta AmAm y AcC. Éste elementó mostró una correlación positiva con el H' ($P<0,05$), con la que se encuentra parcialmente alineada, y una correlación negativa con CH ($P<0,05$) con la que se opone en el *biplot*. En el estudio de la influencia de los parámetros



físico-químicos en la disponibilidad de los elementos traza se observó como el contenido inmediatamente disponible de Zn dependía de entre otros factores del NSf y del Pas (Figura 17). Como se observó en el RDA de físico-químicos (Figura 27) los compuestos soluble de N favorecen el metabolismo microbiano en este uso, por lo que, como en los casos anteriores, la ordenación del Zn podría deberse a una relación indirecta a través de formas solubles de N y, por lo tanto, no supondrían una afectación a la capacidad catabólica de la comunidad microbiana.

En el RDA del uso olivar (Figura 30.B) ninguna concentración inmediatamente disponible de elementos traza fue identificada como significativa, por lo que en estas condiciones dar una explicación de los posibles efectos carecería de significación. En el RDA del uso forestal el Sb fue la única variable explicativa significativa, ordenada en el eje -1 junto a los AcC, lo que reflejaría una influencia positiva sobre la capacidad catabólica de estos substratos.

Figura 30: Biplots de las ordenaciones generadas a partir de las concentraciones inmediatamente disponibles (CaCl_2) de elementos traza (variables explicativas, en rojo) y el perfil catabólico a nivel comunidad (variables respuesta, en azul). Variables significativas ($P < 0,1$) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis

En resumen, en los casos en los que predomina el efecto de los parámetros físico-químicos en el suelo sobre el perfil catabólico a nivel comunidad, podría interpretarse que las concentraciones totales actuales de los elementos traza correspondiente no parecen ejercer un efecto perjudicial sobre la comunidad microbiana. Mientras que el único caso en el que no ha sido posible explicar la ordenación de los elementos traza a través de relaciones indirectas con el perfil catabólico a nivel comunidad, a través de parámetros físico-químicos del suelo, ha sido con el contenido total de Hg en el uso de secano, por lo que se puede plantear que dicho elementos traza podría afectar a la funcionalidad de la comunidad microbiana.

4.4.4.4 Discusión general sobre los efectos de los elementos traza en los suelos estudiados

En muchos estudios las placas Biolog EcoPlate han sido empleadas exitosamente en la identificación de los efectos provocados por elementos traza en la comunidad microbiana del suelo. Sin embargo, en el estudio que hemos llevado a cabo no se han determinado efectos negativos por parte de los elementos traza, a excepción de la concentración total de Hg en el uso de secano (Figura 28.A), en la funcionalidad de las comunidades bacterianas de los tres usos estudiados (secano, olivar y forestal).

Esta falta de resolución puede deberse a que las concentraciones de los elementos traza en nuestro estudio se encuentran por debajo de los niveles tóxicos para las comunidades bacterianas. Los estudios con Biolog EcoPlate suelen realizarse con muestras de campo en zonas muy contaminadas (Klimek et al., 2016; Kuźniar et al., 2018), y adicionalmente, en ensayos de laboratorio las concentraciones de los elementos traza analizados se introducen en el suelo en forma de sales iónicas (Xu et al., 2016) lo que aumenta su disponibilidad (Giller et al., 1998). Por el contrario, los suelos de nuestro estudio son suelos naturales en los que, a lo largo del tiempo, pequeñas cantidades de elementos traza se han ido introduciendo paulatinamente a causa de la deposición aérea, empleo de fertilizantes y/o fungicidas entre otros focos, desembocando en una dificultad para determinar sus posibles efectos adversos en el suelo. Además, el hecho de tratarse de suelos naturales disminuye la capacidad de resolución de cualquier análisis al existir muchas otras variables, como las físico-químicas del suelo (Chodak et al., 2013) que afecta a los resultados.

Otra posibilidad es la adaptación de las comunidades bacterianas tanto al manejo llevado a cabo en los suelos como a la presencia de elementos traza en los mismos. Varios autores han observado que en suelos contaminados crónicamente los microorganismos se adaptan

(Rutgers, 2008; Wakelin et al., 2010) ya sea porque unas especies determinadas prevalecen frente a otras o porque las especies que se encuentren en el suelo vayan paulatinamente mutándose a sí mismas con el fin de adaptarse (Ohtonen, 1994).

En todo caso, el efecto de los parámetros físico-químicos en la funcionalidad de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas estudiados (especialmente el contenido total en N y C soluble) es superior al efecto que puedan tener los elementos traza en las concentraciones de elementos traza. No obstante, que no exista una afección en la funcionalidad a causa de los elementos traza no implica que la presencia de éstos no haya modificado las taxonomías en los usos del suelo estudiados. Por tanto, estudios posteriores de determinación filogenética serían complementarios y necesarios.

4.5. ADN bacteriano, fúngico y de arqueas en los suelos en función del uso.

Con el fin de analizar el posible efecto del uso del suelo en la población microbiana se realizaron análisis de la varianza indicando que los contenidos de ADN bacteriano, fúngico, de arqueas y las relaciones entre ellos varían en función del uso del suelo (Figura 31). Los suelos bajo uso forestal mostraron mayor cantidad de copias de ADN bacteriano (B), fúngico (H) y de arqueas (A), por el contrario, muestran los menores valores en los ratios H/B, H/A y A/B. Curiosamente, en los suelos de cultivo (secano y olivar) se observaron diferencias en la cantidad de copias de ADN fúngico, siendo tanto H como H/A mayor en el uso de secano.

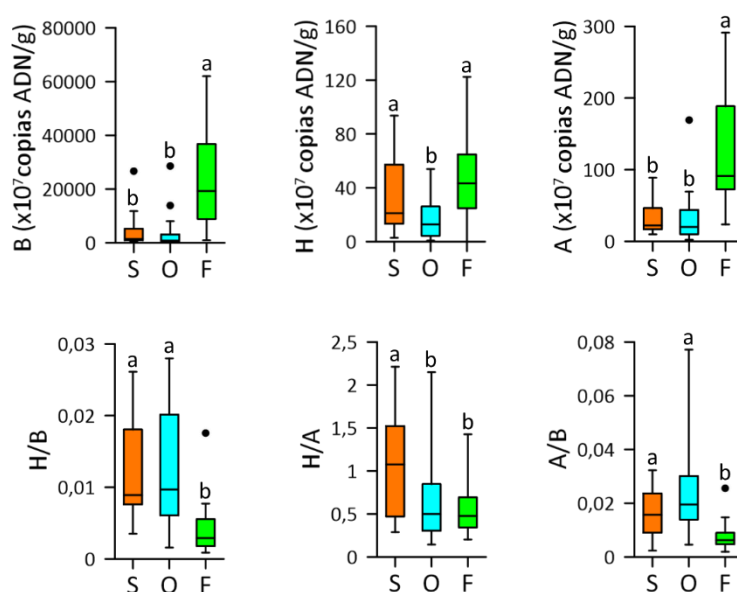


Figura 31: Cantidades de ADN bacteriano (B), fúngico (H), de arqueas (A) y sus respectivos ratios (H/B, H/A, A/B). Diferencias significativas entre usos identificadas con distintas letras ($P < 0,05$).

En los suelos forestales la continua entrada de materia orgánica y la ausencia de manejo agrícola serían responsables de los mayores contenidos de ADN observado. Tanto bacterias, como hongos y arqueas, se correlacionaron positivamente con el contenido en COT, NT y NH_4^+ ($P < 0,01$) en este uso. La participación de los tres tipos de microorganismos en la degradación de la materia orgánica fresca, cuyo primer paso corresponde con la amonificación (Brady y Weil, 2014), explicaría este resultado. Ese aspecto se ve reforzado por las correlaciones positivas con los contenidos en K^+ y Mg^{2+} , que tienen un posible origen en los pasos iniciales de la degradación de: i) restos vegetales, en los cuales el K^+ es rápidamente liberado de las

hojas (Sardans y Peñuelas, 2015) y, ii) la clorofila, en la que el Mg^{2+} que ocupa el centro del tetrapirrol de la molécula es liberado (Hörtensteiner, 2006, 1999).

Por el contrario, en los usos de cultivo la alteración de los ciclos biogeoquímicos y las condiciones de estos suelos provocaría que los distintos microorganismos se relacionen entre sí de forma distinta a como lo hacen en el uso forestal ocasionando una mayor competencia entre ellos por los escasos nutrientes.

Como se ha indicado anteriormente, los usos de cultivo mostraron mayores ratios H/B y A/B que en el uso forestal y el uso de secano presentó el mayor ratio H/A. Cabría esperar que según lo indicado en la literatura que los suelos agrícolas sujetos a laboreo presenten menores ratios de H/B que los suelos naturales (Frey *et al.*, 2003; Hendrix *et al.*, 1986; Holland y Coleman, 1987; Lauber *et al.*, 2008). El labrado influye en el desarrollo de los hongos disminuyendo su capacidad de translocación de nutrientes al reducir la longitud de sus hifas, mientras que favorece el desarrollo bacteriano al facilitar el acceso a materia orgánica previamente protegida, al aumentar la superficie específica de los agregados y al airear el suelo (Strickland y Rousk, 2010). Por el contrario, suelos sin laboreo y sin adición de fertilizantes presentarían ratios H/B superiores (Bardgett y McAlister, 1999). En los suelos de este estudio ocurre lo contrario, los suelos agrícolas que han sufrido laboreo muestran mayores ratios H/B que los suelos forestales no sujetos a tales prácticas. Una posible explicación podría radicar en el empleo de fertilizantes en los usos de secano y olivar. La aplicación de urea o fertilizantes de amonio puede producir altas concentraciones de NH_3 locales afectando a la abundancia de bacterias (Geisseler y Scow, 2014), implicando un aumento del ratio H/B. Yevdokimov *et al.* (2012) comprobó que grandes cantidades de NO_3^- en suelos agrícolas (2 g/kg) producían un aumento de H/B. Sin embargo, las concentraciones de NO_3^- soluble en los suelos del presente estudio son inferiores a 30 mg/kg, por lo que el efecto que tenga la presencia de NO_3^- no sería la causa principal del mayor ratio H/B. Además, se obtuvieron correlaciones significativas negativas entre ambos grupos de microorganismos (H y B) con el contenido en NO_3^- ($P < 0,05$). En los suelos de secano tanto H como B están correlacionados positivamente con el contenido en CSc ($P < 0,01$). Por tanto, ambos grupos están utilizando fuentes de MO más recalcitrantes que si estuviesen empleando CSf. Esto podría implicar el agotamiento previo de los nutrientes fácilmente disponibles y la consiguiente reducción de la población bacteriana en pos de un aumento en la población

fúngica, al tener esta última una mayor capacidad de desarrollo en entornos de escasos nutrientes (Lauber *et al.*, 2008).

En cuanto al ratio H/B en el uso olivar, se correlaciona negativamente con el contenido en CSc y CSf ($P < 0,05$). Esto podría indicar que, en condiciones de mayor cantidad de nutrientes, las bacterias estarían beneficiadas mientras que en caso contrario los hongos tendrían una mayor capacidad de desarrollo. El contenido de ADN bacteriano en este uso se correlaciona con CSc ($P < 0,05$) mientras que el ADN fúngico no. En cambio, los contenidos de ADN extraídos se correlacionaron con el ratio COT/NT ($P < 0,01$), siendo la correlación superior con el ADN bacteriano, seguido del de arqueas y con la menor correlación con el fúngico. Esto podría indicar una mayor necesidad de MO por parte de las bacterias en comparación con los hongos. Por tanto, los valores superiores del ratio H/B en los usos de cultivo se deberían a la poca disponibilidad de nutrientes, favoreciendo el desarrollo de hongos frente al detrimento de la población bacteriana en tal escenario.

El estudio de la influencia e importancia de las arqueas en el medio ambiente y en especial en los ciclos biogeoquímicos del suelo es reciente (Offre *et al.*, 2013). Se reconoce su importancia en el ciclo del N en los pasos iniciales de la nitrificación (Hansel *et al.*, 2008) y, por tanto, se suelen estudiar junto a las bacterias partícipes también en este proceso. En nuestro estudio el contenido de ADN bacteriano y de arqueas se correlacionó positiva y significativamente con el contenido en NH_4^+ en el uso olivar ($P < 0,05$) y en el uso forestal ($P < 0,01$), participando ambos tipos de microorganismos en la amonificación en estos usos.

Por otro lado, la presencia de abonos nitrogenados favorece la diversidad y cantidad de poblaciones bacterianas nitrificantes mientras que no ejerce ningún efecto en las arqueas (Ouyang *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2017). Sin embargo, en suelos con bajos contenidos en NH_4^+ o NO_3^- las poblaciones de arqueas no se ven tan afectadas como las bacterianas a causa de sus menores demandas nutricionales (Tao *et al.*, 2017), pudiendo explicar que los suelos de cultivo mostrasen un mayor ratio A/B que los suelos forestales a pesar de tener menores contenidos en nutrientes.

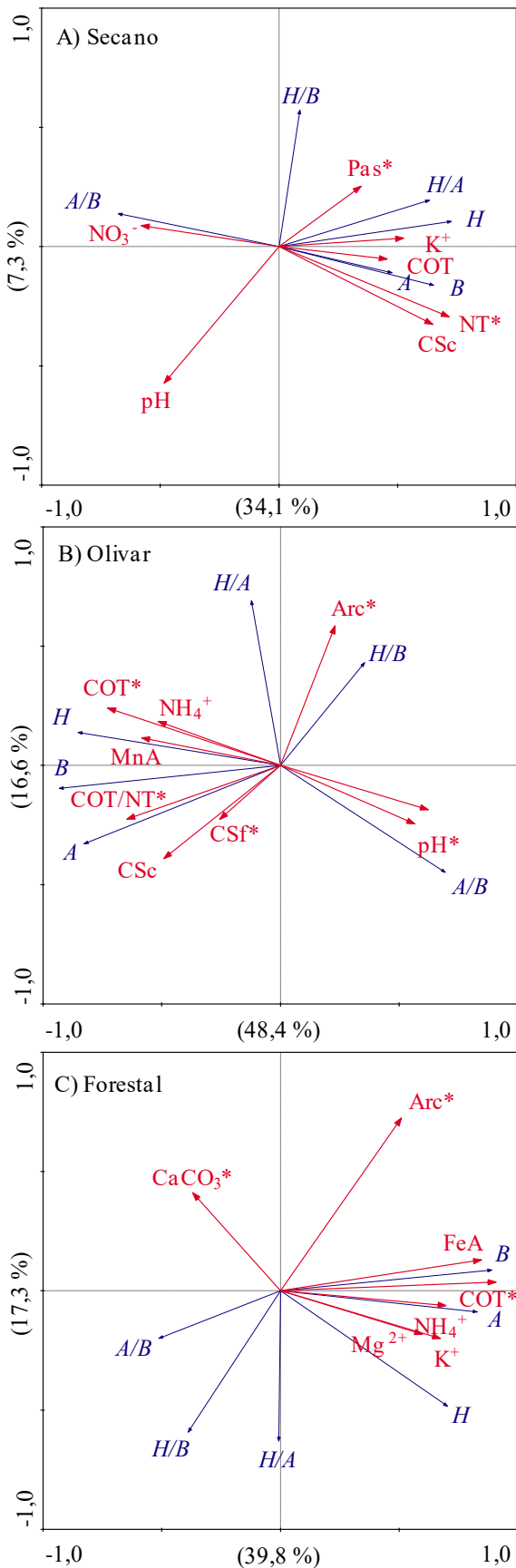
En cuanto a la relación entre H y A, las publicaciones comparando ambos tipos de microorganismos son escasas. En los tres usos estudiados existieron correlaciones positivas entre H y A ($P < 0,01$). Sin embargo, considerando que el ratio A/B mostró correlaciones

negativas ($P < 0,01$) con H en los usos de cultivo y que A, B y H se correlacionan positivamente entre sí, estas relaciones se podrían interpretar como una posible competencia, en estos suelos, entre arqueas y hongos (Bengtson *et al.*, 2012), de forma que el predominio de una forma sobre la otra afectaría a la que esté en menor proporción. Dicha competencia sería mayor en el uso de secano al tener una mayor cantidad de hongos que el uso olivar.

4.5.1 Influencia de los parámetros físico-químicos de los suelos en el contenido de ADN en función del uso

Los parámetros físico-químicos de los suelos de uso forestal y olivar son los que han mostrado mejores porcentajes de explicación del número de copias de ADN de B, H y A y de los ratios H/B, H/A y A/B con un 51,6% y 60,3% respectivamente, mientras que en el uso de secano esta explicación ha sido mucho menor (20,7%). Las variables explicativas más importantes en cada uso fueron, por orden: i) secano: NT y Pas, ii) olivar: COT, pH, ratio COT/NT, Arc y CSf y iii) forestal: COT, Arc y CaCO_3 .

En el *biplot* del uso de secano (Figura 32. A) los vectores de las variables relacionadas con la materia orgánica: NT, COT y CSc se ordenaron lógicamente junto a los vectores del contenido de ADN de bacterias y arqueas en el eje +1. La ordenación de CSc junto con B y A, aunque no haya sido significativa, se puede relacionar con la utilización de compuestos orgánicos más recalcitrantes a los que tienen acceso en el secano. El contenido en Pas se ordenó con el contenido de ADN fúngico y con los ratios en los que se encuentra (H/B y H/A). Los hongos participan de forma importante en el ciclo del P y en especial en la translocación de este elemento a las plantas, las cuales a cambio les proporcionan otros compuestos orgánicos (Brady y Weil, 2014). El vector del Pas se opuso al del pH, que es uno de los factores clave que rigen la disponibilidad del P. El contenido en NO_3^- se situó en el *biplot* en el eje 1 opuesto a los vectores de H y B con los que se correlacionó negativamente ($P < 0,05$). La fertilización puede afectar a la población fúngica y, por tanto, al ciclo del P, en el que estos microorganismos participan activamente (Gosling *et al.*, 2006). La ordenación del NO_3^- junto con el ratio A/B y opuesta al ratio H/A pone de manifiesto la influencia negativa de este nutriente sobre B y H, pero no sobre A. En este *biplot* se representa el contenido en K^+ a pesar de no ser variable significativa. Anteriormente se mostró que la presencia de K^+ en el uso forestal podría deberse a la degradación de restos vegetales al correlacionarse este catión positivamente con A, B y



H, y su vez estos contenidos de ADN se correlacionaron con NT, COT y NH_4^+ . En el uso de secano el K^+ únicamente se correlacionó con H, posiblemente porque sus requerimientos son menores frente a B y A, y no se obtuvieron correlaciones significativas entre NH_4^+ y los contenidos de ADN, lo que indicaría un escaso aporte de materia orgánica fresca al suelo.

Los *biplots* de las ordenaciones de los usos olivar y forestal fueron muy similares entre sí (Figura 32. B y C, respectivamente). En ambos usos en el eje 1 se situaron las variables explicativas relacionadas con la materia orgánica junto con los vectores de B, H y A debido a las relaciones de los microorganismos con los ciclos de la materia orgánica. En el sentido contrario a estas variables se ordenaron el contenido en CaCO_3 o el pH y el vector A/B. El pH, en general,

Figura 32: Biplots de ordenación a partir del análisis de redundancia (RDA) realizado entre los parámetros físico-químicos del suelo como variables explicativas (vectores en rojo) y las cantidades de ADN bacteriano (B), fúngico (H), de arqueas (A) y sus respectivos ratios (H/B, H/A, A/B) como variables respuesta (vectores en azul). Variables explicativas significativas ($p < 0,1$) identificadas con *. El porcentaje de varianza explicado por las variables explicativas del gráfico en cada eje se encuentra entre paréntesis. Abreviaciones: Pas fósforo asimilable, NO_3^- contenido en nitratos, K^+ potasio de intercambio, COT carbono orgánico total, NT nitrógeno total, Chw carbono soluble en agua caliente, Arc contenido en arcillas, NH_4^+ amonio soluble, MnA óxidos de Mn-amorfo, Ccw carbono soluble en agua fría, CaCO_3 contenido en carbonato cálcico equivalente, FeA óxidos de Fe-amorfo, Mg^{2+} Mg de intercambio

influye en las actividades enzimáticas que participan en los ciclos biogeoquímicos además de influir en la viabilidad de los microorganismos. En este sentido, la orientación similar entre pH y A/B nos indicaría que el pH afecta en mayor medida a la población bacteriana que a la de arqueas (Bengtson *et al.*, 2012). En el eje 2 del *biplot* de ambos usos se ordenaron los vectores de la variable explicativa Arc y los vectores de las variables respuesta H/B y H/A. En el uso olivar el vector de Arc se ordenó junto a los de H/B y H/A, mientras que en el uso forestal Arc se ordenó en sentido opuesto.

