

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología II**



**TESIS DOCTORAL**

**Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la composición de las poblaciones bacterianas de la microbiota de un suelo agrícola tras la aplicación de residuos orgánicos urbanos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Ignacio Nadal Rocamora**

Directores

Fernando Navarro García

**Madrid, 2016**



U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II**

**Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la  
composición de las poblaciones bacterianas de la  
microbiota de un suelo agrícola tras la aplicación  
de residuos orgánicos urbanos**

**Memoria presentada para optar  
al grado de doctor por**

**Ignacio Nadal Rocamora**

**DIRECTOR:  
DR. FEDERICO NAVARRO GARCÍA**

**Madrid 2015**



**D<sup>a</sup> CONCHA GIL, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

**CERTIFICA QUE** D. Ignacio Nadal Rocamora ha realizado, en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid dentro del Programa de Doctorado de “Microbiología y Parasitología” de la Facultad de Farmacia y bajo la dirección del Dr. Federico Navarro García, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense con el título:

**“Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la composición de las poblaciones bacterianas de la microbiota de un suelo agrícola tras la aplicación de residuos orgánicos urbanos”**

Y para que así conste, firma la presente certificación en Madrid a 1 septiembre de 2015.

**Prof. Dra. D<sup>a</sup>. Concha Gil**



# **Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la composición de las poblaciones bacterianas de la microbiota de un suelo agrícola tras la aplicación de residuos orgánicos urbanos**

**Vº Bº Director de tesis**

**Dr. Federico Navarro García**  
**Profesor Titular de Universidad**

Esta tesis se ha realizado principalmente con la financiación del proyecto: **Metodologías para la monitorización de la aplicación de lodos de depuradora. Bioseguridad microbiana y modelos de flujo y transporte de contaminantes solubles (022/PC08/3-04.2)**. Financiado por el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino (actual MAGRAMA).



## Agradecimientos

Se cierra una etapa de mi vida. Dura, pero llena de valor humano y profesional, de la cual he aprendido muchísimo. Pese a la intensidad de estos últimos meses, sé que en un futuro muy cercano, miraré hacia atrás y sonreiré, satisfecho del trabajo realizado y, de lo más importante, de las personas que han estado a mi lado en todo momento.

En primer lugar, me gustaría mencionar *al factor microbiológico de mi suelo agrícola*, a mi director de tesis Federico Navarro, *Fede*, un científico con una inteligencia envidiable (aunque se empeñe en decir lo contrario), y un perfeccionista de su profesión. Siempre ha luchado por el bien de nuestro pequeño laboratorio, pese a las dificultades de hacer ciencia hoy en día, y ha tenido una paciencia infinita conmigo. Gracias por haberme permitido participar en tus proyectos de investigación. He aprendido muchísimo de ti en términos científicos y, también, a nivel humano. Muchas gracias.

No puedo dejar de acordarme de mi familia, *la estructura taxonómica de la microbiota de mi suelo*. Muchísimas gracias por intentar comprenderme, por apoyarme en todo momento. Sois mi hallazgo más preciado. Siempre me he sentido una persona muy afortunada y sé que solamente con vuestra presencia ya me basta. Gracias a mis padres que me han dado todo en la vida. Gracias a mis hermanos (Pablo, Tito y Atuk) por generar un ambiente en el que me siento tan a gusto. Os quiero a todos. Gracias.

Por supuesto, quiero agradecer muy especialmente todo lo que has hecho, haces y harás por mí, Kibu. Eres *la materia orgánica de la que se nutre mi mundo microbiano*, mi alegría, cada día soy más feliz contigo, y lo que me queda. Gracias por comprenderme, apoyarme en todo momento y siempre pensar en mí.

Como ya he dicho, fuera de la facultad tengo una gran familia, pero la de dentro es increíblemente grande también. Empezando por el Departamento de Microbiología II, sus grandes profesores, su eficiente personal de secretaría y su sonriente personal técnico. Quiero hacer una mención especial a mi pequeña Unidad 7. A Leti y Clarissa, mis maestras y mis *hermanas* en el mundo de la ciencia. Clari, gracias por todo lo que me enseñaste, por los buenos ratos que pasamos. Leti, siempre he admirado tu capacidad científica, pero sobre todo tu generosidad como persona, espero no perderte nunca. A las personas que también aportaron su granito de arena en mi trabajo: Diego, que puso orden en mis experimentos, y Andrea que llenó de alegría mis momentos más duros de PCR. Por supuesto, no me olvido de mis compañeros y amigos de *micro*, tertulianos de cafés y tabernas mexicanas: Euge, Belén, Sonia, Raúl, Kike, María Oliver, Mari, Isa, Esme, Pablo, Merche y mis además compis de carrera Almu, Dani y Tere. Sin embargo, el departamento de *micro*, paradójicamente, es más grande todavía, así que tampoco me quiero olvidar de mis *primos* de la Unidad 2, ni de los miembros del *clan* de la Unidad 1 y sus simpatizantes. Gracias por los que fuisteis y los que sois. Siempre os voy a recordar porque siempre fuisteis el departamento que más admiré y el que me acogió.

Pero es que resulta que toda la *culpa* de mi presencia es de otro departamento. Muchísimas gracias al Departamento de Edafología. Gracias a su *horizonte superficial*,

Maite y Miguel, por darme la primera oportunidad de conectar con este ámbito. A Concha por ser todo sonrisa y a José Ramón por *soportarme* y orientarme. Gracias por vuestro cariño. Sois grandes profesionales, pero mejores personas. A continuación, se puede observar un horizonte de *roca madre*, formado por personas y científicos estupendos. Mi gran amigo Nacho, gracias por acompañarme en esta etapa de mi vida, como en casi todas desde que tengo 7 años. Sabrás mucho de suelos y tal, pero sobre todo sabes de cómo hacerme reír, espero que siempre andemos juntos. Gracias a Sergito y a Cris, ocupáis un espacio muy importante de esta etapa de mi vida. Gracias a Anita por ser la máxima responsable de que un día pidiera esa beca de colaboración. Tampoco me olvido de los *agregados* de este departamento, que también son unos tantos. Gracias. También mil gracias a Álex (Alejandro Sanz de Galdeano). Como no he habilitado un grupo de farmacéuticos, te he metido en el de los *picapiedra*. Eres un buen tipo, gran boticario y un tenaz bioinformático. Es un placer compartir parte de mi tiempo contigo. Gracias por escribirme los guiones de *perl* (si alguien precisa de tus servicios profesionales yo le pongo en contacto contigo).

Aunque no hayan intervenido en mi trabajo y, a veces, no les tenga cerca, quiero recordar a mis *hermanos scouts* del grupo Pléyades 569, y a mis compañeros de las farmacias que me han dado tan preciadas oportunidades laborales en los tiempos difíciles que corren: Farmacia Rivero (Coslada), Farmacia las gemelas (Vallecas), Farmacia Europa (Pozuelo) y Farmacia Dalí (Majadahonda).

Hace tiempo me dijeron que ser doctor no era más que una etapa de madurez en la vida de un científico. Siempre me ha gustado esa frase, especialmente por la parte tan humana que entraña. Reconozco que he aprendido mucho de la ciencia, de la universidad y de su gente y, aún así, me quedo con ganas de haber aprovechado todavía más. Pero, desde luego, sí que me quedo con una reflexión de este periodo de mi vida y de estas dos páginas de agradecimientos: lo más importante que me llevo se encuentra en la gente que me rodea y que me apoya y, también, en el hecho de vivir el momento presente lo más intensamente posible. Ahora toca aplicarlo, a ver si soy lo suficientemente maduro para ello.

**Gracias.**





# Índices



# Índice de contenidos

Índices .....	1
Índice de contenidos .....	3
Índice de tablas .....	7
Índice de figuras .....	9
Summary/Resumen .....	11
<b>Physiological, metabolic and bacterial community changes in the microbiota of a crop soil after amendment with different types of urban organic waste.....</b>	<b>13</b>
<b>Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la composición de las poblaciones bacterianas de la microbiota de un suelo agrícola tras la aplicación de residuos orgánicos urbanos.....</b>	<b>17</b>
<b>1 Efectos de la aplicación de residuos orgánicos en la salud del suelo .....</b>	<b>23</b>
1.1 <i>El suelo y su función en el ecosistema.....</i>	25
1.1.1 Composición química del suelo .....	25
1.1.2 Estructura física del suelo.....	26
1.1.3 Distribución de los microorganismos del suelo.....	27
1.1.4 ¿Qué factores influyen sobre los microorganismos del suelo?.....	28
1.1.5 ¿Qué papel tienen los microorganismos en el suelo?.....	29
1.1.6 Importancia de los microorganismos para un suelo fértil.....	30
1.1.7 Pérdida de la fertilidad del suelo.....	33
1.2 <i>¿Cómo se mejora la fertilidad del suelo?.....</i>	34
1.2.1 Los residuos orgánicos de origen urbano.....	34
1.2.2 Legislación para la aplicación de los residuos orgánicos como enmienda agrícola.....	37
1.2.3 Impacto de los residuos orgánicos en el suelo.....	37
1.3 <i>¿Cómo se puede determinar si la aplicación de enmiendas orgánicas es perjudicial para el suelo?.....</i>	42
1.3.1 ¿Qué significa el término <i>salud del suelo</i> ?.....	42
1.3.2 ¿Cómo podemos evaluar la salud del suelo?.....	42
1.3.3 Indicadores no microbianos .....	43
1.3.4 Indicadores microbianos .....	45
1.4 <i>Objetivos generales.....</i>	50
<b>2 Análisis fisiológico de la microbiota de suelos agrícolas enmendados con altas dosis de enmiendas orgánicas.....</b>	<b>51</b>
2.1 <i>Resumen.....</i>	53
2.2 <i>Introducción .....</i>	54
2.3 <i>Objetivo específico .....</i>	55
2.4 <i>Materiales y métodos .....</i>	56
2.4.1 Características del suelo agrícola y de las enmiendas orgánicas.....	56
2.4.2 Diseño experimental.....	58