El análisis de correlación de Spearman mostró en el uso olivar una correlación negativa entre Arc y Cws ($P < 0,05$), parámetro con el cual también se correlacionó negativamente el ratio H/B ($P < 0,05$). Esto implicaría que la arcilla influye en la disponibilidad de C soluble (Bolan *et al.*, 2011; Saidy *et al.*, 2012) y que tanto bacterias como arqueas se benefician de la presencia de esta fuente de C más lábil con más facilidad que los hongos, que podrían estar más especializados en compuestos de mayor recalcitrancia (He *et al.*, 2017).

En el uso forestal, la ordenación de Arc, COT y FeA en el entorno de B y A estaría relacionada con los coloides del suelo y su capacidad de retención de nutrientes, satisfaciendo los mayores requerimientos en nutrientes por parte de estos microorganismos. La relación opuesta de dichos coloides con las relaciones A/B, H/B y H/A indicaría que los requerimientos de los tres organismos estudiados seguirían la secuencia $B > A > H$.

4.5.2 Influencia de la disponibilidad de elementos traza en el contenido de ADN en función del uso

En los RDA llevados a cabo empleando como variables explicativas las distintas concentraciones de los elementos traza de las distintas extracciones realizadas, el porcentaje de varianza explicada de las cantidades de ADN de B, H y A y sus ratios (H/B, H/A, A/B) siempre fue menor que el obtenido empleando los parámetros físico-químicos del suelo como variables explicativas (Tabla 20). Esto implicaría que los parámetros físico-químicos de los suelos de estudio fueron más importantes que la disponibilidad de los elementos traza a la hora de explicar los contenidos de ADN obtenidos. El porcentaje de variación explicado por las fracciones total, potencialmente disponible (DTPA) e inmediatamente disponible (CaCl_2) varió en función del uso. Así, en el uso de secano se observó una tendencia a incrementar el

porcentaje de varianza explicado conforme aumentaba la disponibilidad, en el uso olivar el porcentaje se mantuvo relativamente constante y, en cambio, en el uso forestal disminuyó.

Tabla 20: Porcentajes de varianza explicada por las distintas variables explicativas significativas ($p < 0,1$) utilizadas en los RDA realizados: concentraciones totales de los elementos traza, concentraciones potencialmente disponibles de los elementos traza (DTPA), concentraciones inmediatamente disponibles de los elementos traza (CaCl_2) y parámetros físico-químicos de los suelos.

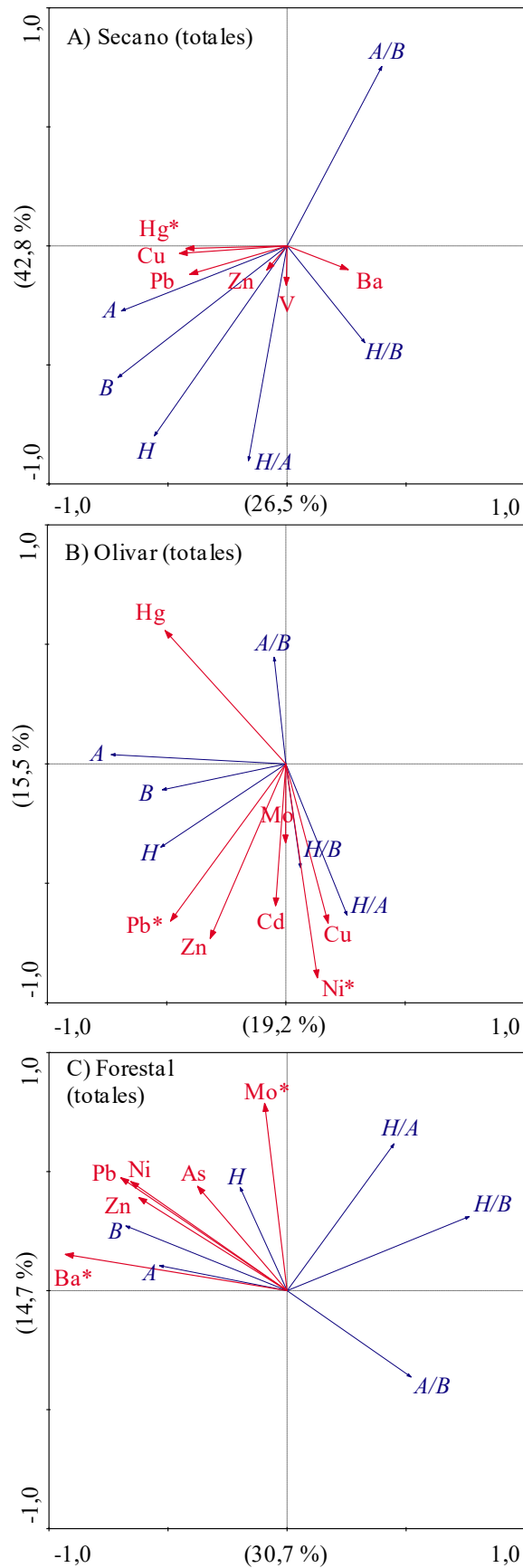
Usos	Variables explicativas empleadas en el RDA			
	Concentraciones Totales	Concentraciones DTPA	Concentraciones CaCl_2	Parámetros físico-químicos del suelo
Secano	7,6	11,3	14,2	20,7
Olivar	21,1	25,8	23,4	60,3
Forestal	36,9	20,5	13	51,6

4.5.2.1 Concentraciones totales

La importancia de las concentraciones totales sobre B, H y A y sus ratios (H/B, H/A y A/B) varió en función del uso. En el uso forestal la varianza explicada fue del 36,9%, mientras que en el uso olivar fue del 21,1% y la menor en el uso secano con un 7,6%.

En el uso de secano (Figura 33. A) la concentración total de Hg fue la única variable explicativa significativa identificada. El vector de Hg se alineó con las arqueas y con proyección en el eje 1 de bacterias y hongos. Esta ordenación podría deberse a la relación indirecta entre Hg y B, H, A a través de los parámetros del suelo COT y NT. Debido al bajo porcentaje de varianza explicada por la variable significativa (7,6%), el hecho de que los vectores de las variables respuesta fueron superiores a las variables explicativas y que el porcentaje de varianza explicada fue superior en el eje 2 (cuando debería ser en el eje 1) esta ordenación carece de trascendencia.

En el *biplot* del uso olivar (Figura 33. B) las concentraciones totales de los elementos traza analizados se ordenaron principalmente en el eje 2, siendo las variables Pb y Ni identificadas como significativas. Estos elementos se ordenan con H y con los ratios H/B, H/A, existiendo además una correlación positiva entre el ratio H/A y el contenido total de Ni ($P < 0,05$).



A partir de esta ordenación se intuye el efecto del hongo en la simbiosis con el olivo. El hongo favorece la absorción de dichos elementos que están relativamente inmóviles y en bajas concentraciones en la solución del suelo (Brady y Weil, 2014), lo que resultaría en una reducción de micronutrientes disponibles para las bacterias y arqueas, ordenándose el vector A/B en oposición a los vectores de H/A y H/B.

En el RDA del uso forestal (Figura 33. C) las concentraciones totales de Ba y Mo han sido identificadas como variables explicativas significativas. Su ordenación en el *biplot*, con la misma dirección y sentido que las variables respuesta bacterias, hongos y arqueas, se explicaría por: i) la correlación positiva del Ba con FeA ($P < 0,05$) que a su vez se correlacionó positivamente con B, H y A, que explicaría la presencia de micronutrientes en las posiciones de cambio; y ii) la correlación positiva entre la concentración total en Mo

Figura 33: Biplots de ordenación a partir del análisis de redundancia (RDA) realizado entre las concentraciones totales de los elementos traza analizados como variables explicativas (vectores en rojo) y las cantidades de ADN bacteriano (B), fúngico (H), de arqueas (A) y sus respectivos ratios (H/B, H/A, A/B) como variables respuesta (vectores en azul). Variables explicativas significativas ($p < 0,1$) identificadas con *. El porcentaje de varianza explicado por las variables explicativas del gráfico en cada eje se encuentra entre paréntesis.

con el contenido en NH_4^+ ($P < 0,01$) con el que se correlacionaron también B, H y A ($P < 0,01$), ya que el Mo es esencial en la fijación y asimilación del N (Brady y Weil, 2014). El vector de A/B al correlacionarse negativamente con FeA ($P < 0,05$) se ordenó en sentido contrario. La ordenación del vector H/B en oposición al vector de Ba, podría explicarse por la presencia de micronutrientes adsorbidos en las posiciones de cambio, como se ha indicado anteriormente, favoreciendo el crecimiento bacteriano. La ordenación del vector H/A junto al Mo se explicaría, como se ha indicado anteriormente, por el efecto de la simbiosis entre hongo-planta.

4.5.2.2 Concentraciones potencialmente disponibles (DTPA) e inmediatamente disponibles (CaCl_2)

Las ordenaciones obtenidas utilizando las concentraciones potencial e inmediatamente disponibles de los elementos traza como variables explicativas se han agrupado puesto que presentan características, por lo general, similares. Primeramente, los porcentajes de varianza explicado por estas fracciones es reducido, siendo menor del 30%. En particular, los porcentajes de varianza explicados por las concentraciones potencialmente disponibles fueron más altos en el uso olivar con un 25,8%, seguido del forestal con un 20,5% y, por último, el uso de secano con un 11,3%. Con las concentraciones inmediatamente disponibles, los porcentajes de varianza explicados por las variables significativamente explicativas alcanzó su valor máximo en el uso olivar explicando un 23,4%, seguido de los usos secano y forestal con 14,2 y 13% respectivamente. Hay que añadir que gran parte de los vectores de las variables explicativas muestran un módulo inferior a los vectores de las variables respuesta, por lo que las ordenaciones se encuentran en gran parte dirigidas por las propias relaciones de las variables respuesta entre sí.

En términos generales en el eje 1 de las ordenaciones se sitúan las variables respuesta A y B diametralmente opuestas a A/B y en el eje 2 se sitúan H y los ratios H/A y H/B. Este patrón podría indicar la diferenciación entre A y B por un lado y H por otro, diferenciando su posible papel en los suelos de estudio.

En todas las ordenaciones obtenidas los vectores de los elementos traza se ordenan, obviamente, en función de sus relaciones con parámetros físico-químicos, especialmente con los óxidos de Fe y Mn, representando en términos generales la existencia de nutrientes disponibles y alineándose con los vectores de B, A y H.

En este planteamiento hace excepción la ordenación del uso forestal con CaCl_2 , puesto que las concentraciones inmediatamente disponibles de los elementos traza se oponen a los vectores A, B, y H, en este caso la ordenación podría deberse a la fijación de estos elementos traza en la materia orgánica lo que reduciría su disponibilidad, como en el caso del Zn, única variable explicativa significativa en este RDA, cuyo vector se opone diametralmente a A y B ya que el contenido inmediatamente disponible de este elemento se encuentra afectado negativamente por la materia orgánica reduciendo su disponibilidad.

La mayor cantidad de elementos traza en las ordenaciones de los usos olivar y forestal con DTPA ordenados en torno a H podría indicar un posible escenario de simbiosis planta-hongo en el que este último moviliza estos elementos traza y la planta le beneficiase.

4.6 Ensayos ecotoxicológicos

4.6.1 Ensayo de reproducción y bioacumulación con *Eisenia fetida*

Debido a problemas en la cría de las lombrices no fue posible contar con suficiente número de individuos adultos para llevar a cabo el test de reproducción en todos los suelos muestreados. Para solventar esta situación se llevó a cabo una clasificación de todos los suelos muestreados a partir del índice de riesgo ecológico (RI, *ecological risk index*) de Hakanson (1980) con el fin de seleccionar un subgrupo de 12 muestras con el realizar el ensayo ecotoxicológico con lombrices.

El RI fue inicialmente concebido para conocer el riesgo ecológico que presentaban los metales pesados en sedimentos de lago, pero posteriormente se ha utilizado con éxito para estimaciones de riesgo ecológicos en todo tipo de suelos. La ecuación de RI es:

Dónde Er^i es el riesgo ecológico de cada elemento traza i , Tr^i es el factor de respuesta tóxica del elemento i (*toxic response factor*) y Cf^i es el factor de contaminación (*contamination factor*) definido como la relación entre la concentración del elemento i en la muestra y concentración del *background* de dicho elemento i . Inicialmente Hakanson (1980) desarrolló el método con ocho metales pesados (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn) pero otros autores siguiendo su metodología han desarrollado factores de respuesta tóxica para otros elementos. En la Tabla 21 se encuentran los elementos traza empleados en este estudio para el cálculo de RI con sus respectivos valores de Tr y los valores de *background* empleados en el cálculo del factor de contaminación. Puesto que son los únicos valores de toxicidad encontrados en la bibliografía referiremos nuestros resultados a los elementos traza indicados en la tabla.

Tabla 21: Valores del "factor de respuesta tóxica" (*Toxic response factor*) y concentraciones de *background* para los elementos traza empleados en la obtención del índice de riesgo.

Parámetro	As	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mo	Ni	Pb	Sb	Zn
<i>Toxic response factor</i> (Tr)	10 ^a	30 ^a	5 ^c	2 ^a	5 ^a	40 ^a	15 ^c	5 ^b	5 ^a	7 ^d	1 ^a
<i>Background</i> ^e	10,39	0,10	7,20	19,72	10,41	0,03	0,26	12,50	17,74	0,29	31,94

a) Lars Hakanson (1980); b) Jaiswal y Pandey (2018); c) Rehman *et al.* (2018); d) Wang *et al.* (2018); e) de Miguel *et al.* (2002).

Tras el cálculo del RI de cada uno de los suelos muestreados se llevó a cabo su ordenación de menor a mayor valor de RI, dividiéndose en cuartiles y seleccionando de forma distribuida en

cada cuartil tres suelos para obtener un grupo de suelos con un gradiente de RI. Únicamente en el cuartil que incluía mayores valores de IR se seleccionó el primer suelo del cuartil (igual que en los demás casos) y los dos suelos con los valores máximos de RI, con el fin de cubrir los suelos que podrían tener un mayor riesgo. En estos doce suelos seleccionados se llevó a cabo el test de reproducción de *Eisenia fetida*.

En la Tabla 22 se recogen los valores medios de los parámetros de valoración del test de reproducción (denominados *endpoints* en adelante) que corresponden a la cantidad de juveniles, de huevos sin eclosionar y a la variación de biomasa de las lombrices adultas entre el principio y el final del test. Tras la realización del análisis de la varianza (ANOVA) se observó que la variación de biomasa fue el único *endpoint* que mostró diferencias significativas entre los usos, en este caso entre los usos olivar y seco. En cuanto al número de juveniles y de huevos no hubo diferencias significativas entre usos, no obstante, en el uso forestal ambos *endpoints* fueron superiores a los encontrados en los suelos de cultivo. Entre los suelos de cultivo en el uso de seco la cantidad de juveniles fue superior, mientras que en el uso olivar la cantidad de huevos sin eclosionar fue superior.

Tabla 22: Valores medios de los parámetros de valoración (*endpoints*) del test de reproducción de *Eisenia fetida* más menos desviación típica. Distintas letras indican diferencias significativas entre los distintos usos ($p < 0,05$).

Uso	N	Juveniles	Huevos	Variación biomasa
Secano	4	37,9 ± 21,3a	5,17 ± 2,96a	0,34 ± 0,24a
Olivar	5	12,2 ± 11,2a	6,00 ± 7,04a	-0,34 ± 0,24b
Forestal	3	40,6 ± 34,0a	7,00 ± 1,91a	0,03 ± 0,12ab

Como puede apreciarse en las regresiones lineales múltiples de la Tabla 23 la concentración inmediatamente disponible (CaCl_2) ha sido el único índice de disponibilidad relacionado con alguno de los *endpoints* del test. Al encontrarse una relación positiva entre las concentraciones inmediatamente disponibles de Sb y As (SbC y AsC) con la cantidad de juveniles, no se han identificado efectos nocivos. Los parámetros físico-químicos de los suelos modularon los resultados del test, siendo posible llevar a cabo con ellos regresiones lineales múltiples para los tres *endpoints*. Tanto la cantidad de juveniles como de huevos sin eclosionar estuvieron afectados negativamente por la cantidad de SO_4^{2-} y Cl^- , al ejercer posiblemente una presión osmótica sobre los organismos (Ramsay, 1949). Idénticamente los óxidos de MnX y

FeA parecieron afectar negativamente a la cantidad de juveniles y a la variación de biomasa. Estos óxidos pueden estar formando complejos órgano-minerales con la materia orgánica dificultando el acceso de los organismos a ella, las correlaciones negativas del NSf con el MnX ($P<0,05$) en el uso de secano y del NSc con FeA ($P<0,05$) en el uso olivar reforzarían esta suposición. Por otro lado, el Pas mostró una aportación positiva a la variación de biomasa, pudiendo indicar que la materia orgánica beneficia al mantenimiento del peso de los organismos durante el test, las correlaciones positivas de Pas con COT ($P<0,05$) en el uso de secano y con NT y COT ($P<0,05$) en el uso forestal apoyarían este resultado.

Tabla 23: Regresiones lineales múltiples llevadas a cabo para explicar los parámetros de valoración (endpoints) obtenidos en el test de reproducción de *Eisenia fetida* en función de la disponibilidad de los elementos traza y de los parámetros físico-químicos de los suelos testeados.

Variables independientes	Endpoint	Ecuación	Significancia	R ² ajustado
Concentraciones totales	Juveniles	-	-	-
	Huevos	-	-	-
	Variación biomasa	-	-	-
DTPA	Juveniles	-	-	-
	Huevos	-	-	-
	Variación biomasa	-	-	-
CaCl ₂	Juveniles	juv= 0,475+1159,25 SbC+39,00 AsC	0,007	0,804
	Huevos	-	-	-
	Variación biomasa	-	-	-
Parámetros físico-químicos del suelo	Juveniles	juv=16,185-3,45 SO ₄ ²⁻ -0,66 MnX	0,011	0,648
	Huevos	h= 7,996-2,00 Cl ⁻	0,047	0,333
	Variación biomasa	vb= -1,151+0,5 Pas-1,93 FeA	0,008	0,673

- Acumulación de elementos traza en los tejidos de las lombrices

La cantidad de Hg en las lombrices (HgL) que estuvieron en suelos de uso forestal es superior a las que estuvieron en los otros usos (Tabla 24) posiblemente a causa de la relación que ha mostrado HgL con el NT, parámetro físico-químico del suelo superior en el uso forestal (Tabla 25). Sin embargo, HgL no ha mostrado influencia en los *endpoints* obtenidos, por lo que no consideramos que este elemento traza se encuentre en concentraciones tóxicas para los organismos empleados en el test. No obstante, la relación encontrada promueve que se tenga en consideración la concentración de Hg en la zona de estudio en el futuro. Para el resto de

elementos traza en los tejidos de las lombrices adultas no se encontraron diferencias significativas entre usos (Tabla 24).

Tabla 24: Concentraciones medias, más menos desviación típica, de los elementos traza en los tejidos de las lombrices adultas tras el test de reproducción llevado a cabo. Distintas letras indican diferencias significativas entre los distintos usos ($P < 0,05$).

Uso	N	AsL	CdL	CoL	CuL	HgL	SeL	ZnL
Secano	4	11,1 ± 2,4a	1,9 ± 0,3a	7,5 ± 1,2a	8,9 ± 1,0a	0,06 ± 0,001b	3,0 ± 2,19a	84,5 ± 3,7a
Olivar	5	9,3 ± 0,7a	1,8 ± 0,3a	6,4 ± 0,7a	8,5 ± 0,9a	0,07 ± 0,01b	1,6 ± 0,2a	86,8 ± 2,8a
Forestal	3	14,4 ± 8,9a	1,5 ± 0,6a	5,6 ± 1,1a	7,8 ± 0,8a	0,10 ± 0,02a	2,4 ± 0,9a	85,7 ± 5,3a

Las regresiones lineales múltiples llevadas a cabo con el fin de conocer de qué factores dependió las concentraciones de elementos traza en los tejidos de las lombrices adultas durante el test (Tabla 25), reflejan una gran influencia de las variables físico-químicas del suelo frente a la disponibilidad de elementos traza. Únicamente en el caso del Cd se observó que la concentración de Cd en la lombriz (CdL) depende, entre otros factores, de la concentración total de Cd en el suelo (CdT). Al igual que en el caso de HgL, al no haberse encontrado una influencia del CdT en los *endpoints* del test de reproducción no consideramos que este elemento traza se encuentre en concentraciones tóxicas, pero sí sería recomendable su monitoreo y control en el futuro.

Tabla 25: Regresiones lineales múltiples llevadas a cabo para explicar las concentraciones de los elementos traza presentes en las lombrices adultas empleadas en el test de reproducción en función de la disponibilidad de los elementos traza y de los parámetros físico-químicos de los suelos testados.

Elementos traza en las lombrices	Ecuación	Significancia	R ² ajustado
AsL	-	-	-
CdL	CdL= 0,31-3,18 NT+0,36 CSc+0,17 CdT-0,11 Cl ⁻	0,000	0,983
CoL	CoL= 2,34-0,31 NO ₂ ⁻	0,001	0,704
CuL	CuL= 2,29-0,27 COT+0,7 NSf+1,90 Mg ²⁺	0,004	0,873
HgL	HgL= 0,033+0,22 NT	0,002	0,845
SeL	SeL= 1,537-0,33 MnX+0,17 MnA	0,001	0,785
ZnL	ZnL= 4,00+0,135 Arc	0,015	0,441

4.6.2 Ensayo de elongación radicular con *Lactuca sativa*

El uso del suelo parece ejercer influencia principalmente en el porcentaje de germinación, puesto que fue el único *endpoint* del test que mostró una diferencia significativa entre los usos en el análisis de varianza llevado a cabo (Figura 35). El uso de secano mostró significativamente un mayor porcentaje de germinación (98,5%) que disminuyó en el uso olivar (97,4%) y fue menor en el forestal (96%). La elongación radicular (ER) no mostró diferencias entre los usos, si bien fue superior en el uso de secano (118,9 mm), seguida de olivar (113,3 mm) y, por último, de nuevo, el forestal (112,9 mm). A similitud con la elongación radicular, la elongación de hipocótilo (EH) no fue diferente significativamente entre los usos, sin embargo, en este caso, el uso olivar mostró las mayores elongaciones (101,3 mm), seguido del secano (100,4 mm) y por último, nuevamente, el uso forestal (98,8 mm). Inicialmente estos resultados destacaron, especialmente el porcentaje de germinación, puesto que se esperaba que todos los *endpoints* de este test fuesen superiores en el uso forestal al mostrar mayores valores de nutrientes, especialmente por sus mayores valores de C y N solubles. Posteriormente en el análisis de redundancia llevado a cabo con los parámetros físico-químicos del suelo como variables explicativas se proporciona una posible explicación para estas diferencias entre usos.

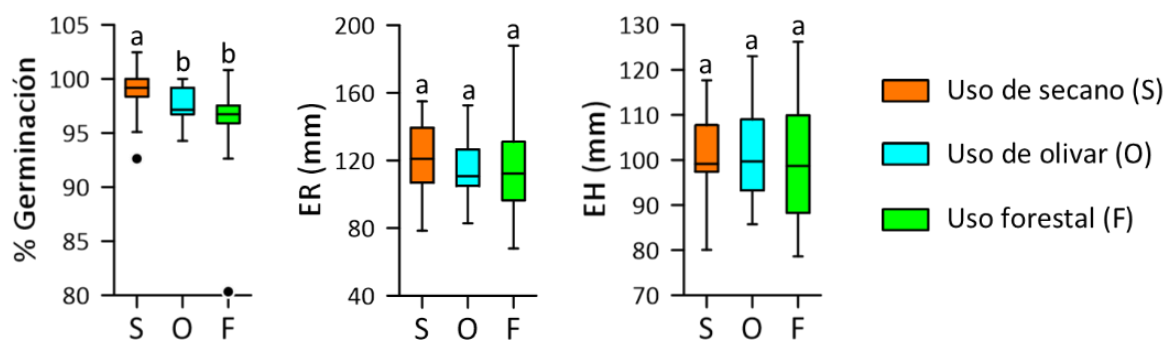


Figura 35: Porcentaje de germinación (%G), elongación radicular (ER) y elongación de hipocótilo (EH) obtenidos en el test de elongación radicular con *Lactuca sativa*. Diferencias estadísticamente significativas entre usos identificadas con distintas letras ($P < 0,05$).

4.6.2.1 Influencia de los parámetros físico-químicos de los suelos en el test de elongación radicular con *Lactuca sativa* en función del uso

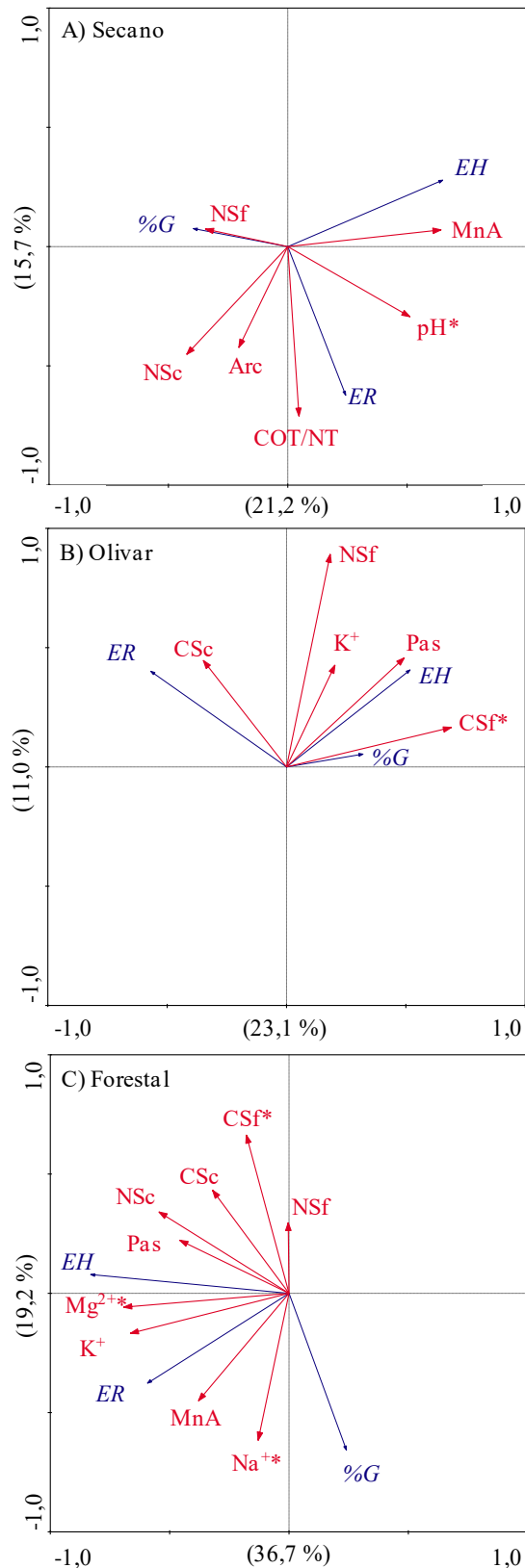
Los porcentajes de varianza explicada por los parámetros físico-químicos del suelo significativos ($P < 0,1$) son bajos, siendo el mayor en el RDA del uso forestal con un 36,8 %, pasando a un 12,4 % en el uso olivar y, por último, un 7,2 % en el uso de secano. Las variables estadísticamente significativas fueron diferentes para cada uso, siendo, por orden de significancia: i) secano: pH, ii) olivar: carbono soluble extraído en agua fría (CSf), y ii) forestal: Mg^{2+} , CSf y Na^{+} .

En el uso de secano (Figura 36.A) la variable explicativa significativa pH se ordena en el eje +1 del *biplot* situándose en la misma dirección que EH y ER, pero en oposición a %G por lo que altos valores de pH producirían un efecto inhibitorio en la germinación, mientras que el efecto sobre EH y ER sería positivo. Aunque no hayan sido identificadas como variables significativas el NSf, NSc y COT/NT, estos parámetros parecen afectar a %G, EH y ER respectivamente. NSf se ordenó junto al %G por lo que el nitrógeno soluble en frío parece mejorar este porcentaje, sin embargo, el nitrógeno soluble en caliente (NSc) se opone a la elongación de hipocótilo, dando a entender que compuestos más recalcitrantes de N ejercen una influencia negativa en EH. La ER en este uso se encuentra beneficiada por mayores ratios de COT/NT, lo que indicaría una utilidad e importancia mayor del C en el desarrollo radicular, al menos en las primeras etapas de crecimiento.

En el uso olivar (Figura 36.B) la única variable explicativa significativa fue el CSf ordenado junto al %G en el eje +1, de forma similar a lo que sucede en el uso de secano, la presencia de compuestos solubles de materia orgánica mejora la germinación. Aun sin ser significativa, el CSc se ordenó junto a la ER en el *biplot*, reforzando la hipótesis anterior sobre la mayor importancia de compuestos de C en el desarrollo radicular de las etapas iniciales de germinación. La EH por su parte se encontraría favorecida por el CSf, pero también por otros compuestos como el Pas y K^{+} , posiblemente necesarios para el desarrollo de la plántula.

En el uso forestal (Figura 36.C) las variables Mg^{2+} , Na^{+} y CSf fueron identificadas como significativas. Las variables respuesta EH y ER se ordenaron junto al Mg^{2+} en el eje -1, situándose a su alrededor, aunque no fuesen variables significativas, el Pas y K^{+} . En el eje 2 del *biplot* se situó el %G junto con el Na^{+} pero en oposición con los contenidos solubles de N y C,

al contrario que ocurría en los usos de cultivo. Como ya se ha observado, tanto en el uso de secano como en el uso forestal algunas variables físico-químicas de los suelos relacionadas con fracciones solubles de C y/o N afectarían negativamente a alguno de los *endpoints*



medidos: en el uso de secano NSc parece inhibir a EH y en el forestal CSf, NSf, CSc y NSc podrían hacerlo sobre %G. Una posible consistiría en la capacidad que tiene la vegetación de ambos usos de generar compuestos aleloquímicos con los que reducir la competencia en el suelo al impedir la correcta germinación y desarrollo de otras especies distintas a la propia (Bertin *et al.*, 2003; Callaway y Ridenour, 2004). Este aspecto ha sido ampliamente referenciado en los cultivos de trigo, mayoritarios en el uso de secano, y también en zonas forestales en las cuales, además, en función de las especies se pueden producir distintos compuestos en la descomposición de los restos vegetales (Hashoum *et al.*, 2017; Ma, 2005; Zuo *et al.*, 2014).

Figura 36 Ordenaciones generadas a partir del análisis de redundancia (RDA). Variables explicativas (parámetros físico-químicos del suelo) en rojo y variables respuesta (*endpoints* del test de elongación radicular) en azul. Abreviaturas: NSf nitrógeno soluble en frío, MnA óxidos de Mn-amorfo, NSc nitrógeno soluble en caliente, Arc contenido en arcillas, COT/NT ratio carbono orgánico total-nitrógeno total, CSc carbono soluble en caliente, K⁺ potasio de intercambio, Pas fósforo asimilable, CSf carbono soluble en frío, Mg²⁺ magnesio de intercambio y Na⁺ sodio de intercambio. Variables significativas ($P < 0,1$) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis.

4.6.2.2 Influencia de la disponibilidad de elementos traza en el test de elongación radicular con *Lactuca sativa* en función del uso

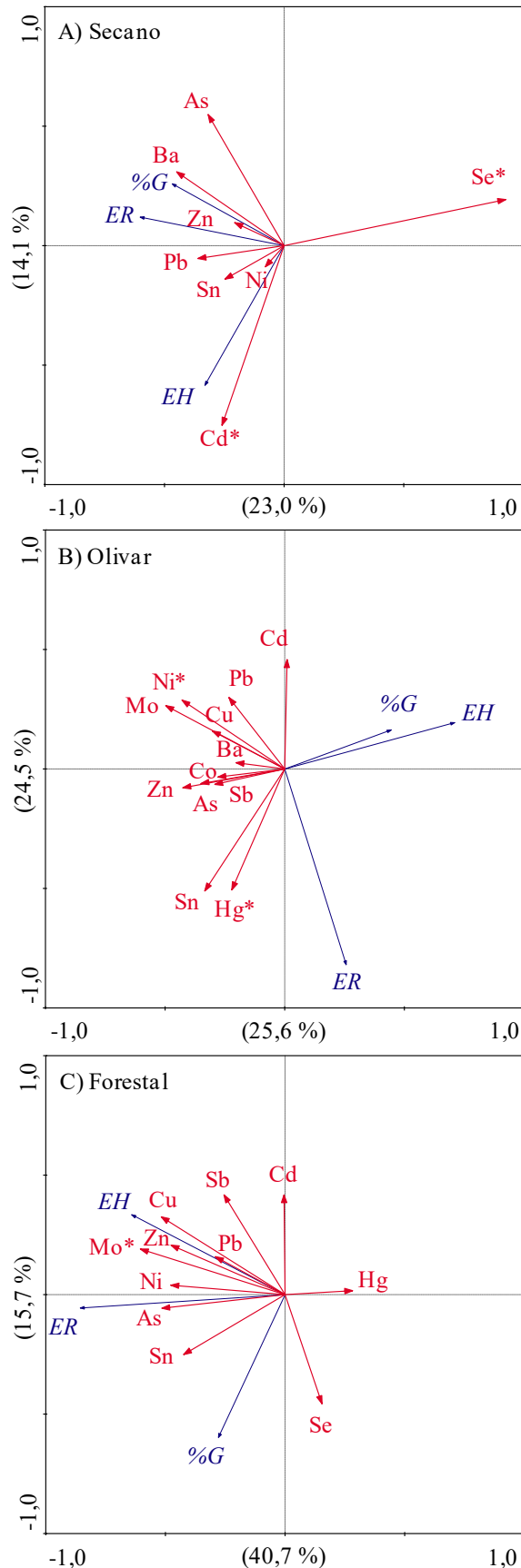
En los RDA realizados teniendo como variables explicativas los distintos índices de disponibilidad de elementos traza el porcentaje de varianza explicada fue distinto entre los usos y entre los distintos índices de disponibilidad (Tabla 26). Respecto a los contenidos totales el porcentaje de varianza explicada fue superior en el uso de secano, seguido del olivar y por último el forestal. En cuanto a las concentraciones potencialmente disponibles únicamente han sido definidas como explicativas significativas en el uso forestal, en el que además este porcentaje fue superior al obtenido con los contenidos totales. Las concentraciones inmediatamente disponibles sólo han sido identificadas como significativas en el uso de secano.

Tabla 26: Comparación de los porcentajes de varianza explicada en los análisis de redundancia (RDA) tomando como variables explicativas los distintos índices de disponibilidad de los elementos traza ($P < 0,1$) y como variables respuesta los endpoints del test de elongación radicular de *Lactuca sativa*

Uso	Disponibilidad	% Varianza explicada		
		Eje 1	Eje 2	Total
Secano	Totales	20,4	9,6	30
	DTPA	-	-	-
	CaCl ₂	12,4	9,4	21,8
Olivar	Totales	14,8	6	20,8
	DTPA	-	-	-
	CaCl ₂	-	-	-
Forestal	Totales	15,9	-	15,9
	DTPA	29,3	0,8	30,1
	CaCl ₂	-	-	-

- Concentraciones totales

En el *biplot* de los contenidos totales del uso de secano (Figura 37.A) se han identificado los contenidos totales de Se y Cd como variables explicativas significativas, siendo el Se el que mostró una mayor importancia. El Se se ordenó en el eje +1 en posición opuesta a las variables respuesta %G, ER y EH y, además, correlacionándose negativamente ($P < 0,05$) con esta última. Posiblemente el Se esté inhibiendo la germinación y el desarrollo de la plántula, de acuerdo



con Brady y Weil (2014) en suelos bien aireados con valores de pH entre 7,5 Y 8,5 el Se se encuentra predominantemente en forma de selenato (SeO_4^{2-}) y con frecuencia da lugar a toxicidades. El vector de Cd se sitúa en el eje -2 junto con el vector de EH, variable con cual se correlaciona positivamente ($P < 0,05$). Comparando este *biplot* con el obtenido para el test de germinación y elongación radicular de este uso con los parámetros físico-químicos del suelo (Figura 36.A) se observa como MnA se ordena junto a EH, por lo que, teniendo en cuenta que Cd se correlaciona positivamente con MnA ($P < 0,05$), la ordenación y relación entre EH y Cd se debería a una relación indirecta a través del MnA, en el que el Cd estaría ocupando las posiciones de cambio fácilmente disponibles.

En el uso olivar (Figura 37.B) los contenidos totales de Ni y Hg se identificaron como variables explicativas significativas. El vector de Ni se situó en la posición del eje -1 opuesto a %G y EH que lo hacen en +1. Dado que, se obtuvieron correlaciones negativas

Figura 37: Biplots de las ordenaciones generadas a partir de las concentraciones totales de elementos traza (variables explicativas, en rojo) y los endpoints del test de elongación de *Lactuca sativa* (variables respuesta, en azul). Variables significativas ($P < 0,1$) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis

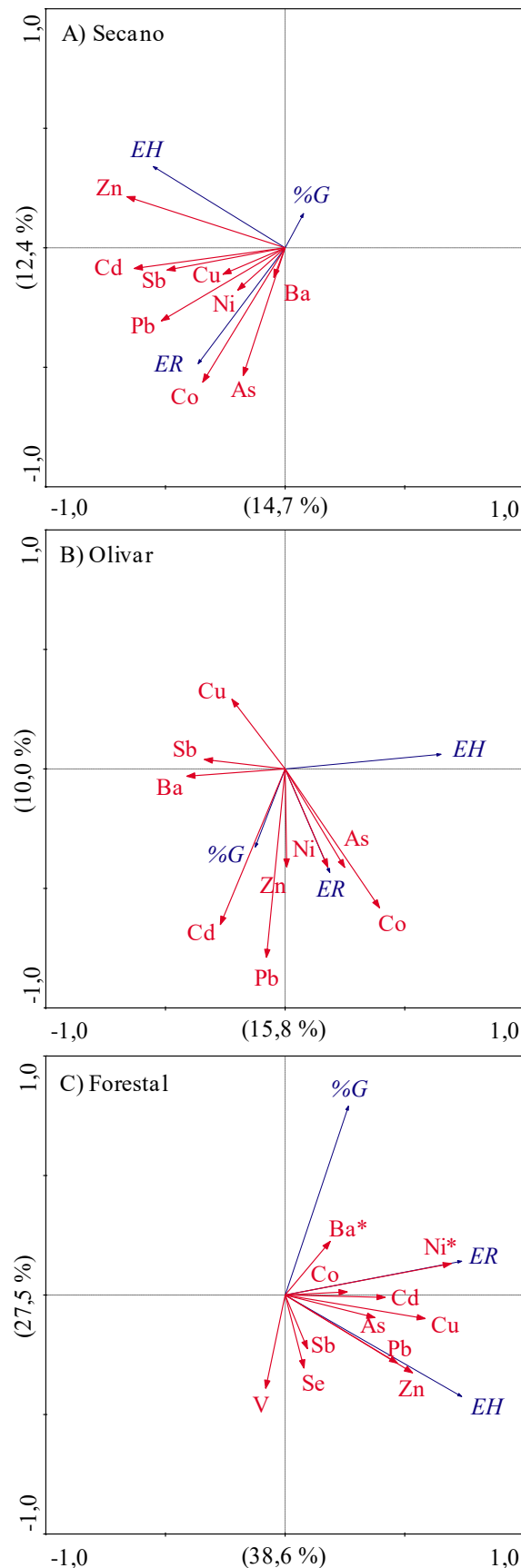
significativas entre el CSf con los elementos traza ordenados en el eje -1, junto al contenido total en Ni, y se obtuvieron correlaciones positivas entre estos elementos con los FeX y, por otro lado, tanto %G como EH se relacionan positivamente con el CSf, se podría interpretar que esta ordenación refleja la baja disponibilidad de los elementos traza indicados. La ordenación del contenido en Hg, que se ordena en el eje -2 junto a ER, reflejaría nuevamente que parte del contenido total de Hg se encuentra estrechamente ligado con la materia orgánica, ya que ER se ordenó previamente con CSc y el contenido total en Hg se correlacionó positivamente con dicho parámetro del suelo ($P < 0,01$). No obstante, dado el pequeño módulo de los vectores de las variables explicativas y el reducido porcentaje de varianza explicado por las variables significativas, estos resultados deben tratarse con precaución.

En el *biplot* del uso forestal (Figura 37.C) únicamente Mo fue identificado como variable explicativa significativa, nuevamente el menor módulo de los vectores explicativos y el bajo porcentaje de varianza explicado implicaría que la ordenación se encuentra dirigida principalmente por las relaciones entre sí de las propias variables respuesta. La ordenación de EH junto a ER se debe a la correlación que presentan ($P < 0,01$), mientras que por el contrario al no tener ninguna de estas variables correlación con %G el vector de esta variable se situó en una posición prácticamente ortogonal a las otras variables respuesta. La ordenación de los contenidos totales de los elementos traza podría representar la presencia de nutrientes en los coloides del suelo.