2.4.3	Metodología para la medición de la respiración basal y de la biomasa microbiana .....	60
2.4.4	Medición de la respiración basal y de la biomasa microbiana del suelo .....	63
2.4.5	Tratamiento de los datos del sistema MicroResp <sup>TM</sup> .....	64
2.4.6	Conversión de los valores SIR-extracto de levadura en carbono microbiano (C <sub>mic</sub> ) .....	65
2.4.7	Tratamientos estadísticos.....	65
2.5	<i>Resultados</i> .....	66
2.5.1	Análisis de la respiración y biomasa del suelo B.....	66
2.5.2	Análisis de la respiración y biomasa del suelo A .....	68
2.5.3	Análisis de la respiración y biomasa del suelo N .....	70
2.5.4	Evolución de la respiración basal y de la biomasa.....	72
2.6	<i>Discusión</i> .....	75
2.6.1	¿Por qué se incrementa la respiración basal y la biomasa microbiana de los suelos enmendados? .....	75
2.6.2	¿Mejoran los indicadores de salud del suelo?.....	79
2.7	<i>Conclusiones</i> .....	85
<b>3</b>	<b>Análisis metabólico de la microbiota de suelos agrícolas tras la aplicación de enmiendas orgánicas .....</b>	<b>87</b>
3.1	<i>Resumen</i> .....	89
3.2	<i>Introducción</i> .....	90
3.3	<i>Objetivos específicos</i> .....	91
3.4	<i>Materiales y métodos</i> .....	92
3.4.1	Metodología para la determinación de los perfiles metabólicos .....	92
3.4.2	Medición de los CLPPs del suelo.....	94
3.4.3	Terminología utilizada para el análisis CLPPs .....	94
3.4.4	Tratamiento de los datos del sistema MicroResp <sup>TM</sup> .....	95
3.4.5	Tratamientos estadísticos.....	95
3.5	<i>Resultados</i> .....	97
3.5.1	¿Cuál fue la variación general de los perfiles metabólicos?.....	97
3.5.2	Análisis del perfil metabólico del suelo B .....	99
3.5.3	Análisis del perfil metabólico del suelo A.....	102
3.5.4	Análisis del perfil metabólico del suelo N.....	104
3.5.5	Evolución de los perfiles metabólicos de los suelos enmendados .....	106
3.6	<i>Discusión</i> .....	112
3.6.1	¿A qué puede deberse el incremento del consumo relativo de los azúcares y aminoácidos? .....	112
3.6.2	¿Por qué disminuye el consumo relativo de los ácidos orgánicos?.....	114
3.6.3	¿A qué puede deberse la duración de las alteraciones del perfil metabólico de los suelos tratados y las oscilaciones en el número de alteraciones? .....	115
3.6.4	¿Existe algún rasgo característico capaz de discriminar el uso de las diferentes enmiendas en el suelo?.....	116
3.7	<i>Conclusiones</i> .....	119
<b>4</b>	<b>Análisis de la composición bacteriana de suelos agrícolas tras la aplicación de enmiendas orgánicas .....</b>	<b>121</b>

4.1	<i>Resumen</i> .....	123
4.2	<i>Introducción</i> .....	124
4.3	<i>Objetivos específicos</i> .....	125
4.4	<i>Materiales y métodos</i> .....	126
4.4.1	Obtención de secuencias a partir de DNA del suelo.....	126
4.4.2	Procesamiento de las secuencias .....	130
4.4.3	Clasificación taxonómica de las secuencias.....	132
4.4.4	Obtención de OTUs.....	133
4.4.5	Terminología utilizada para el análisis de las secuencias y de los OTUs .....	135
4.4.6	Tratamientos estadísticos.....	135
4.4.7	Validación del esfuerzo de muestreo mediante curvas de rarefacción.....	136
4.5	<i>Resultados</i> .....	138
4.5.1	Análisis microbiológico de los residuos orgánicos.....	138
4.5.2	¿Cuál fue la variación general de los grupos bacterianos?.....	144
4.5.3	Análisis de las poblaciones bacterianas del suelo B .....	148
4.5.4	Análisis de las poblaciones bacterianas del suelo A .....	153
4.5.5	Análisis de las poblaciones bacterianas del suelo N .....	157
4.5.6	¿Qué rasgos bacterianos fueron más relevantes tras la adición de las enmiendas orgánicas?.....	161
4.5.7	OTUs marcadores del uso de las enmiendas .....	167
4.5.8	OTUs generales ubicuos, OTUs de origen indeterminado y OTUs marcadores específicos .....	178
4.6	<i>Discusión</i> .....	181
4.6.1	¿De qué manera influyeron las enmiendas sobre las poblaciones bacterianas nativas del suelo? .....	181
4.6.2	¿Es posible definir marcadores microbianos que delaten el uso de las enmiendas en el suelo? .....	185
4.7	<i>Conclusiones</i> .....	194
<b>5</b>	<b>Reflexión final</b> .....	<b>195</b>
5.1	<i>¿Cómo es el impacto microbiológico en el suelo tras la adición de enmiendas orgánicas? Resistencia y resiliencia</i> .....	197
5.2	<i>Entonces, ¿qué residuo es más conveniente para su uso en agricultura y cuál es su influencia en el medio ambiente?</i> .....	198
5.3	<i>¿Qué relación existe entre las modificaciones en el perfil metabólico y los cambios poblacionales?</i> .....	199
5.4	<i>¿De qué manera podrían aplicarse los hallazgos encontrados?</i> .....	203
5.5	<i>Reflexión final</i> .....	204
<b>6</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>207</b>
6.1	<i>Conclusiones</i> .....	209
<b>7</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>211</b>
<b>8</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>243</b>



# Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Textura del horizonte superficial del que se obtuvieron las muestras.....	57
<b>Tabla 2.</b> Composición química de las enmiendas orgánicas. ....	58
<b>Tabla 3.</b> Nomenclatura, fechas y datos ambientales de los días de muestreo. ....	60
<b>Tabla 4.</b> Resumen de los muestreos para la determinación de los perfiles metabólicos de las poblaciones de cada suelo.....	92
<b>Tabla 5.</b> Sustratos utilizados en las determinaciones de CLPPs con Microresp <sup>TM</sup> .....	93
<b>Tabla 6.</b> Distribución de los sustratos en la placa de ensayo. ....	94
<b>Tabla 7.</b> Variación de las tasas de consumo relativas de los suelos enmendados. ....	98
<b>Tabla 8.</b> Alteraciones de las tasas metabólicas en el suelo B a lo largo de los muestreos.....	99
<b>Tabla 9.</b> Influencia de los factores sobre las alteraciones <i>tempranas</i> de las tasas metabólicas a lo largo de los muestreos en el suelo B. ....	101
<b>Tabla 10.</b> Alteraciones de las tasas metabólicas a lo largo de los muestreos en el suelo A.....	102
<b>Tabla 11.</b> Influencia de los factores sobre las alteraciones <i>tempranas</i> de las tasas metabólicas a lo largo de los muestreos en el suelo A.....	103
<b>Tabla 12.</b> Alteraciones de las tasas metabólicas a lo largo de los muestreos en el suelo N. ....	104
<b>Tabla 13.</b> Influencia de los factores sobre las alteraciones tempranas de las tasas metabólicas a lo largo de los muestreos en el suelo N.....	105
<b>Tabla 14.</b> Resumen de los muestreos de suelo para la determinación de los perfiles de las poblaciones bacterianas. ....	126
<b>Tabla 15.</b> Cebadores utilizados para la generación de las minigenotecas para la secuenciación.....	129
<b>Tabla 16.</b> Asignación de colores para los distintos filis bacterianos. ....	135
<b>Tabla 17.</b> Composición de los filis bacterianos presentes en las enmiendas orgánicas. ....	138
<b>Tabla 18.</b> Composición de las clases bacterianas presentes en las enmiendas orgánicas.....	140
<b>Tabla 19.</b> OTUs con mayor abundancia relativa en las enmiendas.....	142
<b>Tabla 20.</b> Abundancia media de los filis de los suelos enmendados en todos los muestreos. ....	145
<b>Tabla 21.</b> Abundancia media de las clases de los suelos enmendados en todos los muestreos. ....	147
<b>Tabla 22.</b> Alteraciones de los filis en el suelo tratado con BC a lo largo de los muestreos.....	148
<b>Tabla 23.</b> Influencia de los factores <i>tratamiento</i> y <i>muestreo</i> sobre las alteraciones <i>tempranas</i> de los filis en el suelo tratado con BC a lo largo de los muestreos. ....	149
<b>Tabla 24.</b> Alteraciones de las clases en el suelo tratado con BC a lo largo de los muestreos. ....	151
<b>Tabla 25.</b> Influencia de los factores <i>tratamiento</i> y <i>muestreo</i> sobre las alteraciones <i>tempranas</i> de las clases en el suelo tratado con BC a lo largo de los muestreos.....	152
<b>Tabla 26.</b> Alteraciones de los filis en el suelo tratado con LAE a lo largo de los muestreos. ....	153
<b>Tabla 27.</b> Influencia de los factores sobre las alteraciones <i>tempranas</i> de los filis en el suelo tratado con LAE a lo largo de los muestreos.....	154
<b>Tabla 28.</b> Alteraciones de las clases en el suelo tratado con LAE a lo largo de los muestreos. ....	155
<b>Tabla 29.</b> Influencia de los factores sobre las alteraciones <i>tempranas</i> de las clases en el suelo tratado con LAE a lo largo de los muestreos.....	156
<b>Tabla 30.</b> Alteraciones de los filis en el suelo tratado con LANAE a lo largo de los muestreos. ....	157
<b>Tabla 31.</b> Influencia de los factores sobre las alteraciones <i>tempranas</i> de los filis en el suelo tratado con LANAE a lo largo de los muestreos.....	158
<b>Tabla 32.</b> Alteraciones de las clases en el suelo tratado con LANAE a lo largo de los muestreos. ....	159
<b>Tabla 33.</b> Influencia de los factores sobre las alteraciones <i>tempranas</i> de las clases en el suelo tratado con LANAE a lo largo de los muestreos.....	160
<b>Tabla 34.</b> Esquema del procesamiento de los OTUs. ....	169

<b>Tabla 35.</b> OTUs que mostraron alteraciones <i>tempranas</i> en su abundancia comunes a los suelos B, A y N respecto del suelo control.....	171
<b>Tabla 36.</b> OTUs que mostraron alteraciones <i>tempranas</i> en su abundancia comunes a los suelos B y A.....	172
<b>Tabla 37.</b> OTUs que mostraron alteraciones <i>tempranas</i> en su abundancia en comunes a los suelos B y N.....	173
<b>Tabla 38.</b> OTUs que mostraron alteraciones <i>tempranas</i> en su abundancia comunes a los suelos A y N.....	174
<b>Tabla 39.</b> OTUs que mostraron alteraciones <i>tempranas</i> en su abundancia exclusivas del suelo B.....	175
<b>Tabla 40.</b> OTUs que mostraron alteraciones <i>tempranas</i> en su abundancia exclusivas del suelo A.....	176
<b>Tabla 41.</b> OTUs que mostraron alteraciones <i>tempranas</i> en su abundancia exclusivas del suelo N.....	177
<b>Tabla 42.</b> OTUs generales ubicuos.....	178
<b>Tabla 43.</b> OTUs de origen indeterminado.....	179
<b>Tabla 44.</b> OTUs marcadores específicos.....	180
<b>Tabla 45.</b> Resumen de los OTUs verificados previamente o propuestos en el análisis actual por primera vez.....	193
<b>Tabla 46.</b> Correlaciones significativas ( $P < 0,05$ ) entre las variables fisiológicas y las tasas de consumo de algunos sustratos.....	200
<b>Tabla 47.</b> Correlaciones significativas ( $P < 0,001$ ) entre OTUs y tasas de consumo de algunos sustratos.....	201
<b>Tabla 48.</b> Correlaciones entre grupos bacterianos u OTUs y tasas de consumo de ácido protocatéquico y cítrico.....	202
<b>Tabla 49.</b> Datos climáticos de las parcelas durante el periodo de estudio.....	245
<b>Tabla 50.</b> Perfiles metabólicos de suelo control (suelos S) y suelo tratado con basura compostada (suelos B).....	248
<b>Tabla 51.</b> Perfiles metabólicos de suelo control (suelo S) y suelo tratado con LAE (suelo A).....	250
<b>Tabla 52.</b> Perfiles metabólicos de suelo control (suelo S) y suelo tratado con LANAE (suelo N).....	252
<b>Tabla 53.</b> Composición de los filios bacterianos de suelo control (suelo S) y suelo tratado con basura compostada (suelo B) en cada uno de los muestreos.....	254
<b>Tabla 54.</b> Composición de las clases bacterianas del suelo control (suelo S) y suelo tratado con basura compostada (suelo B) en cada uno de los muestreos.....	257
<b>Tabla 55.</b> Composición de los filios bacterianos de suelo control (suelo S) y suelo tratado con lodo aerobio (suelo A) en cada uno de los muestreos.....	259
<b>Tabla 56.</b> Composición de las clases bacterianas de suelo control (suelo S) y suelo tratado con lodo aerobio (suelo A) en cada uno de los muestreos.....	262
<b>Tabla 57.</b> Composición de los filios bacterianos de suelo control (suelo S) y suelo tratado con lodo anaerobio (suelo N) en cada uno de los muestreos.....	264
<b>Tabla 58.</b> Composición de las clases bacterianas de suelo control (suelo S) y suelo tratado con lodo anaerobio (suelo N) en cada uno de los muestreos.....	267
<b>Tabla 59.</b> Matriz de correlaciones de <i>Pearson</i> de las variables edáficas y ambientales frente a las tasas de consumo, respiración basal y biomasa microbiana.....	269
<b>Tabla 60.</b> Matriz de correlaciones de <i>Pearson</i> de las variables edáficas y ambientales frente a la abundancia relativa de los filios bacterianos.....	271
<b>Tabla 61.</b> Matriz de correlaciones de <i>Pearson</i> de las variables edáficas y ambientales frente a la abundancia relativa de las clases bacterianas (I).....	272
<b>Tabla 62.</b> Matriz de correlaciones de <i>Pearson</i> de las variables edáficas y ambientales frente a la abundancia relativa de las clases bacterianas (II).....	273
<b>Tabla 63.</b> Cebadores utilizados en la pirosecuenciación.....	275

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Importancia de los microorganismos para un suelo fértil.....	32
<b>Figura 2.</b> Basura compostada (a) y lodo de depuradora (b).....	35
<b>Figura 3.</b> Alteraciones producidas en el suelo tras la adición de enmiendas orgánicas.....	41
<b>Figura 4.</b> Indicadores de la salud del suelo.....	45
<b>Figura 5.</b> Localización de las parcelas de estudio. ....	56
<b>Figura 6.</b> Esquema de la distribución, dimensiones de las parcelas y nomenclatura de las mismas. ....	59
<b>Figura 7.</b> Esquema de la determinación de CO <sub>2</sub> del sistema Microresp™.....	62
<b>Figura 8.</b> Composición del gel indicador y preparación de las placas de detección.....	62
<b>Figura 9.</b> Dispositivo Microresp™.....	63
<b>Figura 10.</b> Respiración basal del suelo B. ....	66
<b>Figura 11.</b> Biomasa microbiana del suelo B.....	67
<b>Figura 12.</b> Respiración basal del suelo A. ....	68
<b>Figura 13.</b> Biomasa microbiana del suelo A. ....	69
<b>Figura 14.</b> Respiración basal del suelo N. ....	70
<b>Figura 15.</b> Biomasa microbiana del suelo N. ....	71
<b>Figura 16.</b> Evolución de los valores de las ratios de respiración basal (a y b) y de la biomasa microbiana (c y d).....	73
<b>Figura 17.</b> Relación de la respiración basal y la biomasa microbiana. ....	82
<b>Figura 18.</b> Evolución de la relación del cociente metabólico con el carbono soluble presente en el suelo. ....	84
<b>Figura 19.</b> Evolución del número de alteraciones significativas de los CLPPs con respecto al suelo control independientemente del momento de la aplicación de las enmiendas. ....	106
<b>Figura 20.</b> Evolución del número de alteraciones significativas de los CLPPs con respecto al suelo control considerando el momento de la aplicación de las enmiendas.....	107
<b>Figura 21.</b> Ratio de los cocientes metabólicos de cada sustrato de los suelos tratados (B, A y N) respecto del suelo control (S).....	108
<b>Figura 22.</b> Obtención de las minigenotecas de los distintos muestreos. ....	127
<b>Figura 23.</b> Esquema de la amplificación PCR piro para <i>Genome sequencer FLX system</i> . ....	130
<b>Figura 24.</b> Número de secuencias por minigenoteca. ....	131
<b>Figura 25.</b> Esquema del procesamiento de las secuencias.....	134
<b>Figura 26.</b> Curvas de rarefacción del suelo control (S), suelos enmendados (B, A y N) y residuos orgánicos. ....	137
<b>Figura 27.</b> Filos bacterianos comunes y exclusivos presentes en las distintas enmiendas utilizadas. ....	139
<b>Figura 28.</b> Clases bacterianas comunes o exclusivas presentes en las distintas enmiendas utilizadas. ...	141
<b>Figura 29.</b> OTUs comunes o exclusivos en las enmiendas utilizadas.....	143
<b>Figura 30.</b> Evolución de la abundancia del filo <i>Firmicutes</i> . ....	162
<b>Figura 31.</b> Evolución de la abundancia de la clase <i>Clostridia</i> . ....	163
<b>Figura 32.</b> Detalle de la evolución de la abundancia de la clase <i>Erysipelotrichi</i> .....	163
<b>Figura 33.</b> Evolución de algunas clases del filo <i>Proteobacteria</i> a lo largo de todo el análisis. ....	164
<b>Figura 34.</b> Evolución de la clase <i>Spartobacteria</i> a lo largo de todo el análisis. ....	165
<b>Figura 35.</b> Detalle de la evolución de algunos grupos de bacterias detectados en los suelos A y N de forma temprana. ....	166
<b>Figura 36.</b> Categorización de los OTUs. ....	169
<b>Figura 37.</b> Evolución del filo <i>Firmicutes</i> y sus clases bacterianas más abundantes en el suelo B. ....	187
<b>Figura 38.</b> Análisis comparativo entre OTUs marcadores. ....	191



## **Summary/Resumen**



# Physiological, metabolic and bacterial community changes in the microbiota of a crop soil after amendment with different types of urban organic waste

## Introduction

---

Soil is a living system that performs essential functions for the environment and agriculture. The term *soil health* is considered when a soil develops its functions preserving its chemical, physical and biological features. Many of these functions are carried out by microorganisms, which require organic matter for their development and activity. Thus, soil fertility depends on the interaction between organic matter and the microbial community.