- Concentraciones potencialmente disponibles DTPA

En el uso de secano (Figura 38.A) el papel de las concentraciones potencialmente disponibles de los elementos traza analizados no es significativo, al no haberse identificado ninguno como variable explicativa significativa en la realización del RDA con el test de Montecarlo. A esto hay que añadirle que la ordenación de las variables respuesta en el *biplot* resultante responde a la falta de correlaciones entre ellas, generando que cada una de las tres variables respuesta sea ortogonal. Aun sin ser significativos la ordenación de los elementos traza podría indicar nuevamente la presencia de nutrientes disponibles en el suelo.

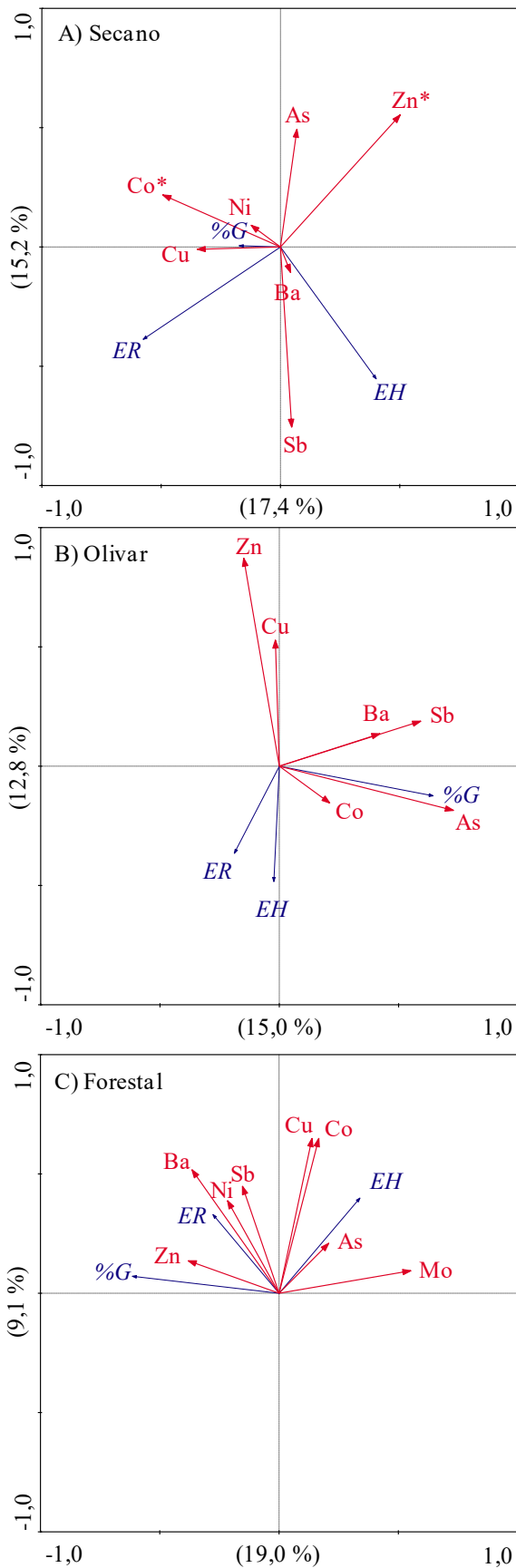
Esta misma situación se repite en los suelos de uso olivar (Figura 38.B) en los que ningún elemento traza ha sido identificado como variable explicativa significativa. En el eje 1 se alinean las concentraciones potencialmente disponibles de los elementos traza Ba, Cu y Sb en



oposición al vector de EH. Esta ordenación podría relacionarse con el papel de las arcillas en la formación de compuestos órgano-minerales que retuvieran estos elementos que a su vez fueran necesarios para la EH. En este sentido se pueden relacionar las arcillas de forma negativa con el CSf ($P < 0,05$) y el Sb de forma negativa con el NSf ($P < 0,01$). Por otro lado, la ordenación del resto de elementos traza en el entorno de la %G y ER (eje 2) sería indicativo de la disposición de dichos elementos en forma disponible.

Por último, en el RDA del uso forestal (Figura 38.C) se identificaron los contenidos potencialmente disponibles de Ni y Ba como variables explicativas significativas. En el eje 1 se situó el vector de Ni, junto a la mayoría de elementos traza, con los vectores de ER y EH. Los elementos traza que aparecen en este eje 1 se han relacionado con los coloides del suelo y con el contenido en NH_4^+ , por lo que la ordenación respondería a la relación de los nutrientes con los coloides. Por el contrario, la ordenación de Ba en el eje 2 con %G

Figura 38: Biplots de las ordenaciones generadas a partir de las concentraciones potencialmente disponibles de elementos traza (DTPA) (variables explicativas, en rojo) y los endpoints del test de elongación de *Lactuca sativa* (variables respuesta, en azul). Variables significativas ($P < 0,1$) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis.



respondería a la falta de correlación que tiene el Ba con los nutrientes, los cuales según los RDA con los parámetros-físico químicos del suelo (Figura 36.C) influían negativamente sobre el %G. Sin embargo, estos resultados deben tratarse con precaución ya que la capacidad resolutive de esta ordenación es escasa ya que los módulos de los vectores de las variables explicativas son menores que los de las variables respuesta.

- Concentraciones inmediatamente disponibles (CaCl₂)

En los RDA llevados a cabo con las concentraciones inmediatamente disponibles (CaCl₂) de los elementos traza analizados como variables explicativas, únicamente en el uso de secano ha sido posible identificar aportaciones significativas a los resultados de los test llevados a cabo con *Lactuca sativa*.

En el uso de secano (Figura 39.A) las concentraciones inmediatamente disponibles de Zn y Co se identificaron como variables explicativas significativas. El contenido en Zn se

Figura 39: Biplots de las ordenaciones generadas a partir de las concentraciones inmediatamente disponibles de los elementos traza (CaCl₂) (variables explicativas, en rojo) y los endpoints del test de elongación de *Lactuca sativa* (variables respuesta, en azul). Variables significativas (P<0,1) identificadas con *. Porcentajes de varianza explicada por las variables del gráfico en cada eje entre paréntesis.

ordenó en contraposición al vector de ER, pudiendo indicar un posible efecto negativo de este elemento en la elongación radicular. El contenido en Co se ordenó en el eje -1 junto con el %G, pudiendo favorecer la germinación de las semillas. Sin embargo, la escasa significancia de la ordenación provoca que las posibles interpretaciones de este RDA puedan carecer de importancia.

En el uso de olivar (Figura 39.B) ninguna variable fue definida como explicativa. En consonancia con lo indicado en la ordenación realizada con las concentraciones potencialmente disponibles descritas para los suelos de olivar (Figura 38.B) la oposición entre los vectores de Zn y Cu con EH y ER en este *biplot* remarca la baja disponibilidad de estos elementos. Los elementos traza As, Sb, Ba y Co se ordenaron junto a la variable respuesta %G que mostró una correlación positiva con el As ($P < 0,05$). Posiblemente estos elementos traza estén asociados con la materia orgánica en forma disponible. Nuevamente, la falta de variables significativas implica una baja importancia a esta ordenación.

En el uso forestal (Figura 39.C) ningún contenido inmediatamente disponible de los elementos traza analizados fue identificado como variable explicativa significativa. En el eje -1 del *biplot* del uso forestal el vector de Zn se ordenó junto al de %G, posiblemente debido a la mutua correlación negativa con el NSf, que como se observó en el RDA de los parámetros físico-químicos (Figura 36.C) parecían afectar negativamente el %G. El posicionamiento del resto de vectores, en el eje 2, podría deberse a su presencia en posiciones de intercambio relacionados con materia orgánica soluble o con su función como micronutrientes. Sin embargo, la falta de variables explicativas significativas y el menor módulo de estas variables explicativas generaría que esta ordenación tuviese un interés reducido.

4.7 Aplicación del análisis de redes a los suelos de estudios

En este estudio se ha investigado por separado la influencia en la funcionalidad del suelo de los parámetros físico-químicos del suelo y de la disponibilidad de elementos traza. Sin embargo, para conocer el estado funcional del suelo no es suficiente con determinar los posibles efectos de forma individualizada, es necesario tratar el suelo desde un punto de vista global. Kibblewhite et al. (2008) distinguen, por un lado, el cálculo de la calidad del suelo llevado a cabo a partir de la estimación de un set de indicadores independientes relacionados con propiedades específicas del suelo (físicas, químicas y biológicas), al que se refieren como un enfoque “reduccionista”. Por otro, al estudio de la calidad del suelo asumiendo que éste implica más que la suma de sus componentes ya que es posible que las interacciones entre los distintos procesos y propiedades del suelo puedan generar un sistema no lineal, es denominado por dichos autores enfoque “integrado”. Igualmente, Karlen et al. (1997) sostienen la necesidad de tratar al suelo desde un punto de vista dinámico al tratarse de un sistema vivo en el que se produce un balance entre las interacciones de sus parámetros físicos, químicos y biológicos. Al tratarse de un sistema dinámico se necesita un control periódico para poder conocer y actuar de forma preventiva sobre los posibles efectos adversos que se observen, permitiendo un acercamiento a un manejo más sostenible del suelo (Doran y Zeiss, 2000). El conocimiento de la dinámica de la funcionalidad del suelo y de cómo influyen determinadas prácticas puede ser un factor de conocimiento que facilite un acercamiento a conocer cómo funciona el suelo como ecosistema (Herrick, 2000).

Basándonos en la idea del suelo como un sistema dinámico sustentado en las relaciones existentes entre sus componentes físicos, químicos y biológicos, pensamos que emplear la herramienta del análisis de redes puede permitir conocer cómo son estas relaciones al reflejarlas en su conjunto, con la ventaja añadida de poder determinar qué propiedades son las que muestran una mayor importancia, cuales aportan un mayor valor cohesivo al suelo e incluso comparar el papel desempeñado por una misma propiedad en distintos suelos, todo ello a través del estudio de los parámetros que se obtienen para cada nodo en el análisis de redes. Así mismo, este análisis puede proveer de una herramienta, mediante los parámetros que definen a la red en su conjunto, para la comparación de suelos y para comparar la evolución e influencia de las prácticas que se lleven a cabo en un suelo.

Con el objetivo de obtener una red que refleje lo más fielmente posible cada uno de los usos estudiados y contando con la ventaja de haber determinado un gran abanico de propiedades físicas, químicas y biológicas se han realizado tres redes, en función del uso del suelo, aunando estas propiedades. Para ello se ha partido de las correlaciones bivariadas de Spearman significativas entre: parámetros físico-químicos del suelo, concentraciones totales, potencial e inmediatamente disponibles de los elementos traza determinados, actividades enzimáticas, perfil catabólico a nivel comunidad y contenido en ADN bacteriano, fúngico y de arqueas. En estos análisis de redes se ha determinado no emplear los resultados obtenidos del test de reproducción con *Eisenia fetida*, principalmente al no tener datos de todos los suelos estudiados y porque, ni los resultados del test de elongación con *Lactuca sativa*, ya que se tratan de organismos no presentes en el suelo. Solo se compararon las correlaciones existentes entre las concentraciones de las fracciones total, potencial e inmediatamente disponibles de un mismo elemento, no teniéndose en cuenta este tipo de correlaciones entre diferentes elementos. Por ejemplo, se tuvieron en cuenta por ejemplo las correlaciones tipo Cu total con Cu potencialmente disponible, pero no Pb total con Cu potencialmente disponible.

En la Figura 40 se muestran los tres grafos, para cada uso del suelo, resultantes de los análisis de redes llevados a cabo con las variables antes mencionadas. De forma intuitiva y como acercamiento inicial se puede apreciar que en el grafo del uso forestal la red es mucho más densa, es decir, existen una mayor cantidad de correlaciones, y los módulos formados en este uso están más interconectados entre sí que en los usos de cultivo. Por motivos de legibilidad en la figura no se han escrito los nombres de las variables, las redes con los nombres de las variables se encuentran en el Apéndice. La Tabla 27 muestra los parámetros que definen las redes obtenidas. Como se puede apreciar la cantidad de nodos es muy similar entre los tres usos del suelo posibilitando la comparación de las redes. La cantidad de aristas, el grado medio, el grado medio teniendo en cuenta los pesos, el diámetro de la red, la transitividad y la longitud media de camino mostraron claramente valores más favorables en el uso forestal. Todos estos parámetros indicarían que en la red del uso forestal todos los nodos, es decir todos los parámetros del suelo medidos, se encuentran más relacionados entre sí que en los usos agrícolas.

Entre los usos agrícolas se observaron diferencias entre el uso de secano y olivar en cuanto a los valores de los parámetros de red: aristas, grado medio y densidad, siendo más favorables en el uso olivar. Las diferencias que muestran los usos de cultivo en grado medio con pesos, diámetro, longitud media de camino y transitividad son más reducidas que en los parámetros anteriores, pero, no obstante, todos ellos son favorables al uso olivar respecto al de secano.

El único parámetro superior en los usos de cultivo con respecto al forestal, fue la modularidad, que resultó superior en el uso olivar, seguido de cerca del secano y con los suelos forestales mostrando el menor valor. Si el valor de la modularidad es cercano a cero o negativo indicaría que los módulos se han generado aleatoriamente a través de algoritmos, en cambio, para valores positivos indicaría que los módulos, no generados aleatoriamente, representan conjuntos de nodos con fuertes interacciones entre ellos y una función común (Alon, 2003). Por tanto, y como puede apreciarse visualmente en los grafos, y en la Tabla 27, los usos agrícolas, secano y olivar, muestran agrupaciones o módulos más aislados que el uso forestal, en el que aparecen más compactos. Estudios de modelización de redes han mostrado que sistemas sometidos a cambios repetitivos en las condiciones ambientales a las que se encuentran sometidos, tienden de forma natural a generar módulos con el objetivo de optimizar su funcionamiento, de esta forma un sistema compartimentado en módulos sería capaz de recuperarse más rápidamente tras una perturbación (Kashtan y Alon, 2005). Por tanto, es posible que los suelos de cultivo al encontrarse sujetos a cambios sucesivos y repetitivos a lo largo del tiempo, tales como los ciclos de arado, fertilización, siembra y cosecha, tiendan a generar módulos de una forma más marcada que los suelos naturales, a fin de optimizar las distintas funciones que en ellos se realizan. En tal caso, esto implicaría que los suelos agrícolas tuviesen una capacidad de adaptación a nuevas condiciones más rápida que los suelos forestales, puesto que estos últimos se encuentran en unas condiciones más estabilizadas a lo largo del tiempo. A nivel microbiológico esta capacidad de rápida adaptación tendría reflejo en una presencia mayor de microorganismos r-estrategas en los suelos agrícolas respecto a los suelos naturales, es decir que tienen la capacidad de adaptar rápidamente su población en función de la abundancia de nutrientes. Sin embargo, esta hipótesis no puede ser confirmada ni refutada a partir de los datos de este estudio, serían necesarios estudios posteriores enfocados en esta dirección.

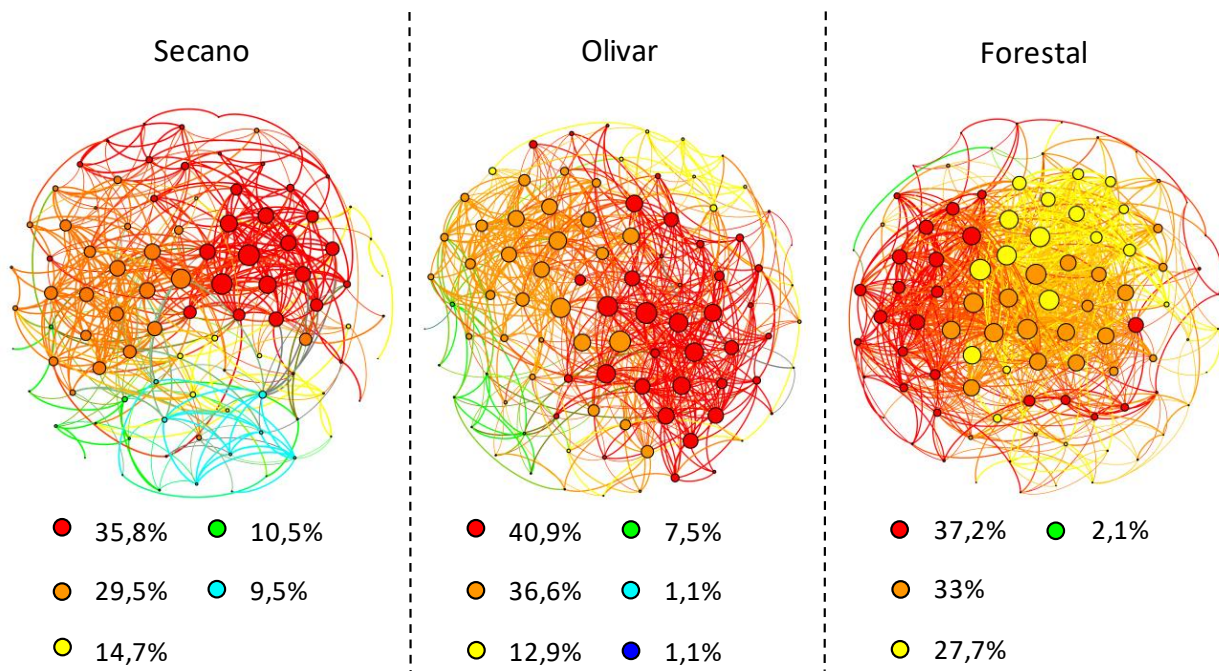


Figura 40: Grafos obtenidos a partir del análisis de redes realizado con las correlaciones bivariadas de Spearman significativas entre los parámetros físico-químicos del suelo, disponibilidad de elementos traza, actividades enzimáticas, perfil catabólico a nivel comunidad y cantidad de ADN. Los colores representan distintos módulos o grupos, los porcentajes representan a la cantidad de nodos que recoge el respectivo módulo. Mayor diámetro de los nodos representa un mayor valor de eigencentrality.

Tabla 27: Parámetros de las redes obtenidas para los usos secano, olivar y forestal pertenecientes a los grafos de la Figura 40.

Parámetro de red	Uso		
	Secano	Olivar	Forestal
Nodos	95	93	94
Aristas	495	644	957
Grado medio	10,4	13,9	20,4
Grado medio con pesos	3,1	3,8	6,7
Diámetro de red	6	5	4
Densidad	0,11	0,15	0,22
Modularidad	0,73	0,78	0,41
Transitividad	0,40	0,42	0,53
Longitud media	2,52	2,51	2,09

El siguiente paso que dimos en el estudio de las redes y de los módulos generados fue intentar asignar una función, o al menos identificar de alguna forma, cada módulo de los obtenidos. Para este cometido se estudiaron los parámetros del suelo que conformaban cada módulo en cada uno de los usos.

- Módulos del uso forestal

En el uso forestal el módulo que muestra un valor de eigencentrality medio más alto (0,48), y por tanto una importancia media de sus nodos superior en la red, podría definirse como el de “Disponibilidad” (Tabla 28) puesto que en él se encuentran casi todas las formas aniónicas de las analizadas en el suelo, sobresaliendo el K^+ que parece ejercer un rol principal. El K^+ puede provenir directamente de la liberación de restos vegetales en las primeras fases de degradación (Sardans y Peñuelas, 2015). En este módulo también se sitúan la mayoría de las concentraciones potencialmente disponibles, relacionadas positivamente con las variables MnA, FeX y arcillas, que parecen regular la disponibilidad de esta fracción de los elementos traza. En este módulo también se encuentran las concentraciones inmediatamente disponibles de Ni y Zn, posiblemente porque las variables anteriores, junto con el Pas que reduciría la disponibilidad inmediata de estos elementos al formarse fosfatos, regulan estas fracciones. En este módulo también se encuentran variables biológicas, con especial mención al color medio de pozo (AWCD), riqueza (S), índices de biodiversidad funcional de Simpson (D) y de Shannon (H') y el área bajo la curva del color medio de pozo (aAWCD), todas ellas resultados provenientes del estudio con placas Biolog EcoPlate. Dichas variables se encontrarían favorecidas por la presencia de compuestos solubles.

El segundo módulo de este uso con un valor de eigencentrality más alto (0,45), podría denominarse como “Complejo de cambio y Ciclo de nutrientes” (Tabla 28) puesto que, por una parte, en él ejerce un papel fundamental la CIC, que estaría principalmente regulada en este uso por las variables FeA y materia orgánica y, por otra parte, se relacionan las variables con el reciclado de nutrientes (degradación, aprovechamiento, mineralización, humificación, etc.), con una importante significación del contenido biológico del suelo, pues todas las actividades enzimáticas, a excepción de la deshidrogenasa y fenoloxidasa, junto con los contenidos de ADN bacteriano, fúngico y de arqueas se localizan en este módulo.

Tabla 28: Identificación de los módulos del uso forestal llevada a cabo con los parámetros analizados en este estudio que los conformarían y sus respectivos valores de eigencentrality. VME= valor medio de eigencentrality del módulo.