In general, Mediterranean agricultural soils are poor in organic matter and therefore its fertility is irregular. To solve this problem urban organic wastes are commonly used as organic amendments in order to increase soil organic matter. Furthermore, this solution solves the problem of management of municipal solid waste and sewage sludge because they are recycled, instead of being incinerated or landfilled. However, this alternative could affect soil health and, for such reason, it should be evaluated. Soil health is evaluated through the use of chemical, physical and biological indicators; however, microbial indicators are fast, sensitive and provide more information, even when small changes occur in the soil. Microbial indicators could measure many variables, such as physiological (e.g. biomass) or functional variables (e.g. basal respiration) as well as diversity profiles (metabolic or taxonomic). The specific literature reports a variety of results, highlighting harmful effects that amended soils could suffer. As a result, monitoring these aspects has become a necessary task when such practices are carried out.

The conditions for the present work were based on a previous work developed in our laboratory, which evaluated the application of different amounts of sewage sludge in the same type of agricultural soil (Gondim-Porto, 2012). In this case, we have evaluated the effects of a high amount of composted waste or sewage sludge (at a dose of 160 Mg ha<sup>-1</sup>) on soil health using microbial indicators (microbial physiology and activity, and functional and taxonomic diversity). These indicators were monitored at least for 24 months and allowed us a) to suggest the type of amendment more favorable to be used in agriculture, from an environmental point of view, and b) designate potential markers that indicate the amendment of urban organic wastes in soil, based on bacterial diversity.

## Main objectives

---

- Assess the impact of different organic amendments on a Mediterranean agricultural soil by measuring 1) biomass and microbial respiration, 2) metabolic profiles of microbial populations and 3) bacterial taxonomic profiles.
- Describe metabolic and taxonomic markers that define microbial alterations in amended soils.

## Materials and methods

---

Soil plots were treated with a single dose of 160 Mg ha<sup>-1</sup> of three different organic amendments: composted urban waste (BC), aerobic sewage sludge (LAE) and anaerobic sewage sludge (LANAE). Samples were collected every three months for 24 months in the case of soil treated with sludges (soils A and N), and 30 months for those treated with composted waste (soil B). Changes were contrasted with non-treated soil plots (soil S).

The MicroResp<sup>TM</sup> system was used to determine basal respiration (RB), microbial biomass and metabolic profiles (CLPPs). Bacterial taxonomic profiles were performed by high throughput sequencing (pyrosequencing) of libraries of the bacterial 16S gene, obtained by PCR from total soil DNA. Sequences were processed using bioinformatics tools to perform a detailed analysis of the bacterial taxa and OTUs (*Operational Taxonomic Units*) present in soil.

## Results

---

Soil Basal respiration (RB) increased in the first year of analysis, especially in the first sampling of the three amended soils (soils B, A and N). In the second year, soil RB values remained high in sewage sludge-amended soils (soils A and N) but decreased in soil B, reaching non-treated soil values (soil S). Microbial biomass increased in the three treated soils reaching significant higher values than soil S.

Microbial metabolic profiles (CLPPs) in amended soils showed a preferential consumption of sugars and amino acids, and a decrease in the consumption of organic acids. This behavior remained in treated soils even two years after amendment.

Taxonomic analysis revealed that soil bacterial community structure changed in amended soils. Relative abundance of common phyla increased (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes* and *Verrucomicrobia*), as well as other less common phyla (*Nitrospira* and *Deinococcus-Thermus*), while others decreased (*Acidobacteria*, *Cyanobacteria* and *Planctomycetes*). Some of the bacteria detected in the used organic wastes were also detected in treated soils, indicating specific traits of the different amendments in the soil. In this regard, the anaerobic sludge was the amendment that caused more changes in the soil (e.g. detection of phylum *Synergistetes* and *Clostridia*, *Erysipelotrichi*, *Bacteroidia* and *Anaerolineae* classes).

Finally, OTUs analysis showed relevant results that provided new markers for the detection in the soil of these types of organic amendments.

## Conclusions

---

- Soil basal respiration in amended soils was higher than in control soil for the first year after the addition of amendments. This result was probably attributable to the most easily degradable nutrients (labile compounds).
- Soil basal respiration in the second year remained higher in sewage sludge-treated soils, indicating that the chemical nature of amendments was critical for the microbial response.
- Microbial biomass increased in amended soils in the whole assay, regardless of the type of treatment. In particular, moisture and the amount of nitrogen compounds were related to the biomass increase.
- Microbial community in treated soils showed an important metabolic quotient ( $qCO_2$ ) increase, in some cases probably attributable to an increase in the activity of a proportion of microbial community, but in other cases to a stress response related to the presence of the amendments.
- Composted urban waste-amended soils showed an increase of soil organic matter, and a decreased of  $CO_2$  emissions, which could be viewed as a more moderate impact on soil microbial communities.
- Organic amendments induced a change in the consumption of a number of substrates, showing different profiles depending on the type of amendment.
- Consumption of sugars and amino acids increased, while organic acid consumption decreased, probably because of the development of opportunistic microorganisms in treated soils with a preferred consumption for those compounds.
- Protocatechuic acid consumption decreased in treated soils probably due to increase of the amount of labile compounds which are easier to metabolize.
- The analysis of the number of significant changes in metabolic profiles and  $qCO_2$  values showed that amendment effects lasted more than two years, suggesting that the metabolic measurements after these practices need to be long-term.
- Consumption of arginine, glucose, citric acid and protocatechuic acid were characteristic traits of amended soils, enough to be used as specific markers to determine alterations in the soil.
- Organic waste application significantly influences microbial structure communities, modifying its composition over a prolonged period of time.
- The increase of organic matter and, in particular, of the labile compounds presumably favored the development of opportunistic soil bacterial groups (such as *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*) and the relative decline of others with oligotrophic metabolism (as *Acidobacteria* and *Cyanobacteria*) in the amended soils.