"Disponibilidad"		"Complejo de cambio y Ciclo de nutrientes"		"Elementos traza"		"Litología"	
Id	Eigencentrality	Id	Eigencentrality	Id	Eigencentrality	Id	Eigencentrality
K ⁺	0,97	FeA	1,00	PbT	0,86	SO ₄ ⁻	0,050
AWCD	0,95	CIC	0,96	pH	0,72	Cl ⁻	0,020
MnA	0,93	nag	0,94	CoT	0,72	VME	0,03
S	0,89	B	0,93	NiT	0,71		
D	0,87	aryls	0,89	CrT	0,70		
Arc	0,86	AG	0,85	BeT	0,68		
AsD	0,82	COT	0,73	VT	0,63		
H'	0,81	NT	0,67	dh	0,62		
FeX	0,78	bgal	0,65	A/B	0,57		
CoD	0,78	ure	0,57	BaT	0,55		
aAWCD	0,78	pac	0,55	ZnT	0,55		
NH ₄ ⁺	0,76	H	0,52	CaCO ₃	0,52		
CdD	0,76	A	0,48	SbT	0,48		
NiD	0,69	bglu	0,43	CuT	0,45		
Mg ²⁺	0,54	AR	0,38	aas	0,44		
CuD	0,41	aglu	0,34	CdT	0,41		
PbD	0,41	pak	0,22	AsT	0,38		
ZnD	0,38	AF	0,15	fo	0,35		
AmAm	0,33	t_mid	0,072	H/B	0,34		
MoT	0,17	aryln	0,054	Pol	0,32		
NiC	0,15	phos	0,048	Ca ²⁺	0,31		
ZnC	0,14	COT/NT	0,037	MnX	0,27		
Pas	0,14	Dist	0,036	NO ₃ ⁻	0,11		
p	0,13	HgT	0,022	SbD	0,096		
Na+	0,067	CE	0,019	WHC	0,089		
NO ₂ ⁻	0,067	AcC	0,013	CuC	0,081		
L	0,052	VME	0,44	NSc	0,059		
rAWCD	0,036			SeT	0,059		
VD	0,021			H/A	0,034		
BaD	0,020			NSf	0,029		
SnT	0,010			CSf	0,023		
VME	0,47			CoC	0,015		
				AsC	0,014		
				CSc	0,0055		
				CH	0,0046		
				VME	0,35		

Las actividades enzimáticas principales de este módulo son la N-acetil-glucosaminidasa y arilsulfatasa, y entre los contenidos en ADN el correspondiente a bacterias ejercería un rol predominante en este uso respecto a hongos y arqueas.

El tercer módulo del uso forestal (0,34 de eigencentrality medio) podría definirse como “Elementos traza” (Tabla 28), puesto que en él se encuentran 13 de las 16 concentraciones totales de elementos traza determinadas. La movilidad de estos elementos estaría controlada principalmente por el pH, el contenido en carbonato y en menor medida por los MnX. Las concentraciones inmediatamente disponibles de As, Co y Cu se encuentran en este módulo, sin embargo, su importancia en la red es muy escasa como para que sean significativos. En este módulo se encuentran variables biológicas entre las que sobresale la actividad deshidrogenasa, única actividad enzimática junto con la fenoloxidasa en este módulo, posiblemente por la presencia de la materia orgánica soluble, tanto en frío como en caliente, como fuente de nutrientes orgánicos. Resulta llamativa la separación efectuada entre la deshidrogenasa, que se encuentra en este módulo, y el resto de las actividades enzimáticas que se sitúan en el módulo anterior. Una posible hipótesis para tratar de esclarecer esta clasificación podría radicar en el hecho de que la deshidrogenasa es una endoenzima, mientras que el resto son exoenzimas que estarían mayoritariamente adsorbidas a las distintas partes del complejo de cambio. De la misma manera, la desconexión aparente entre el contenido en ADN de bacterias, hongos y arqueas con la deshidrogenasa podría ser debido a que parte de dicho ADN se encuentre adsorbido en el complejo de cambio y no provenga de microorganismos vivos.

En el cuarto y último módulo (0,04 de eigencentrality medio) se encuentran únicamente los cloruros y sulfatos, posible reflejo de la naturaleza evaporítica de la roca madre de estos suelos, denominando por tanto a este módulo como “Litología” (Tabla 28).

- Módulos de los usos de cultivo: olivar y secano

En módulo que muestra un mayor valor medio de eigencentrality en el uso de secano (0,438) (Tabla 29) podría identificarse con el “Complejo de cambio”, sin embargo, en el uso olivar (Tabla 30) este módulo representa el segundo mayor valor medio de eigencentrality (0,481). La mayor parte de las concentraciones totales de los elementos traza analizados se encuentran en este módulo, así como las variables FeX, FeA, MnX, MnA y arcillas que

intervendrían en su movilidad. En este módulo se incluye la CIC apareciendo junto a la fracción mineral, indicativo de su significación en los procesos de cambio, a diferencia del uso forestal que aparecía junto a la fracción orgánica. El rol del pH difiere entre los cultivos, siendo principal en el módulo “Complejo de cambio” en el uso olivar, en cambio, en el uso de secano se encuentra en el módulo “Disponibilidad” (Tabla 29). La presencia del pH en el uso de olivar en el módulo indicado reflejaría que las fracciones minerales, arcillas y óxidos, participarían a través de cargas variables, además de las cargas permanentes de las arcillas, en el complejo de cambio (Brady y Weil, 2014).

El segundo módulo en valor medio de eigencentrality en el uso de secano podría identificarse con el “Ciclo de nutrientes” (Tabla 29) al incluir las variables COT y NSf, NSc y CSc junto a la mayoría de las actividades enzimáticas y los contenidos de ADN de B, H y A. Al contrario que en secano, en el uso olivar este módulo (“Ciclo de nutrientes”, Tabla 30) muestra un valor medio de eigencentrality (0,483) ligeramente superior al módulo de “Complejo de cambio”. Siguiendo con el módulo “Ciclo de nutrientes”, ambos usos incluyen las variables de las concentraciones potencialmente disponibles de los elementos traza Ni, Pb y Co, por tanto, su disponibilidad se relacionaría con un mayor contenido en materia orgánica. A pesar de las similitudes de este módulo entre ambos usos, existen diferencias notables. Por una parte, las actividades enzimáticas principales en secano se relacionan con el ciclo del carbono (*bglu* y *aglu*), posiblemente señalando la necesidad de carbono por parte de los microorganismos en este uso, aspecto reforzado por la alta importancia que tiene en este uso el CSc, que es la forma de carbono soluble más recalcitrante, ya comentado y analizado anteriormente en este estudio. En el uso olivar las principales enzimas de la red son la *dh* y *nag*, posiblemente porque la necesidad de nitrógeno en este uso sea superior. Además, la actividad enzimática ureasa también ha mostrado uno de los mayores valores de eigencentrality, mientras que el NT, situado en el módulo correspondiente a “Disponibilidad” en el uso olivar, tiene muy poca importancia en la red.

Tabla 29: Identificación de los módulos del uso secano llevada a cabo con los parámetros analizados en este estudio que los conformarían y sus respectivos valores de eigencentrality. VME= valor medio de eigencentrality del módulo.

"Complejo de cambio"		"Ciclo de nutrientes"		"Biolog"		"Disponibilidad"	
Id	Eigencentrality	Id	Eigencentrality	Id	Eigencentrality	Id	Eigencentrality
CH	0,92	bglu	1,00	aAWCD	0,34	AG	0,24
Dist	0,75	aglu	0,98	AWCD	0,23	Pas	0,17
FeX	0,74	nag	0,83	ZnC	0,19	SbD	0,12
bgal	0,73	CSc	0,82	Pol	0,14	AR	0,09
Arc	0,68	phos	0,75	D	0,11	CoC	0,08
CIC	0,66	aryls	0,74	H'	0,11	NO ₂ ⁻	0,07
CrT	0,66	NT	0,72	S	0,10	ZnD	0,05
VT	0,61	H	0,72	NiC	0,033	CuC	0,03
CoT	0,61	H/A	0,69	AmAm	0,025	AsC	0,01
NiT	0,61	aryln	0,64	VME	0,14	SbC	0,01
A/B	0,58	B	0,60			SbT	0,26
PbT	0,53	K ⁺	0,60			CuT	0,25
MnA	0,53	pak	0,56			AsT	0,24
BeT	0,48	COT	0,55			pH	0,20
BaT	0,42	dh	0,52			NO ₃ ⁻	0,19
L	0,39	WHC	0,35			Cl ⁻	0,15
AsD	0,35	NiD	0,34			rAWCD	0,13
ure	0,27	A	0,32			MoT	0,066
CdT	0,26	NSc	0,31			NH ₄ ⁺	0,065
MnX	0,25	CaCO ₃	0,29			CuD	0,065
CdD	0,24	AcC	0,25			BaC	0,053
aas	0,22	Ca ²⁺	0,25			SO ₄ ²⁻	0,036
ZnT	0,21	AF	0,21			BaD	0,0043
p	0,20	pac	0,16			H/B	0,0043
NSf	0,10	Na ⁺	0,14			VME	0,11
SnT	0,091	PbD	0,13				
t_mid	0,084	HgT	0,13				
FeA	0,076	CE	0,091				
VME	0,44	phe	0,091				
		COT/NT	0,080				
		Mg ²⁺	0,073				
		CoD	0,053				
		SeT	0,022				
		CSf	0,010				
		VME	0,41				

Tabla 30: Identificación de los módulos del uso olivar llevada a cabo con los parámetros analizados en este estudio que los conformarían y sus respectivos valores de eigencentrality. VME= valor medio de eigencentrality del módulo.

"Ciclo de nutrientes"		"Complejo de cambio"		"Disponibilidad"	
Id	Eigencentrality	Id	Eigencentrality	Id	Eigencentrality
dh	1,00	pH	1,00	CSf	0,33
nag	0,95	FeX	0,92	pak	0,31
B	0,89	ZnT	0,83	Mg ²⁺	0,20
CoD	0,89	CaCO ₃	0,81	aryln	0,18
MnA	0,87	FeA	0,77	t_mid	0,16
ure	0,83	CoT	0,76	phos	0,14
H	0,82	CrT	0,75	CE	0,13
aglu	0,80	CIC	0,74	Cl ⁻	0,12
aAWCD	0,78	NiT	0,72	SO ₄ ²⁻	0,11
H'	0,74	BeT	0,71	AsC	0,01
A	0,73	PbT	0,63	BaD	0,11
aryls	0,72	Ca ²⁺	0,58	CuD	0,074
D	0,71	A/B	0,58	CuC	0,070
AsD	0,67	VT	0,54	SeT	0,067
bglu	0,67	SnT	0,54	SnC	0,064
AG	0,50	AR	0,54	BaC	0,055
S	0,48	fo	0,49	NO ₂ ⁻	0,054
CdD	0,45	BaT	0,47	NT	0,051
ZnD	0,40	AsT	0,43	ZnC	0,049
AWCD	0,37	H/A	0,40	CH	0,045
NSf	0,37	MoT	0,38	NO ₃ -	0,040
NSc	0,36	K ⁺	0,38	VME	0,11
NH ₄ ⁺	0,36	CuT	0,36		
NiD	0,35	CdT	0,33		
CSc	0,34	Arc	0,27		
COT	0,33	SbT	0,27		
COT/NT	0,28	Dist	0,26		
L	0,24	H/B	0,20		
PbD	0,24	AF	0,15		
pac	0,22	aas	0,15		
HgT	0,19	MnX	0,15		
rAWCD	0,17	Pas	0,10		
AmAm	0,17	CoC	0,064		
WHC	0,13	SbD	0,060		
bgal	0,13	VME	0,481		
ρ	0,093				
AcC	0,091				
Pol	0,014				
VME	0,483				

Una última distinción entre los dos usos de cultivo en este módulo es el distinto papel que juegan los contenidos de ADN. En ambos usos la importancia de bacterias y hongos en la red es alta, sin embargo, en el uso de secano el eigenvalue del ADN fúngico es superior al bacteriano, lo que denota un papel principal de los hongos, en consonancia con lo analizado anteriormente. En el uso olivar el papel de las bacterias es superior al de hongos, posiblemente relacionado con el ciclo del N como se observó al llevar a cabo los análisis de redundancia. En ambos usos la importancia del ADN de arqueas es inferior al de hongos y bacterias.

El tercer módulo en el uso olivar en función del valor medio de eigencentrality (0,113) podría identificarse como “Disponibilidad”, nuevamente existe una diferencia con el uso de secano, para el cual el valor medio de eigencentrality es el menor (0,107). En ambos tipos de suelo la importancia en la red de los nodos que se encuentran en estos módulos es reducida, encontrándose todos los valores de eigencentrality por debajo de 0,5. En el uso de secano los valores de eigencentrality de las variables concentración total de Sb, Cu y As se encuentran entre los más altos de este módulo en secano, diferenciándose en ello del uso olivar. Este aspecto podría indicar nuevamente la entrada de estos elementos traza en los suelos de secano, posiblemente debido al empleo de algún fitoquímico. En el módulo “Disponibilidad” del uso olivar se sitúan las actividades enzimáticas fosfatasa, fosfatasa alcalina y arilamidasa, de forma concordante a los módulos que se obtuvieron previamente en el estudio de las actividades enzimáticas, por lo que es posible que estas actividades enzimáticas tengan una relación mayor con las formas disponibles que el resto de enzimas en este uso.

Para finalizar, en la red del uso secano se ha identificado un último módulo denominado “Biolog”, puesto que en él se encuentran la mayor parte de los parámetros obtenidos mediante el empleo de placas Biolog EcoPlate al estudiar el perfil catabólico a nivel comunidad de los suelos, el valor medio de eigencentrality de este módulo ha sido superior al de “Disponibilidad”. La aparición de este módulo en secano, que no sucede en el resto de los usos, podría interpretarse como la capacidad de la población microbiana de los suelos más perturbados para responder a una variación en el medio, que en este caso serían los substratos en la placa Biolog, retornando al planteamiento expuesto anteriormente al hablar de las implicaciones de la modularidad de la red.

- *Consideraciones finales*

Comparando las redes y los módulos obtenidos para cada uno de los usos estudiados se puede observar como la principal diferencia entre los suelos agrícolas y el suelo forestal radica en la diferenciación de los módulos asociados al ciclo de nutrientes y al complejo de cambio. En los suelos forestales ambos módulos se unifican, mientras que en los usos de cultivo el papel de la materia orgánica es mucho menor, llegando además a no aparecer relacionarse con el complejo de cambio. En los suelos de secano se ha producido una diferenciación asociada al perfil catabólico a nivel comunidad, pudiendo indicar una diferencia en la capacidad de reacción de la comunidad microbiana de este uso. Las variables relacionadas con parámetros biológicos han mostrado, por lo general, valores altos de eigencentality mostrando que ejercen un rol principal en los suelos de estudio, entre estas variables las mayoritarias han sido actividades enzimáticas que se han diferenciado entre usos: i) en secano primaron las relacionadas con el ciclo del C, ii) en el uso olivar las de N, y iii) en forestal las de N y S, pudiendo representar las distintas necesidades de las poblaciones microbianas. Así mismo, los contenidos de ADN ejercen distintos papeles en cada uso, en el secano el aporte de los hongos es principal, mientras que en los usos olivar y forestal prima el papel de las bacterias, posiblemente por su función en el ciclo del N como se comentó anteriormente.

El empleo del análisis de redes ya se ha utilizado con éxito para establecer la respuesta de comunidades microbianas frente a distintas perturbaciones, tal y como muestra la revisión de Karimi et al. (2017). En nuestro estudio los resultados obtenidos a través del análisis de redes han reflejado diferencias entre los usos, ya determinadas y comentadas previamente y obtenidas en los análisis estadísticos efectuados. Que sepamos, el análisis de redes no ha sido utilizado nunca en el cometido de analizar un suelo en su conjunto mostrando en una imagen una aproximación a su estado global, por lo que es necesario en el futuro seguir trabajando con esta técnica para poder refinar la metodología de forma que el resultado sea mucho más robusto y de fácil interpretación. El empleo y desarrollo en el futuro de las técnicas de análisis de redes pueden aportar un punto de vista novedoso en el estudio de la funcionalidad de los suelos, ya que refleja de una forma más global el estado de la funcionalidad de un suelo y proporciona herramientas, como los parámetros de red y de nodo, que permiten evaluar esa funcionalidad mediante la comparación entre redes asociadas a distintos suelos o conocer la evolución de un mismo suelo a lo largo del tiempo. De esta forma se cubriría un espacio

necesario en la determinación objetiva de las interacciones entre las propiedades de los suelos en su conjunto (Bloem et al., 2005), aspecto esencial para establecer estrategias de manejo sostenibles en el suelo que no pongan en riesgo su funcionalidad en el futuro (Bünemann et al., 2018; Doran y Zeiss, 2000; Herrick, 2000; Karlen et al., 1997; Nortcliff, 2002; Parr et al., 1992).

5. Conclusiones

5. Conclusiones

El efecto del uso del suelo se puso de manifiesto principalmente sobre la materia orgánica y los parámetros físico-químicos relacionados con ella (COT, NT, COT/NT, CSc, CSf, NSc, NSf, WHC, pH, ρ , CIC, K⁺, NH₄⁺ y NO₂⁻) con valores inferiores en los suelos de cultivo respecto a los forestales. La mayor mineralización de la materia orgánica asociada a las prácticas agrícolas y un menor retorno de materia orgánica al suelo explican estos resultados. El fósforo asimilable en seco fue superior al encontrado en el resto de usos, asociado al empleo de fertilizantes fosfatados.

Las concentraciones en elementos traza totales y potencial e inmediatamente disponibles obtenidas fueron diferentes entre usos. Los únicos elementos traza para los que se encontraron diferencias significativas en las concentraciones totales fueron el Cu en seco, relacionado con el empleo de agroquímicos, y el Pb en forestal, relacionado con la materia orgánica. Los contenidos potencialmente disponibles para los que se encontraron diferencias significativas fueron Cu y Zn en seco, Cu en olivar y Cd, Pb y Zn en forestal. Únicamente se obtuvieron diferencias significativas para la fracción inmediatamente disponible de Co en el uso forestal.

La disponibilidad de los elementos traza muestra diferencias entre los usos dependiendo de la fracción mineral en los suelos de cultivo, especialmente de los óxidos de Fe y Mn, probablemente por los compuestos órgano-minerales en el uso forestal. En los tres usos la disponibilidad potencial de ciertos elementos traza (Cu, Pb y Zn) parece estar controlada al menos en parte por su precipitación como fosfatos. La menor distancia a Madrid ha sido identificada como variable explicativa significativa en los usos olivar y forestal en las concentraciones potencial e inmediatamente disponibles más elevadas de Ba y Sb e inmediatamente disponibles de As. En los usos forestal y olivar se puso de manifiesto la capacidad de retención de elementos traza por la fracción carbonatada de los suelos. La materia orgánica soluble resultó clave en las concentraciones inmediatamente disponibles de elementos traza (Co, Cu, Mo, Ni y Zn), particularmente en los suelos forestales.

El estudio de las actividades enzimáticas puso de manifiesto diferencias entre usos. El análisis de las actividades enzimáticas *aryls*, *nag* y *pak* permitió diferenciar entre los tres usos, siendo más elevadas en el forestal y menores en el olivar. En los suelos forestales las restantes actividades enzimáticas, excepto *bgal*, *phe* y *ure*, alcanzaron mayores valores que en los de cultivo.

En todos los usos, los parámetros físico-químicos del suelo que más influyeron en las actividades enzimáticas se relacionaron la cantidad (COT, NT) y calidad (CSf, CSc, NSf, NSc) de la materia orgánica. En los usos de cultivo destacó la influencia de la fracción mineral (óxidos y arcillas) en la actividad enzimática. La influencia negativa del material carbonatado se puso de manifiesto en los suelos de olivar y forestal.

El empleo conjunto del análisis de redes y el RDA permitió identificar dos patrones de actividades enzimáticas-componentes del suelo asociados a los suelos de cultivo: actividades enzimáticas-fracción orgánica recalcitrante y actividades enzimáticas-fracción orgánica lábil. En forestal no se produjo la distinción entre ambas fracciones.

La influencia de los parámetros físico-químicos del suelo sobre las actividades enzimáticas mostró una mayor significación que la debida a los elementos traza, no pudiéndose establecer, en la mayoría de los casos, una relación directa entre disponibilidad y actividades enzimáticas. Cuando se pudieron establecer las relaciones, éstas fueron mayoritariamente negativas y variaron en función del uso, ejerciendo una influencia superior las fracciones potencial e inmediatamente disponibles en los usos de cultivo.

El estudio del perfil catabólico a nivel de comunidad (CLPP) permitió diferenciar, a nivel de grupo funcional, los usos de cultivo (donde fueron mayoritarios los ácidos carboxílicos) del forestal (donde fueron mayoritarios los carbohidratos y las aminas/amidas). La velocidad de crecimiento en los usos de cultivo se relacionó con su mayor capacidad para catabolizar ácidos carboxílicos, mientras que en el forestal esta velocidad se relacionó con su mayor capacidad para catabolizar carbohidratos. El CLPP se relacionó con la materia orgánica y parámetros asociados, resultando limitante el nitrógeno total en los tres usos.

El uso olivar marcó la diferencia entre los tres usos estudiados respecto a la capacidad catabólica de la comunidad, contemplada a través de los parámetros color medio de pozo, ratio de crecimiento, área bajo la curva y tiempo medio de crecimiento y los índices de

biodiversidad de Simpson (D) y Shannon (H'). El efecto del CaCO₃ se observó tanto en olivar como en forestal, influyendo negativamente a AWCD, H' y aAWCD.

La significación de los elementos traza en el CLPP fue inferior a la mostrada por los parámetros físico-químicos del suelo. Únicamente el contenido total de Hg en el uso de secano mostró una influencia negativa sobre el color medio de pozo y el índice H'.

El contenido en ADN de bacterias, hongos y arqueas fue siempre superior en el uso forestal e inferior en el uso olivar. Las relaciones establecidas entre el ADN de estos organismos fueron, siempre, superiores en el uso de secano e inferiores en el forestal.

En los tres usos, los contenidos en ADN se relacionaron con la materia orgánica (COT, NT, C/N, CSf). En el uso de secano se puso de manifiesto la participación de los hongos en el ciclo del P. En los usos olivar y forestal, el material carbonatado afectó negativamente sobre el contenido en ADN de los tres tipos de microorganismos, con una intensidad más marcada en el caso de las bacterias. En el uso olivar, la formación de compuestos órgano-minerales entre arcilla y la fracción soluble de la materia orgánica explicó el efecto negativo del contenido en arcillas sobre el ADN de bacterias y arqueas. En el uso forestal, la participación de las arcillas en el complejo de cambio explicó el efecto positivo del contenido en arcillas sobre el ADN de bacterias y arqueas.

La significación de los parámetros físico-químicos de los suelos de estudio fue mayor que la proporcionada por la disponibilidad de los elementos traza a la hora de explicar los contenidos de ADN obtenidos.

El ensayo de reproducción de *Eisenia fetida* mostró en el uso olivar un descenso en la biomasa de los individuos. La influencia de los parámetros físico-químicos del suelo en este ensayo fue superior a la de elementos traza. El acceso a la materia orgánica y el contenido aniónico jugaron un papel decisivo, influyendo en los *endpoints* cantidad de huevos, de juveniles y la variación de biomasa.

Los elementos traza acumulados por las lombrices se relacionaron únicamente con los parámetros físico-químicos del suelo, hizo excepción la concentración de Cd acumulada que se relacionó con el contenido total de Cd en los suelos. La concentración de Hg acumulada en *Eisenia fetida* fue mayor en suelos forestales que en los de cultivo.

El ensayo de germinación y elongación radicular efectuado sobre *Lactuca sativa* permitió distinguir entre los usos. Los porcentajes de germinación fueron inferiores en los usos olivar y forestal. La influencia de aleloquímicos pudo motivar la reducción de la germinación en los suelos forestales.

Los parámetros físico-químicos del suelo, particularmente con la fracción orgánica soluble y los cationes de cambio, tuvieron una mayor influencia que la disponibilidad de elementos traza. Únicamente el contenido total en Se del uso de secano produjo una inhibición de la germinación y elongación radicular.

Las actividades enzimáticas mostraron ser bioindicadores sensibles de la afectación de la funcionalidad del suelo en función de los tres usos estudiados y de la disponibilidad de elementos traza. El perfil catabólico a nivel de comunidad y los contenidos de ADN de bacterias, hongos y arqueas mostraron ser bioindicadores sensibles de la afectación de la funcionalidad del suelo diferenciando entre cultivo y forestal.

El análisis de redes ha mostrado ser una herramienta útil en la diferenciación entre los tres usos del suelo estudiados. Asociado al análisis de redundancia ha permitido la identificación de patrones y ha proporcionado una imagen del estado global del suelo de cada uno de los usos estudiados.

La incorporación de estas técnicas de análisis en el desarrollo de futuros estudios puede aportar un punto de vista novedoso a la hora de evaluar la funcionalidad del suelo, comparar entre usos e incluso conocer la evolución de un mismo suelo a lo largo del tiempo.

6. Referencias bibliográficas

- Acosta-Martínez, V., Tabatabai, M.A., 2001. Arylamidase activity in soils: Effect of trace elements and relationships to soil properties and activities of amidohydrolases. *Soil Biol. Biochem.* 33, 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00109-7)
- Adriano, D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments. Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. Springer- Verlag, New York.
- Albanese, S., Sadeghi, M., Lima, A., Cicchella, D., Dinelli, E., Valera, P., Falconi, M., Demetriades, A., De Vivo, B., Andersson, M., Baritz, R., Batista, M.J., Bel-lan, A., Birke, M., W. De Vos, Duris, M., Dusza-Dobek, A., Eggen, O.A., Eklund, M., Ernstsén, V., Filzmoser, P., Flight, D.M.A., Forrester, S., Fuchs, M., Fugedi, U., Gilucis, A., Gosar, M., Gregorauskiene, V., De Groot, W., Gulán, A., Halamic, J., Haslinger, E., Hayoz, P., Hoffmann, R., Hoogewerff, J., Hrvatovic, H., Husnjak, S., Janik, L., Jordan, G., Kaminari, M., Kirby, J., Klos, V., Krone, F., Kwecko, P., Kuti, L., Ladenberger, A., Locutura, J., Lucivjansky, P., Mann, A., Mackovych, D., McLaughlin, M., Malyuk, B.I., Maquil, R., Meuli, R.G., Mol, G., Negrel, P., O'Connor, P., Oorts, K., Ottesen, R.T., Pasieczna, A., Petersell, V., Pfeleiderer, S., Ponavic, M., Prazeres, C., Rauch, U., Radusinovic, S., Reimann, C., Salpeteur, I., Scanlon, R., Schedl, A., Scheib, A., Schoeters, I., Sellersjo, E., Slaninka, I., Soriano-Disla, J.M., Sorsa, A., Svrkota, R., Stafilov, T., Tarvainen, T., Trendavilov, V., Verougstraete, V., Vidojevic, D., Zomeni, Z., 2015. GEMAS: Cobalt, Cr, Cu and Ni distribution in agricultural and grazing land soil of Europe. *J. Geochemical Explor.* 154, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2015.01.004>
- Alloway, B.J., 2013. Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils, Heavy metals in soils. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-1344-1>
- Alon, U., 2003. Biological networks: The tinkerer as an engineer. *Science* (80-.). 301, 1866–1867. <https://doi.org/10.1126/science.1089072>
- Alvarez, L., Aliashkevich, A., De Pedro, M.A., Cava, F., 2018. Bacterial secretion of D-arginine controls environmental microbial biodiversity. *ISME J.* 12, 438–450. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.176>
- Antonella Di Benedetto, N., Rosaria Corbo, M., Campaniello, D., Pia Cataldi, M., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Flagella, Z., 2017. The role of Plant Growth Promoting Bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. *AIMS*

- Microbiol. 3, 413–434. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>
- Argyaki, A., Kelepertzis, E., Botsou, F., Paraskevopoulou, V., Katsikis, I., Trigoni, M., 2018. Environmental availability of trace elements (Pb, Cd, Zn, Cu) in soil from urban, suburban, rural and mining areas of Attica, Hellas. *J. Geochemical Explor.* 187, 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2017.09.004>
- Baldock, J.A., Skjemstad, J.O., 2000. Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. *Organic Geochemistry*, 31, 697–710. *Org. Geochem.* 31, 697–710.
- Balesdent, J., Chenu, C., Balabane, M., 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil Tillage Res.* 53, 215–230. <https://doi.org/10.1504/wremsd.2016.074966>
- Barberán, A., Bates, S.T., Casamayor, E.O., Fierer, N., 2012. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J.* 6, 343–351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.119>
- Bardgett, R.D., McAlister, E., 1999. The measurement of soil fungal:bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biol. Fertil. Soils* 29, 282–290. <https://doi.org/10.1007/s003740050554>
- Beare, M.H., Cabrera, M.L., Hendrix, P.F., Coleman, D.C., 1994. Aggregate-Protected and Unprotected Organic Matter Pools in Conventional- and No-Tillage Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 787–795. <https://doi.org/10.2136/sssaj1994.03615995005800030021x>
- Beare, M.H., Hu, S., Coleman, D.C., Hendrix, P.F., 1997. Influences of mycelial fungi on soil aggregation and organic matter storage in conventional and no-tillage soils. *Appl. Soil Ecol.* 5, 211–219. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(96\)00142-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(96)00142-4)
- Bengtson, P., Sterngren, A.E., Rousk, J., 2012. Archaeal abundance across a pH gradient in an arable soil and its relationship to bacterial and fungal growth rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5906–5911. <https://doi.org/10.1128/AEM.01476-12>
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., Köberl, M., 2016. The plant microbiome explored: Implications for experimental botany. *J. Exp. Bot.* 67, 995–1002.

<https://doi.org/10.1093/jxb/erv466>

- Bertin, C., Yang, X., Weston, L.A., 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256, 67–83. <https://doi.org/10.1023/A:1026290508166>
- Bissett, A., Abell, G.C.J., Brown, M., Thrall, P.H., Bodrossy, L., Smith, M.C., Baker, G.H., Richardsson, A.E., 2014. Land-use and management practices affect soil ammonia oxidiser community structure, activity and connectedness. *Soil Biol. Biochem.* 78, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.020>
- Bissett, A., Richardson, A.E., Baker, G., Thrall, P.H., 2011. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. *Appl. Soil Ecol.* 51, 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.08.010>
- Bloem, J., Schouten, A.J., Sørensen, S.J., Rutgers, M., Werf, A. van der, Breure, A.M., 2005. Monitoring and evaluating soil quality., *Microbiological methods for assessing soil quality.* <https://doi.org/10.1079/9780851990989.0023>
- BOE (1990) Real Decreto 1310/1990 de 29 de octubre por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 262 de 1 de noviembre de 1990, pp 32339–32340, BOE-A-1990-26490.
- Bohlen, P.J., 2017. Earthworms, in: Lal, R. (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science*. Taylor & Francis, pp. 701–705.
- Böhlke, J.K., 2002. Groundwater recharge and agricultural contamination. *Hydrogeol. J.* 10, 153–179. <https://doi.org/10.1007/s10040-001-0183-3>
- Bolan, N.S., Adriano, D.C., Kunhikrishnan, A., James, T., McDowell, R., Senesi, N., 2011. Dissolved Organic Matter. *Biogeochemistry, Dynamics, and Environmental Significance in Soils.*, 1st ed, *Advances in Agronomy*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385531-2.00001-3>
- Brady, N.C., Weil, R.R., 2014. *The Nature and Properties of Soils*, 14th ed. Pearson.
- Brodowska, M.S., Kurzyńska-Szklarek, M., Haliniarz, M., 2016. Selenium in the environment. *J. Elem.* 21, 1173–1185. <https://doi.org/10.5601/jelem.2016.21.2.1148>
- Bueno, C.S., Ladha, J.K., 2009. Comparison of soil properties between continuously cultivated

- and adjacent uncultivated soils in rice-based systems. *Biol. Fertil. Soils* 45, 499–509.
<https://doi.org/10.1007/s00374-009-0358-y>
- Bünemann, E.K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R.E., De Deyn, G., de Goede, R., Fleskens, L., Geissen, V., Kuyper, T.W., Mäder, P., Pulleman, M., Sukkel, W., van Groenigen, J.W., Brussaard, L., 2018. Soil quality – A critical review. *Soil Biol. Biochem.*
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.01.030>
- Bünemann, E.K., Schwenke, G.D., Van Zwieten, L., 2006. Impact of agricultural inputs on soil organisms - A review. *Aust. J. Soil Res.* 44, 379–406. <https://doi.org/10.1071/SR05125>
- Burges, A., Epelde, L., Garbisu, C., 2015. Impact of repeated single-metal and multi-metal pollution events on soil quality. *Chemosphere* 120, 8–15.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.037>
- Burns, R.G., 1982. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.* 14, 423–427. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90099-2)
- Calderón, F.J., Jackson, L.E., Scow, K.M., Rolston, D.E., 2000. Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1547–1559.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00067-5)
- Callaway, R.M., Ridenour, W.M., 2004. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Front. Ecol. Environ.* 2, 436–443.
- Campbell, C.D., Grayston, S.J., Hirst, D.J., 1997. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 30, 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00041-9)
- Chaer, G.M., Fernandes, M.F., Myrold, D.D., Bottomley, P.J., 2009. Shifts in Microbial Community Composition and Physiological Profiles across a Gradient of Induced Soil Degradation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 73, 1327. <https://doi.org/10.2136/sssaj2008.0276>
- Chaperon, S., Sauvé, S., 2008. Toxicity interactions of cadmium, copper, and lead on soil urease and dehydrogenase activity in relation to chemical speciation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.026>
- Chaudhuri, D., Tripathy, S., Veeresh, H., Powell, M.A., Hart, B.R., 2003. Relationship of

- chemical fractions of heavy metals with microbial and enzyme activities in sludge and ash-amended acid lateritic soil from India. *Environ. Geol.* 45, 115–123.
<https://doi.org/10.1007/s00254-003-0864-4>
- Cheng, C., Zhao, D., Lv, D., Shuang, L., Du, G., 2017. Comparative study on microbial community structure across orchard soil, cropland soil, and unused soil. *Soil Water Res.* 12, 237–245. <https://doi.org/10.17221/177/2016-SWR>
- Chodak, M., Gołebiewski, M., Morawska-Płoskonka, J., Kuduk, K., Niklińska, M., 2013. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Appl. Soil Ecol.* 64, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.11.004>
- Climate-data, 2019) <https://es.climate-data.org/>(Accedido 25 febrero 2019).
- Codling, E.E., Dao, T.H., 2007. Short-term effect of lime, phosphorus, and iron amendments on water-extractable lead and arsenic in orchard soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 38, 903–919. <https://doi.org/10.1080/00103620701277783>
- Comunidad de Madrid, 2019. Inventario de suelos contaminados.
http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition&blobheadervalue1=filename%3Dmgr_cit_13710_Inventario+de+suelos.pdf&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1352901094451&ssbinary=true
(Accedido 25 febrero 2019)
- Coppolecchia, D., Puglisi, E., Vasileiadis, S., Suciú, N., Hamon, R., Maria Beone, G., Trevisan, M., 2011. Relative sensitivity of different soil biological properties to zinc. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1798–1807. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.06.018>
- Costanza, R., D'Arge, R., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260.
- Creamer, R.E., Hannula, S.E., Leeuwen, J.P.V., Stone, D., Rutgers, M., Schmelz, R.M., Ruiters, P.C. d., Hendriksen, N.B., Bolger, T., Bouffaud, M.L., Buee, M., Carvalho, F., Costa, D., Dirilgen, T., Francisco, R., Griffiths, B.S., Griffiths, R., Martin, F., Silva, P.M. da, Mendes, S., Morais, P. V., Pereira, C., Philippot, L., Plassart, P., Redecker, D., Römbke, J., Sousa, J.P., Wouterse, M., Lemanceau, P., 2016. Ecological network analysis reveals the inter-

connection between soil biodiversity and ecosystem function as affected by land use across Europe. *Appl. Soil Ecol.* 97, 112–124.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.006>

Datta, R., Anand, S., Moulick, A., Baraniya, D., Pathan, S.I., Rejsek, K., Vranova, V., Sharma, M., Sharma, D., Kelkar, A., Formanek, P., 2017. How enzymes are adsorbed on soil solid phase and factors limiting its activity: A Review. *Int. Agrophysics* 31, 287–302.

<https://doi.org/10.1515/intag-2016-0049>

de Menezes, A., Prendergast-Miller, M.T., Richardson, A.E., Toscas, P., Farrell, M., Macdonald, L.M., Baker, G., Wark, T., Thrall, P.H., 2014. Network analysis reveals that bacteria and fungi form modules that correlate independently with soil parameters.

Environ. Microbiol. 17, 2677–2689. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12559>

de Miguel, E., Callaba, A., Arranz, J.C., Cala, V., Chacón, E., Gallego, E., Alberruche, E., Alonso, C., Fernández-Canteli, P., Iribarren, I., Palacios, H., 2002. Determinación de niveles de fondo y niveles de referencia de metales pesados y otros elementos traza en los suelos de la Comunidad Autónoma de Madrid. IGME.

De Miguel, E., Llamas, J.F., Chacón, E., Mazadiego, L.F., 1999. Sources and pathways of trace elements in urban environments: A multi-elemental qualitative approach. *Sci. Total Environ.* 235, 355–357. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00234-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00234-X)

De Santiago-Martín, A., Cheviron, N., Quintana, J.R., González, C., Lafuente, A.L., Mougin, C., 2013a. Metal contamination disturbs biochemical and microbial properties of calcareous agricultural soils of the Mediterranean area. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 388–398. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9842-8>

De Santiago-Martín, A., Valverde-Asenjo, I., Quintana, J.R., Vázquez, A., Lafuente, A.L., González-Huecas, C., 2013b. Metal extractability patterns to evaluate (potentially) mobile fractions in periurban calcareous agricultural soils in the Mediterranean area — analytical and mineralogical approaches. *Env. Sci Pollut Res* 20, 6392–6405.

<https://doi.org/10.1007/s11356-013-1684-z>

DeForest, J.L., 2009. The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and l-

- DOPA. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1180–1186. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.02.029>
- Degens, B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P., Vojvodic-Vukovic, M., 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 32, 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00141-8)
- Dick, R.P., 1997. Soil Enzyme Activities as Integrative Indicators of Soil Health, in: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. CABI, pp. 121–156.
- Diosma, G., Aulicino, M., Chidichimo, H., Balatti, P.A., 2006. Effect of tillage and N fertilization on microbial physiological profile of soils cultivated with wheat. *Soil Tillage Res.* 91, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.still.2005.12.008>
- Doran, J.W., Zeiss, M.R., 2000. Soil health and sustainability: *managing* the biotic component of soil quality. *Appl. Soil Ecol.* 15, 3–11. <https://doi.org/10.1016/S0929-Get>
- Edelstein, M., Ben-Hur, M., 2018. Heavy metals and metalloids: Sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 234, 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.039>
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1990. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biol. Biochem.* 22, 891–897. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90126-K](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90126-K)
- Escudey, M., Aburto, F., Cazanga, M., Calderón, R., Molina, M., 2011. Trace Element Composition of Selected Fertilizers Used in Chile: Phosphorus Fertilizers as a Source of Long-Term Soil Contamination. *Soil Sediment Contam. An Int. J.* 18, 497–511. <https://doi.org/10.1080/15320380902962320>
- European Commission (1986) European Commission Council Directive 86/278/EEC of 12 June 1986 on the protection of the environment, y in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Off J Eur Comm L* 181:6–12.
- Fanin, N., Moorhead, D., Bertrand, I., 2016. Eco-enzymatic stoichiometry and enzymatic vectors reveal differential C, N, P dynamics in decaying litter along a land-use gradient. *Biogeochemistry* 129, 21–36. <https://doi.org/10.1007/s10533-016-0217-5>
- FAO, GTIS, 2015. *Estado Mundial del Recurso Suelo (EMRS) – Resumen Técnico*.