- *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes* and *Planctomycetes* phyla abundances showed alterations during the analysis without a clear pattern associated with the amendments.
- Changes in amended soils stimulated the growth of some rare soil bacterial groups like *Epsilonproteobacteria*, *Deinococcus-Thermus* or *Nitrospira*.
- Anaerobic sludge-treated soils showed the higher amount of changes. In particular, the increase in the relative abundance of *Firmicutes* (*Clostridia* and *Erysipelotrichi* classes), *Synergistetes*, *Chloroflexi* (class *Anaerolineae*) and the phylum *Bacteroidetes* (class *Bacteroidia*) during the first sampling.
- Despite the difficulty of the analysis, we may suggest some specific OTUs previously not proposed which could be used for the detection of the amendment of soils with anaerobic sludge: 542 (*Bacteroidetes*), 1484 and 1548 (*Deltaproteobacteria*), or for the detection of both types of sludge (aerobic and anaerobic): 790, 843 and 846 (*Clostridia*). However, in this study we could not detect new markers for the specific identification of the use of aerobic sludge in soils nor for the composted waste.
- OTU 1122 (*Alphaproteobacteria*) was confirmed as a specific marker of the use of aerobic sludge in soils, with respect to previous experiments.

## Final conclusion

---

- The application of organic amendments in agricultural soils induced microbial changes. In particular, anaerobic sewage sludge-treated soils showed the largest number of microbial changes, used to define a set of relevant microbial markers (bacterial groups and OTUs). Data indicated that crop soils are very sensitive to perturbations induced by the amendments, and that are unable to recover during the period of time of the analysis, thus showing no resilience. However, metabolic profiles (CLPPs) indicated a more proportional distribution of consumption rates of each type of chemical compound after amendment, which could be interpreted as a higher functional diversity, enhancing functional redundancy and therefore, improving resistance and resilience of soils to future perturbations.
- We might recommend the preferential use of composted organic waste (BC) for amendment. Such amendments provide more beneficial effects on soil microbiota, like an enhancement of microbial physiological variables, metabolic diversity and the absence of potentially pathogenic microorganisms.
- Results allowed us to propose, among others, the association of some bacterial phyla such as *Proteobacteria* and *Acidobacteria* with the consumption of some group of substrates, like sugars and organic acids, respectively.

# Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la composición de las poblaciones bacterianas de la microbiota de un suelo agrícola tras la aplicación de residuos orgánicos urbanos

## Introducción

---

El suelo es un sistema vivo en el que se desarrollan funciones esenciales para el medio ambiente y para la agricultura, y se considera que tiene salud cuando es capaz de cumplir esas funciones a la vez de preservar sus características químicas, físicas y biológicas. Gran parte de estas funciones son llevadas a cabo por los microorganismos del suelo, los cuales precisan de materia orgánica para su desarrollo y actividad. Se podría decir que la fertilidad del suelo depende de la interacción entre la materia orgánica y la microbiota.

Generalmente, los suelos agrícolas del clima mediterráneo son pobres en materia orgánica y, por tanto, su fertilidad es variable. Para solucionar este problema se utilizan, entre otros elementos, enmiendas orgánicas de origen urbano que incrementan la materia orgánica del suelo. Adicionalmente, se reciclan residuos urbanos cuya producción se incrementa año a año: los residuos sólidos urbanos (basuras) y los lodos de depuración de aguas residuales. Sin embargo, esta práctica puede no ser siempre beneficiosa, ya que la salud del suelo podría verse afectada y de ahí la necesidad de ser evaluada. Para ello se tienen en cuenta distintos indicadores, entre los cuales, los microbianos cada vez son más empleados por su rapidez, sensibilidad y capacidad de proporcionar más información incluso sobre cambios leves que suceden en el suelo. Estos indicadores pueden ser fisiológicos (biomasa), de actividad (respiración basal) y de diversidad (metabólicos o taxonómicos). Las investigaciones que estudian los cambios que suceden en la microbiota del suelo tras la aplicación de enmiendas orgánicas reportan una gran variedad de resultados, destacando en ocasiones efectos perjudiciales. Debido a ello, consideramos necesario el estudio de los aspectos relacionados con la microbiota cuando se emplean estas prácticas.

A partir de un ensayo previo en el que se evaluó el efecto de distintas cantidades de lodos de depuradora en el mismo tipo de suelo agrícola (Gondim-Porto, 2012), hemos pretendido ampliar ese estudio evaluando los efectos sobre la salud del suelo tras la aplicación de una cantidad elevada de basura compostada y de lodos de depuradora ( $160 \text{ Mg ha}^{-1}$ ). De esta manera, consideramos que puede ser interesante describir cómo se afecta la salud del suelo con estas prácticas mediante marcadores microbianos (fisiológicos, de actividad microbiana y de diversidad funcional y taxonómica) medidos de forma trimestral a lo largo de, al menos, 24 meses, de tal manera que nos permitiera sugerir qué tipo de enmienda es más favorable para el suelo desde el punto de vista ambiental, así como indicar posibles marcadores de actividad microbiana o de diversidad bacteriana útiles para la detección de la aplicación de enmiendas al suelo.