- Farrah, H., Hatton, D., Pickering, W.F., 1980. The affinity of metal ions for clay surfaces. *Chem. Geol.* 28, 55–68. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(80\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0009-2541(80)90035-2)
- Floch, C., Capowiez, Y., Criquet, S., 2009. Enzyme activities in apple orchard agroecosystems: How are they affected by management strategy and soil properties. *Soil Biol. Biochem.* 41, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.018>
- Frey, S.D., Six, J., Elliott, E.T., 2003. Reciprocal transfer of carbon and nitrogen by decomposer fungi at the soil-litter interface. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1001–1004. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00155-X)
- Gall, J.E., Boyd, R.S., Rajakaruna, N., 2015. Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environ. Monit. Assess.* 187. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4436-3>
- Garland, J.A.Y.L., Mills, A.L., 1991. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351–2359.
- Geilfus, C.M., 2019. Chloride in soil: From nutrient to soil pollutant. *Environ. Exp. Bot.* 157, 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.035>
- Geisseler, D., Scow, K.M., 2014. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. *Soil Biol. Biochem.* 75, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.023>
- 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 Biol. Biochem.* 35, 1231–1243. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00186-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00186-X)
- Gianfreda, L., Rao, M.A., Piotrowska, A., Palumbo, G., Colombo, C., 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: Intensive agricultural practices and organic pollution. *Sci. Total Environ.* 341, 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.10.005>

- Giller, K.E., Witter, E., Mcgrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1389–1414. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00270-8)
- Girvan, M., Newman, M.E.J., 2002. Community structure in social and biological networks 99, 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.122653799>
- Glenk, K., McVittie, A., Moran, D., 2012. Deliverable D3 . 1 : Soil and Soil Organic Carbon within an Ecosystem Service Approach Linking Biophysical and Economic Data 43.
- Goldberg, S., 1989. Interaction of aluminum and iron oxides and clay minerals and their effect on soil physical properties: A review. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 20, 37–41. <https://doi.org/10.1080/00103629009368144>
- Goldberg, S., Forster, H.S., Godfrey, C.L., 1996. Molybdenum Adsorption on Oxides, Clay Minerals, and Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 425–432. <https://doi.org/10.2136/sssaj1996.03615995006000020013x>
- Gomes, R.A., Gratão, P.L., Gaziola, S.A., Mazzafera, P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2007. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. *Funct. Plant Biol.* 34, 449–456. <https://doi.org/10.1071/FP07010>
- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., Bending, G.D., 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agric. Ecosyst. Environ.* 113, 17–35. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.09.009>
- Guéguen, F., Stille, P., Dietze, V., Gieré, R., 2012. Chemical and isotopic properties and origin of coarse airborne particles collected by passive samplers in industrial, urban, and rural environments. *Atmos. Environ.* 62, 631–645. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.08.044>
- Gupta, U.C., Lipsett, J., 1981. Molybdenum in soils, plants, and animals, *Advances in Agronomy*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60885-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60885-8)
- Hackett, C.A., Griffiths, B.S., 1997. Methods Statistical analysis of the time-course of Biolog substrate utilization 30, 63–69.
- Hagmann, D.F., Goodey, N.M., Mathieu, C., Evans, J., Aronson, M.F.J., Gallagher, F., Krumins,

- J.A., 2015. Effect of metal contamination on microbial enzymatic activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 91, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.012>
- Hahne, H.C.H., Kroontje, W., 1973. Significance of pH and Chloride Concentration on Behavior of Heavy Metal Pollutants: Mercury(II), Cadmium(II), Zinc(II), and Lead(II). *J. Environ. Qual.* 2, 444. <https://doi.org/10.2134/jeq1973.00472425000200040007x>
- Hakanson, L., 1980. An ecological risk index for aquatic pollution control. a sedimentological approach. *Water Res.* 14, 975–1001.
- Hansel, C.M., Fendorf, S., Jardine, P.M., Francis, C.A., 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1620–1633. <https://doi.org/10.1128/AEM.01787-07>
- Hashoum, H., Santonja, M., Gauquelin, T., Saatkamp, A., Gavinet, J., Greff, S., Lecareux, C., Fernandez, C., Bousquet-Mélou, A., 2017. Biotic interactions in a Mediterranean oak forest: role of allelopathy along phenological development of woody species. *Eur. J. For. Res.* 136, 699–710. <https://doi.org/10.1007/s10342-017-1066-z>
- He, D., Shen, W., Eberwein, J., Zhao, Q., Ren, L., Wu, Q.L., 2017. Diversity and co-occurrence network of soil fungi are more responsive than those of bacteria to shifts in precipitation seasonality in a subtropical forest. *Soil Biol. Biochem.* 115, 499–510. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.023>
- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>
- Hendrix, P.F., Parmelee, R.W., Crossley, D. a, Coleman, D.C., Odum, P., Groffman, P.M., 1986. Detritus Food in Webs and Conventional Agroecosyste No-tillage. *Bioscience* 36, 374–380.
- Herrick, J.E., 2000. Soil quality: An indicator of sustainable land management? *Appl. Soil Ecol.* 15, 75–83. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00073-1](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00073-1)
- Holland, E.A., Coleman, D.C., 1987. Litter Placement Effects on Microbial and Organic Matter Dynamics in an Agroecosystem. *Ecology* 68, 425–433.

- Hooda, P.S., 2013. Trace Elements in Soils, *Journal of Chemical Information and Modeling*.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Hörtensteiner, S., 2006. Chlorophyll Degradation During Senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 55–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105212>
- Hörtensteiner, S., 1999. Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 330–347.
- Hou, J., Liu, G., Fu, W., Liang, B., Liu, X., 2014. Sensitive crop species and appropriate bioassays for potential use in phytotoxicity assessment of Pb-contaminated soils. *Chem. Ecol.* 30, 463–472. <https://doi.org/10.1080/02757540.2013.873032>
- Huntington, T., 2006. Available water capacity and soil organic matter. *Encyclopedia of Soil Science*. *Encycl. Soil Sci.*
- Insam, A.H., Amor, K., Renner, M., Crepaz, C., 1996. Changes in Functional Abilities of the Microbial Community During Composting Manure. *Ecology* 31, 77–87.
- Ishikawa, N., Yanaka, M., Ishioka, G., Takata, K., Murakami, M., 2015. Effects of Ammonium Chloride Fertilizer and its Application Stage on Cadmium Concentrations in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grain. *Plant Prod. Sci.* 18, 137–145.
<https://doi.org/10.1626/pps.18.137>
- ISO, 2018. ISO 20130 Soil quality-Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-wells plates.
- ISRIC, 2002. *Procedures for Soil Analysis*, 3rd ed. International Soil Reference and Information Center, Wageningen.
- IUSS Working Group WRB, 2015. Base referencial mundial del recurso suelo 2014, Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. *Informes sobre recursos mundiales de suelos* 106. FAO, Roma.
- Jabran, K., 2017. Manipulation of Allelopathic Crops for Weed Control.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-53186-1>
- Jabran, K., Mahajan, G., Sardana, V., Chauhan, B.S., 2015. Allelopathy for weed control in

- agricultural systems. *Crop Prot.* 72, 57–65.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.03.004>
- Jaiswal, D., Pandey, J., 2018. Impact of heavy metal on activity of some microbial enzymes in the riverbed sediments: Ecotoxicological implications in the Ganga River (India). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.015>
- Janusauskaite, D., Kadziene, G., Auskalniene, O., 2013. The Effect of Tillage System on Soil Microbiota in Relation to Soil Structure. *Polish J. Environ. Stud.* 22, 1387–1391.
- Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B., 2007. *Trace Elements from Soil to Human*. Springer International Publishing.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. *Trace Elements in Soils and Plants*, 3rd ed, Trace Elements in Soils and Plants, Third Edition. CRC, Boca Ratón.
<https://doi.org/10.1201/9781420039900>
- Kainiemi, V., Kirchmann, H., Kätterer, T., 2016. Structural disruption of arable soils under laboratory conditions causes minor respiration increases. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 179, 88–93. <https://doi.org/10.1002/jpln.201500139>
- Kandeler, E., Stemmer, M., Klimanek, E.-M., 1999. Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biol. Biochem.* 31, 261–273. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00115-1)
- Kang, I.M., Kong, I.C., 2016. Effects of properties of metal-contaminated soils on bacterial bioluminescence activity, seed germination, and root and shoot growth. *Springerplus* 5. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1774-8>
- Karimi, B., Maron, P.A., Chemidlin-Prevost Boure, N., Bernard, N., Gilbert, D., Ranjard, L., 2017. Microbial diversity and ecological networks as indicators of environmental quality. *Environ. Chem. Lett.* 15, 265–281. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0614-6>
- Karlen, D.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F., Schuman, G.E., 1997. Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation (A Guest Editorial). *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 4. <https://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x>
- Kashtan, N., Alon, U., 2005. Spontaneous evolution of modularity and network motifs. *PNAS*

102, 13773–13778.

- Kasuga, N.C., Onodera, K., Nakano, S., Hayashi, K., Nomiya, K., 2006. Syntheses , crystal structures and antimicrobial activities of 6-coordinate antimony (III) complexes with tridentate and semicarbazone ligands 100, 1176–1186.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.037>
- Katayama, N., Bouam, I., Koshida, C., Baba, Y.G., 2019. Biodiversity and yield under different land-use types in orchard/vineyard landscapes: A meta-analysis. *Biol. Conserv.* 229, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.11.020>
- Keeney, D.R., Nelson, D.W., 1982. Nitrogen-Inorganic forms, in: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2- Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy & Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 643–698.
- Kelepertzis, E., Argyraki, A., 2015. Geochemical associations for evaluating the availability of potentially harmful elements in urban soils: Lessons learnt from Athens, Greece. *Appl. Geochemistry* 59, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.03.019>
- Kelepertzis, E., Botsou, F., Patinha, C., Argyraki, A., Massas, I., 2018. Agricultural geochemistry in viticulture: An example of Cu accumulation and geochemical fractionation in Mediterranean calcareous soils (Nemea region, Greece). *Appl. Geochemistry* 88, 23–39. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2017.04.013>
- Kelepertzis, E., Paraskevopoulou, V., Argyraki, A., Fligos, G., Chalkiadaki, O., 2015. Evaluation of single extraction procedures for the assessment of heavy metal extractability in citrus agricultural soil of a typical Mediterranean environment (Argolida, Greece). *J. Soils Sediments* 15, 2265–2275. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1163-x>
- Kibblewhite, M.G., Ritz, K., Swift, M.J., 2008. Soil health in agricultural systems. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 685–701. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2178>
- Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Rădulescu, D., 1975. Biological significance of enzymes accumulated in soil. *Adv. Agron.* 27, 25–87. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)70007-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)70007-5)

- Klimek, B., Sitarz, A., Choczyński, M., Niklińska, M., 2016. The Effects of Heavy Metals and Total Petroleum Hydrocarbons on Soil Bacterial Activity and Functional Diversity in the Upper Silesia Industrial Region (Poland). *Water, Air, Soil Pollut.* 227, 265.
<https://doi.org/10.1007/s11270-016-2966-0>
- Konopka, A., Oliver, L., Turco, R.F.J., 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microb. Ecol.* 35, 103–115.
<https://doi.org/10.1007/s002489900065>
- Kouchou, A., Rais, N., Thoisy, J.C., Duplay, J., Ghazi, M., Elsass, F., Ijjaali, M., El Ghachtouli, N., 2017. Behavior of Enzyme Activities Exposed to Contamination by Heavy Metals and Dissolved Organic Carbon in Calcareous Agricultural Soils. *Soil Sediment Contam.* 26, 259–276. <https://doi.org/10.1080/15320383.2017.1289499>
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C., 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments - A review. *Waste Manag.* 28, 215–225.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.012>
- Kuźniar, A., Banach, A., Stępniewska, Z., Frąć, M., Oszust, K., Gryta, A., Kłos, M., Wolińska, A., 2018. Community-level physiological profiles of microorganisms inhabiting soil contaminated with heavy metals. *Int. Agrophysics* 32, 101–109.
<https://doi.org/10.1515/intag-2016-0096>
- Lal, R., 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* (80-.). 304, 1623–1627. <https://doi.org/10.1126/science.1097396>
- Lal, R., 1998. Critical Reviews in Plant Sciences Soil Erosion Impact on Agronomic Productivity and Environment Quality Soil Erosion Impact on Agronomic Productivity and Environment Quality. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 319–464.
- Lamb, D.T., Matanitobua, V.P., Palanisami, T., Megharaj, M., Naidu, R., 2013. Bioavailability of barium to plants and invertebrates in soils contaminated by barite. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4670–4676. <https://doi.org/10.1021/es302053d>
- Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., Fierer, N., 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2407–2415. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.021>

- Li, X., Lee, S.I., Wong, S.C., Shi, W., Thornton, I., 2004. The study of metal contamination in urban soils of Hong Kong using a GIS-based approach. *Environ. Pollut.* 129, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.030>
- Li, X., Meng, D., Li, J., Yin, H., Liu, H., Liu, X., Cheng, C., Xiao, Y., Liu, Z., Yan, M., 2017. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. *Environ. Pollut.* 231, 908–917. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.057>
- Lindsay, W.L., Norwell, W.A., 1978. Deveopment of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 421–428.
- Lindstrom, J.O.N.E., Barry, R.P., Braddock, J.F., 1998. MICROBIAL COMMUNITY ANALYSIS : A KINETIC APPROACH TO CONSTRUCTING POTENTIAL C SOURCE UTILIZATION PATTERNS 30, 231–239.
- Llorente, M., Glaser, B., Turrión, M.B., 2017. Effect of land use change on contents and distribution of monosacharides within density fractions of calcareous soil. *Soil Biol. Biochem.* 107, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.01.013>
- Lowdermilk, W.C., 1953. Conquest of the land through 7,000 years. *Agric. Inf. Bull.* 99.
- Luo, L., Gu, J.D., 2016. Nutrient limitation status in a subtropical mangrove ecosystem revealed by analysis of enzymatic stoichiometry and microbial abundance for sediment carbon cycling. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.023>
- Lupatini, M., Suleiman, A.K.A., Jacques, R.J.S., Antonioli, Z.I., de Siqueira Ferreira, A., Kuramae, E.E., Roesch, L.F.W., 2014. Network topology reveals high connectance levels and few key microbial genera within soils. *Front. Environ. Sci.* 2, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00010>
- Lupwayi, N.Z., Rice, W.A., Clayton, G.W., 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1733–1741. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00025-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00025-X)
- Ma, Y., 2005. Allelopathic studies of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Weed Biol. Manag.* 5, 93–104. <https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2005.00164.x>

- Madrid, C.A. de, CSIC, 1990. Mapa de Asociaciones de Suelos de la Comunidad de Madrid.
- Manoharan, L., Kushwaha, S.K., Ahrén, D., Hedlund, K., 2017. Agricultural land use determines functional genetic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 115, 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.011>
- Manta, D.S., Angelone, M., Bellanca, A., Neri, R., Sprovieri, M., 2002. Heavy metals in urban soils: a case study from the city of Palermo (Sicily), Italy. *Sci. Total Environ.* 300, 229–243. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00273-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00273-5)
- Marschner, P., 2012. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, Third Edit. ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1007/s13142-013-0222-3>
- Martin Calvarro, L., de Santiago-Martín, A., Quirós Gómez, J., González-Huecas, C., Quintana, J.R., Vázquez, A., Lafuente, A.L., Rodríguez Fernández, T.M., Ramírez Vera, R., 2014. Biological activity in metal-contaminated calcareous agricultural soils: The role of the organic matter composition and the particle size distribution. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 6176–6187. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2561-0>
- Matschullat, J., 2000. Arsenic in the geosphere - A review. *Sci. Total Environ.* 249, 297–312. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00524-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00524-0)
- Mausel, Paul W., 1971. Soil quality in Illinois-an example of a soils geography resource analysis, *The Professional Geographer*, 23:2, 127-136, DOI: 10.1111/j.0033-0124.1971.00127.x
- McLauchlan, K., 2006. The nature and longevity of agricultural impacts on soil carbon and nutrients: A review. *Ecosystems* 9, 1364–1382. <https://doi.org/10.1007/s10021-005-0135-1>
- Micó, C., Recatalá, L., Peris, M., Sánchez, J., 2006. Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere* 65, 863–872. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.016>
- Montgomery, H.J., Monreal, C.M., Young, J.C., Seifert, K.A., 2000. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1207–1217. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00037-7)

- Muñoz-Rojas, M., Erickson, T.E., Dixon, K.W., Merritt, D.J., 2016. Soil quality indicators to assess functionality of restored soils in degraded semiarid ecosystems. *Restor. Ecol.* 24, S43–S52. <https://doi.org/10.1111/rec.12368>
- Murray McBride, 1994. Environmental Chemistry of Soils, *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Myers, R.T., Zak, D.R., White, D.C., Peacock, A., 2010. Landscape-Level Patterns of Microbial Community Composition and Substrate Use in Upland Forest Ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65, 359. <https://doi.org/10.2136/sssaj2001.652359x>
- Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J., 2003. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Sci. Total Environ.* 311, 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00139-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00139-6)
- Nortcliff, S., 2002. Standardisation of soil quality attributes. *Agric. Ecosyst. Environ.* 88, 161–168. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00253-5](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00253-5)
- Nourbakhsh, F., Monreal, C.M., 2004. Effects of soil properties and trace metals on urease activities of calcareous soils. *Biol. Fertil. Soils* 40, 359–362. <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0786-7>
- Nsabimana, D., Haynes, R.J., Wallis, F.M., 2004. Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomass as affected by land use. *Appl. Soil Ecol.* 26, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.12.005>
- Nziguheba, G., Smolders, E., 2008. Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *Sci. Total Environ.* 390, 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.09.031>
- Obrist, D., Johnson, D.W., Lindberg, S.E., 2009. Mercury concentrations and pools in four sierra nevada forest sites, and relationships to organic carbon and nitrogen. *Biogeosciences* 6, 765–777. <https://doi.org/10.5194/bg-6-765-2009>
- Offre, P., Spang, A., Schleper, C., 2013. Archaea in Biogeochemical Cycles. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 437–457. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155614>
- Ohtonen, R., 1994. Accumulation of organic matter along a pollution gradient: Application of

odum's theory of ecosystem energetics. *Microb. Ecol.* 27, 43–55.

<https://doi.org/10.1007/BF00170113>

Olander, L.P., Vitousek, P.M., 2000. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability 175–190.

Olsen, S.R., Sommers, L.E., 1982. Phosphorus, in: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2- Chemical and Microbiological Properties Microbiological and Biochemical Properties*. American Society of Agronomy & Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 403–430.

Osunbitan, J.A., Oyedele, D.J., Adekalu, K.O., 2005. Tillage effects on bulk density, hydraulic conductivity and strength of a loamy sand soil in southwestern Nigeria. *Soil Tillage Res.* 82, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.05.007>

Ouyang, Y., Norton, J.M., Stark, J.M., Reeve, J.R., Habteselassie, M.Y., 2016. Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil. *Soil Biol. Biochem.* 96, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.01.012>

Parr, J.F., Papendick I, R., Hornick B, S., Meyer E, R., 1992. Soil Quality: Attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture. *Am. J. Altern. Agric.* 7, 5–11.

Pérez, E., García, P., 2016. Monitoring soil sealing in Guadarrama River Basin, Spain, and its potential impact in agricultural areas. *Agric.* 6. <https://doi.org/10.3390/agriculture6010007>

Preston-Mafham, J., Lynne, B., Randerson, P.F., 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation protocols - a critique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00990.x>

Qualls, R.G., 2005. Biodegradability of fractions of dissolved organic carbon leached from decomposing leaf litter. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1616–1622. <https://doi.org/10.1021/es049090o>

Qureshi, N., Patil, R., Shinde, M., Umarji, G., 2015. Innovative biofilm inhibition and anti-microbial behavior of molybdenum sulfide nanostructures generated by microwave-

- assisted solvothermal route 331–341. <https://doi.org/10.1007/s13204-014-0322-5>
- Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., O'Halloran, T.V., 1999. Undetectable intracellular free Copper: The requirement of a Cu chaperone for SOD. *Science* (80-.). 284, 805–808.
- Ramsay, J.A., 1949. The osmotic relations of the earthworm. *J. Exp. Biol.* 26, 46–56.
- Rashid, M.I., Mujawar, L.H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I.M.I., Oves, M., 2016. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiol. Res.* 183, 26–41.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.007>
- Rasmussen, P.E., Rohde, C.R., 1989. Soil acidification from ammonium-nitrogen fertilization in moldboard plow and stubble-mulch wheat-fallow tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 119–122. <https://doi.org/10.2136/sssaj1989.03615995005300010022x>
- Rehman, I. ur, Ishaq, M., Ali, L., Khan, S., Ahmad, I., Din, I.U., Ullah, H., 2018. Enrichment, spatial distribution of potential ecological and human health risk assessment via toxic metals in soil and surface water ingestion in the vicinity of Sewakht mines, district Chitral, Northern Pakistan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 154, 127–136.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.033>
- Renella, G., Ortigoza, A.L.R., Landi, L., Nannipieri, P., 2003. Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED50). *Soil Biol. Biochem.* 35, 1203–1210.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00181-0)
- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret, C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, 305–339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- Rutgers, M., 2008. Field effects of pollutants at the community level - Experimental challenges and significance of community shifts for ecosystem functioning. *Sci. Total Environ.* 406, 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.05.055>
- Rutgers, M., Wouterse, M., Drost, S.M., Breure, A.M., Mulder, C., Stone, D., Creamer, R.E.,

- Winding, A., Bloem, J., 2016. Monitoring soil bacteria with community-level physiological profiles using Biolog TM ECO-plates in the Netherlands and Europe. *Appl. Soil Ecol.* 97, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.06.007>
- Sahuquillo, A., Rigol, A., Rauret, G., 2003. Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 22, 152–159. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00303-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00303-0)
- Saidy, A.R., Smernik, R.J., Baldock, J.A., Kaiser, K., Sanderman, J., Macdonald, L.M., 2012. Effects of clay mineralogy and hydrous iron oxides on labile organic carbon stabilisation. *Geoderma* 173–174, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.12.030>
- Sardans, J., Peñuelas, J., 2015. Potassium: A neglected nutrient in global change. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 24, 261–275. <https://doi.org/10.1111/geb.12259>
- Sauvadet, M., Chauvat, M., Cluzeau, D., Maron, P.A., Villenave, C., Bertrand, I., 2016. The dynamics of soil micro-food web structure and functions vary according to litter quality. *Soil Biol. Biochem.* 95, 262–274. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.01.003>
- Schaefer, R., 1963. Dehydrogenase activity as a measurement of the global biological activity of soil. *Ann. l'Institut Pasteur* 105, 326–331.
- Scott, J., 2000. *Social Network Analysis. A handbook*, 2nd ed. SAGE publications.
- Shah, A.N., Tanveer, M., Shahzad, B., Yang, G., Fahad, S., Ali, S., Bukhari, M.A., Tung, S.A., Hafeez, A., Souliyanonh, B., 2017. Soil compaction effects on soil health and cropproductivity: an overview. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 10056–10067. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8421-y>
- Singh, A., 2015. Soil salinization and waterlogging: A threat to environment and agricultural sustainability. *Ecol. Indic.* 57, 128–130. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.04.027>
- Sinsabaugh, R.L., Lauber, C.L., Weintraub, M.N., Ahmed, B., Allison, S.D., Crenshaw, C., Contosta, A.R., Cusack, D., Frey, S., Gallo, M.E., Gartner, T.B., Hobbie, S.E., Holland, K., Keeler, B.L., Powers, J.S., Stursova, M., Takacs-Vesbach, C., Waldrop, M.P., Wallenstein, M.D., Zak, D.R., Zeglin, L.H., 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecol. Lett.* 11, 1252–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x>

- Sobrero, M.C., Ronco, A., 2004. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L., in: Castillo, G. (Ed.), *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. IDRC, IMTA, pp. 55–67. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sofo, A., Ricciuti, P., Fausto, C., Mininni, A.N., Crecchio, C., Scagliola, M., Malerba, A.D., Xiloyannis, C., Dichio, B., 2019. The metabolic and genetic diversity of soil bacterial communities depends on the soil *management* system and C/N dynamics: The case of sustainable and conventional olive groves. *Appl. Soil Ecol.* 137, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.12.022>
- Soil Survey Staff, 2014. *Kellogg Soil Survey Laboratory Methods Manual*. Soil Survey Investigations Report No. 42, Version 5.0. R. Burt y Soil Survey Staff (ed.). U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.
- Song, G.C., Im, H., Jung, J., Lee, S., Jung, M.Y., Rhee, S.K., Ryu, C.M., 2019. Plant growth-promoting archaea trigger induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. *Environ. Microbiol.* 21, 940–948. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14486>
- Strickland, M.S., Rousk, J., 2010. Considering fungal: Bacterial dominance in soils - Methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1385–1395. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.007>
- Tabatabai, M., 1982. Soil Enzymes. *Methods Soil Anal. Part 2. Microbiol. Biochem. Prop.* 9, 903–947. <https://doi.org/10.1002/0471263397.env211>
- Tao, R., Wakelin, S.A., Liang, Y., Chu, G., 2017. Response of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in calcareous soil to mineral and organic fertilizer application and their relative contribution to nitrification. *Soil Biol. Biochem.* 114, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.06.027>
- Turner, S., Schippers, A., Meyer-Stüve, S., Guggenberger, G., Gentsch, N., Dohrmann, R., Condon, L.M., Eger, A., Almond, P.C., Peltzer, D.A., Richardson, S.J., Mikutta, R., 2014. Mineralogical impact on long-term patterns of soil nitrogen and phosphorus enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* 68, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.016>

- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, P.D., 2019. World population prospects 2019-Data Booklet.
- van Eekeren, N., Bommelé, L., Bloem, J., Schouten, T., Rutgers, M., de Goede, R., Reheul, D., Brussaard, L., 2008. Soil biological quality after 36 years of ley-arable cropping, permanent grassland and permanent arable cropping. *Appl. Soil Ecol.* 40, 432–446. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.06.010>
- Van Erp, P.J., Houba, Y.J.G., Van Beusichem, M.L., 1998. One hundredth molar calcium chloride extraction procedure. part I: A review of soil chemical, analytical, and plant nutritional aspects. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 29, 1603–1623.
- Van Liedekerke, M., Prokop, G., Rabl-Berger, S., Kibblewhite, M., Louwagie, G., 2014. Progress in management of contaminated sites in Europe, JRC Reference Reports. <https://doi.org/10.2788/4658>
- Vázquez de la Cueva, A., Marchant, B.P., Quintana, J.R., de Santiago, A., Lafuente, A.L., Webster, R., 2014. Spatial variation of trace elements in the peri-urban soil of Madrid. *J. Soils Sediments* 14, 78–88. <https://doi.org/10.1007/s11368-013-0772-5>
- Vistoso, E.M., Alfaro, M., Mora, M.L., 2012. Role of Molybdenum on Yield, Quality, and Photosynthetic Efficiency of White Clover as a Result of the Interaction with Liming and Different Phosphorus Rates in Andisols. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 43, 2342–2357. <https://doi.org/10.1080/00103624.2012.708078>
- Wakelin, S., Gerard, E., Black, A., Hamonts, K., Condrón, L., Yuan, T., Van Nostrand, J., Zhou, J., O’Callaghan, M., 2014. Mechanisms of pollution induced community tolerance in a soil microbial community exposed to Cu. *Environ. Pollut.* 190, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.03.008>
- Wakelin, S.A., Chu, G., Broos, K., Clarke, K.R., Liang, Y., McLaughlin, M.J., 2010. Structural and functional response of soil microbiota to addition of plant substrate are moderated by soil Cu levels. *Biol. Fertil. Soils* 46, 333–342. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0436-1>
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of chromic acid titration. *Soil Sci.* 37, 317–

327.

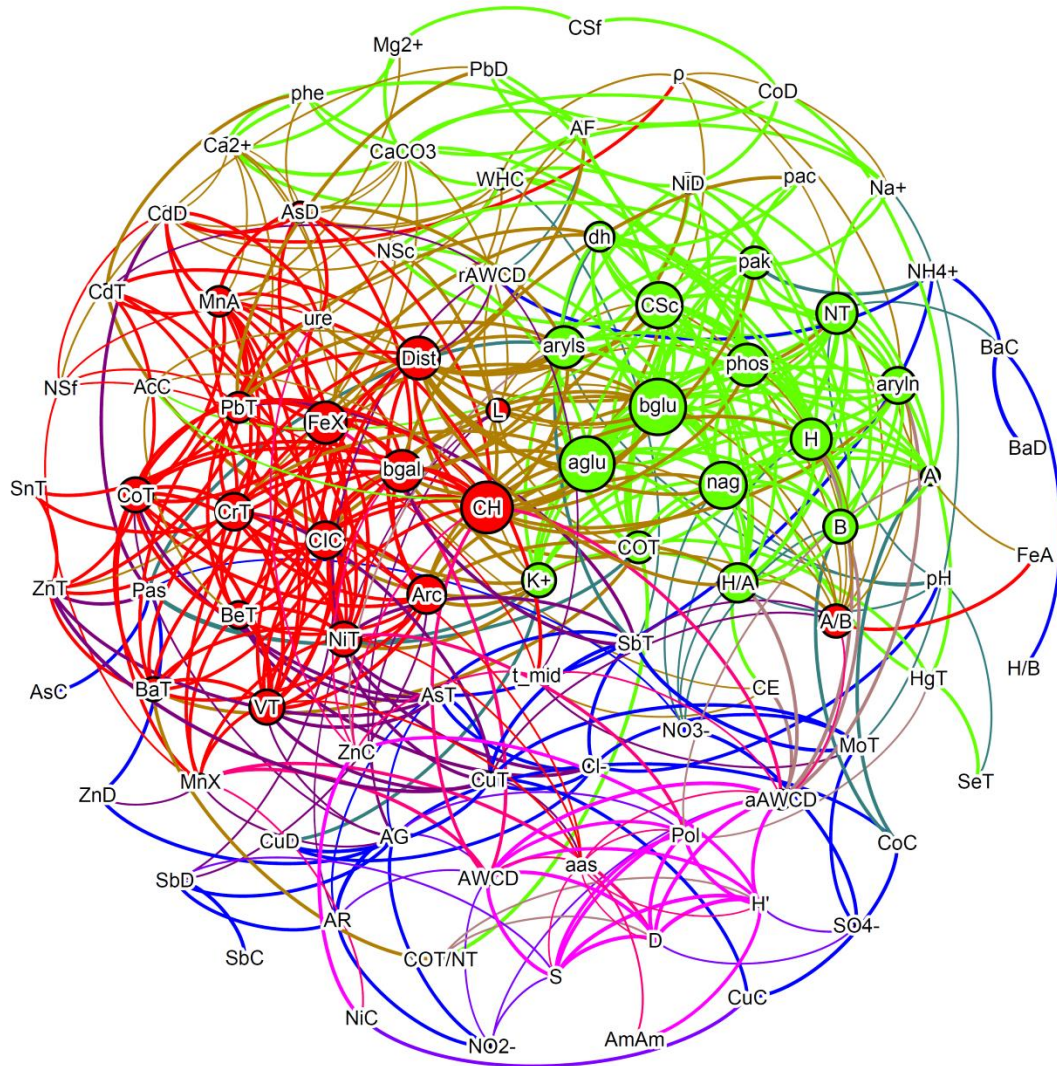
- Wang, N., Wang, A., Kong, L., He, M., 2018. Calculation and application of Sb toxicity coefficient for potential ecological risk assessment. *Sci. Total Environ.* 610–611, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.268>
- Wang, W., Keturi, P.H., 1990. Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample. *Water. Air. Soil Pollut.* 52, 369–376. <https://doi.org/10.1007/BF00229444>
- Wang, Y., Wang, Z., Chen, X., Lin, S., Li, H., Lin, K., Liu, L., 2018. Using network to enhance the insights on correlation and pollution assessment of co-occurring metals in marine sediments, the East China Sea. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 11913–11923. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1279-9>
- Wieczorek, K., Wyszowska, J., Kucharski, J., 2015. Sensitivity of soil urease to soil contamination by zinc, copper, nickel, cadmium and lead. *Fresenius Environ. Bull.* 24.
- Wightwick, A.M., Salzman, S.A., Reichman, S.M., Allinson, G., Menzies, N.W., 2013. Effects of copper fungicide residues on the microbial function of vineyard soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 1574–1585. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1114-7>
- Williams, D.E., Vlamis, J., Pukite, A.H., Corey, J.E., 1985. Metal movement in sludge-treated soils after six years of sludge addition: 2. nickel, cobalt, iron, manganese, chromium and mercury. *Soil Sci.* 140, 120–125.
- Wiseman, C.L.S., Püttmann, W., 2006. Interactions between mineral phases in the preservation of soil organic matter. *Geoderma* 134, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.09.001>
- Wittershagen, A., Rostam-Khani, P., Klimmek, O., Groß, R., Zickermann, V., Zickermann, I., Gemeinhardt, S., Kröger, A., Ludwig, B., Kolbesen, B.O., 1997. Determination of metal-cofactors in enzyme complexes by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 52, 1033–1038. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(96\)01639-4](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(96)01639-4)
- Wyszowska, J., Kucharski, J., Lajszner, W., 2006. The Effects of Copper on Soil iochemical

- Properties and Its Interaction with Other Heavy Metals. *Polish J. Environ. Stud.* 15, 927–934.
- Xu, Y., Yu, W., Ma, Q., Wang, J., Zhou, H., Jiang, C., 2016. The combined effect of sulfadiazine and copper on soil microbial activity and community structure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 134, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.041>
- Xue, D., Yao, H.-Y., Ge, D.-Y. and, Huang, C.-Y., 2008. Soil Microbial Community Structure in Diverse Land Use Systems : A Comparative Study Using Biolog ,. *Pedosph. An Int. J.* 18, 653–663. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(08\)60060-0](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(08)60060-0)
- Yang, Z., Liu, S., Zheng, D., Feng, S., 2006. Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *J. Environ. Sci.* 19, 1135–1141. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(06\)60051-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(06)60051-X)
- Yao, X., Chu, J., Ba, C., 2010. Responses of wheat roots to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. *Biol. Trace Elem. Res.* 137, 244–252. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8580-x>
- Yevdokimov, I. V., Gattinger, A., Buegger, F., Schloter, M., Munch, J.C., 2012. Changes in the structure and activity of a soil microbial community caused by inorganic nitrogen fertilization. *Microbiology* 81, 743–749. <https://doi.org/10.1134/s0026261712060045>
- Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L., Wildman, H.G., 1994. FUNCTIONAL DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITIES: A QUANTITATIVE APPROACH 26, 1101–1108.
- Zhao, X., Liu, Z.-P., 2019. Analysis of Topological Parameters of Complex Disease Genes Reveals the Importance of Location in a Biomolecular Network. *Genes (Basel)*. 10, 143. <https://doi.org/10.3390/genes10020143>
- Zuo, S., Li, X., Ma, Y., Yang, S., 2014. Soil microbes are linked to the allelopathic potential of different wheat genotypes. *Plant Soil* 378, 49–58. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-2020-6>

Apéndices

**GRAFOS DE LAS REDES DE LOS SUELOS
DE USO SECANO, OLIVAR Y FORESTAL**

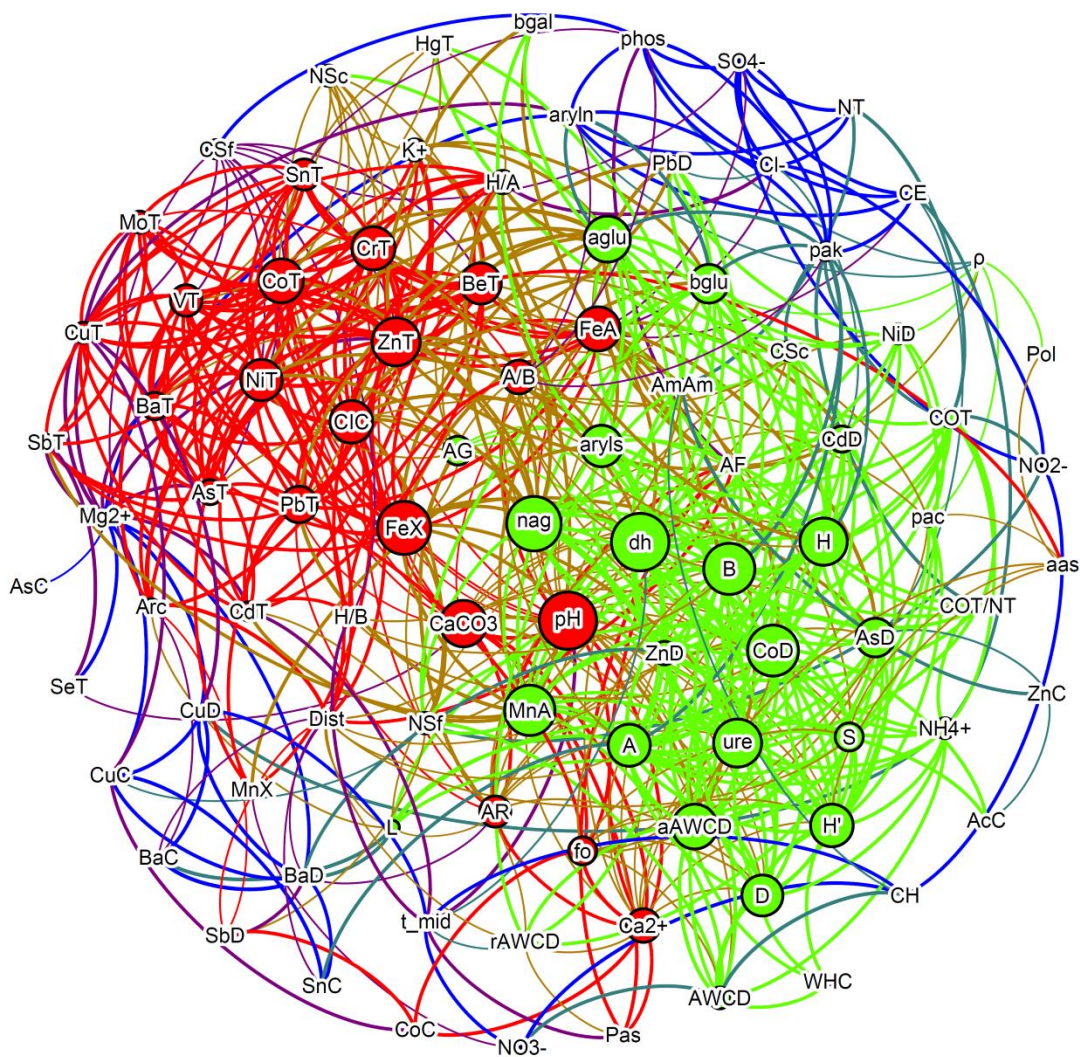
Grafo de la red obtenida para el uso seco



Módulos identificados

- Complejo de cambio
- Ciclo de nutrientes
- Disponibilidad
- Biolog

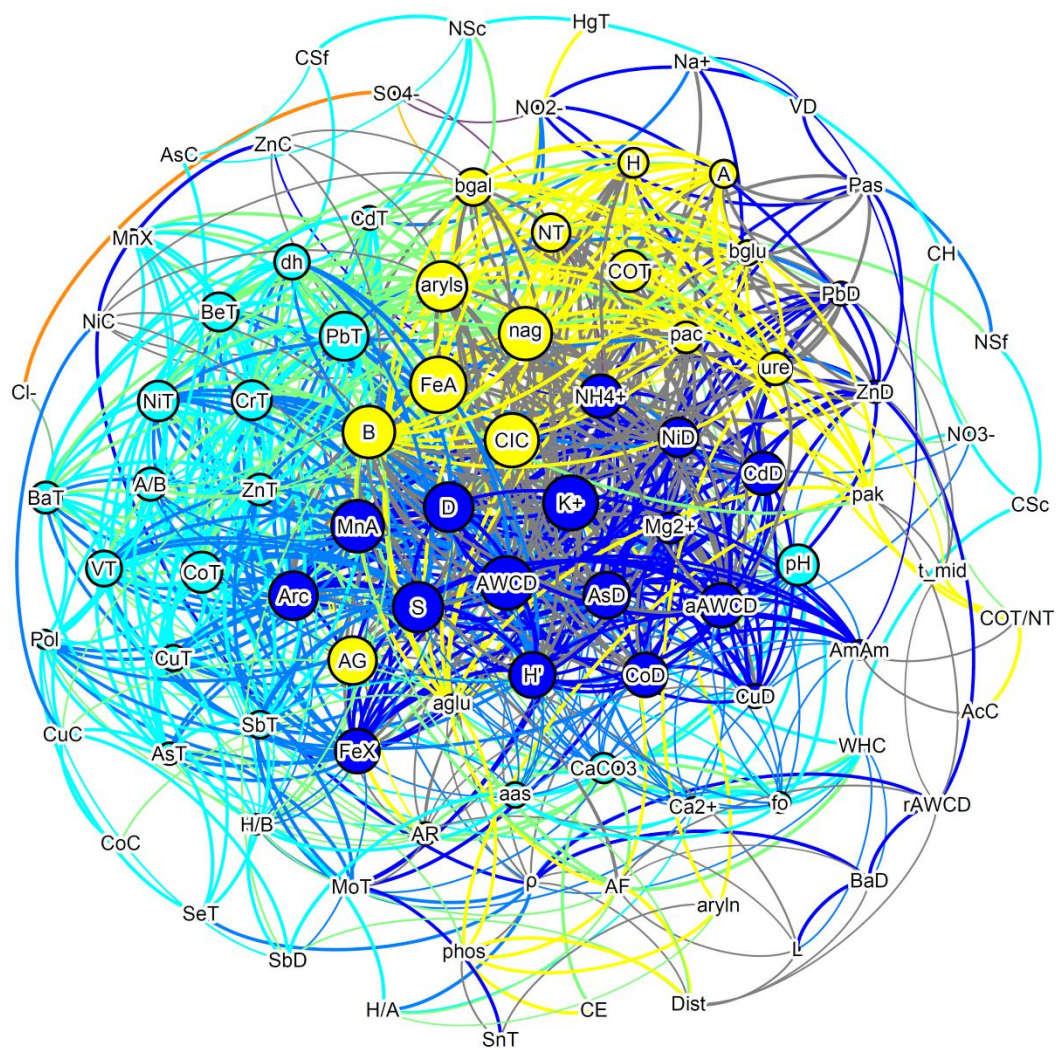
Grafo de la red obtenida para el uso olivar



Módulos identificados

- Complejo de cambio
- Ciclo de nutrientes
- Disponibilidad

Grafo de la red obtenida para el uso forestal



Módulos identificados

- Complejo de cambio & Ciclo de nutrientes
- Ciclo de nutrientes
- Disponibilidad
- Litología