## Objetivos generales.

---

- Evaluar el impacto de diferentes enmiendas orgánicas en un suelo agrícola bajo clima mediterráneo mediante el estudio de 1) la biomasa y la respiración microbiana, 2) los perfiles metabólicos de las poblaciones microbianas y 3) los perfiles taxonómicos bacterianos.
- Describir marcadores metabólicos y taxonómicos que definan las alteraciones microbianas que se producen en un suelo enmendado.

## Materiales y métodos

---

El trabajo se realizó sobre parcelas de un suelo agrícola que se trató con tres enmiendas orgánicas diferentes: basura compostada (BC), lodo de depuradora aerobio (LAE) y lodo de depuradora anaerobio (LANAE), en una dosis única de 160 Mg ha<sup>-1</sup>. Los resultados fueron contrastados con una parcela de suelo control (suelo S). El análisis se realizó trimestralmente durante 24 meses para el caso de las parcelas con lodos (suelos A y N) y 30 meses para las parcelas tratadas con basura compostada (suelo B).

El sistema MicroResp<sup>TM</sup> se utilizó para la determinación de la respiración basal (RB), la biomasa microbiana y los perfiles metabólicos (CLPPs). El análisis taxonómico de las poblaciones bacterianas del suelo se realizó mediante secuenciación masiva (pirosecuenciación) del gen 16S bacteriano, a partir de genotecas fabricadas por PCR a partir del DNA total extraído del suelo. Las secuencias obtenidas se procesaron por medio de herramientas bioinformáticas, realizándose posteriormente un análisis detallado de los grupos taxonómicos bacterianos y de los OTUs (*Operational Taxonomic Units*) presentes en las muestras de suelo.

## Resultados

---

La respiración basal (RB) del suelo se incrementó durante el primer año del ensayo, especialmente en los primeros muestreos de todos los suelos enmendados (suelos B, A y N). Durante el segundo año, la RB del suelo se mantuvo elevada en los suelos enmendados con lodos de depuradora (suelos A y N) pero disminuyó en el suelo B, alcanzando valores próximos a los del suelo control. Por otra parte, la biomasa microbiana se incrementó y fue superior a la del suelo control en la mayor parte de los suelos tratados con enmiendas a lo largo de todo el análisis.

Los perfiles metabólicos (CLPPs) indicaron que las poblaciones microbianas de los suelos tratados mostraron un consumo preferente de los azúcares y de los aminoácidos, junto con una disminución del consumo de los ácidos orgánicos. Con respecto a la evolución de las alteraciones en los perfiles metabólicos, éstas se mantuvieron en las parcelas tratadas incluso dos años después de la aplicación.

El análisis taxonómico de las poblaciones bacterianas reveló que aparecieron modificaciones en los suelos enmendados, como el incremento de la abundancia de algunos filos de bacterias habituales en el suelo (*Proteobacteria*, *Firmicutes*,

*Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes* y *Verrucomicrobia*), el incremento de otros menos frecuentes (*Nitrospira* y *Deinococcus-Thermus*) y la disminución de otros (*Acidobacteria*; *Cyanobacteria* y *Planctomycetes*). Por otra parte, la presencia de algunos microorganismos de las enmiendas orgánicas aplicadas se manifestó en la composición microbiana de los suelos tratados, señalando un comportamiento característico de la enmienda aplicada. En este sentido, el lodo anaerobio fue la enmienda que produjo los cambios más relevantes en el suelo (en el filo *Synergistetes* y en las clases *Clostridia*, *Erysipelotrichi*, *Bacteroidia* y *Anaerolineae*). Por último, el análisis de los OTUs más característicos de cada uno de los suelos enmendados facilitó el poder proponer nuevos marcadores del uso de enmiendas orgánicas.

## Conclusiones

---

- La respiración basal de los suelos enmendados fue superior a la del suelo control durante el primer año tras la adición de las enmiendas. Este incremento dependió especialmente de los nutrientes más fácilmente degradables (lábilés).
- La respiración basal durante el segundo año de ensayo fue superior a la del suelo control solo en el caso de los suelos tratados con lodos de depuradora, lo que indica que la naturaleza química de las mismas es determinante en cuanto a la respuesta microbiana que se produce.
- La biomasa microbiana se incrementó en los suelos enmendados durante todo el ensayo, independientemente del tipo de tratamiento. En particular, el aumento de la humedad y el de la cantidad de algunos compuestos de nitrógeno parecen regular este incremento.
- Las poblaciones de los distintos suelos provocaron un incremento considerable del valor del cociente metabólico ( $qCO_2$ ), en algunos casos presumiblemente achacable al incremento de la actividad de una parte de la población, pero en otros casos como una respuesta al estrés que supone la presencia de algunas enmiendas.
- La aplicación de la enmienda compostada (BC) produjo un incremento en términos globales de la materia orgánica del suelo y disminuyó la producción de  $CO_2$ , suponiendo un impacto más moderado sobre las poblaciones del suelo.
- La adición de enmiendas al suelo produce un cambio en el perfil de consumo de una serie de sustratos que es distinto en función del tipo de enmienda utilizada.
- Por regla general, el consumo de azúcares y aminoácidos se incrementó, mientras que el de ácidos orgánicos disminuyó, probablemente por el desarrollo de poblaciones oportunistas en el suelo que presentan un consumo preferente por los primeros.
- El consumo del ácido protocatéquico disminuyó en las parcelas enmendadas posiblemente debido al incremento de la cantidad de compuestos lábilés de carbono fáciles de metabolizar.
- El análisis del número de alteraciones significativas totales del consumo y de los valores de  $qCO_2$  de los sustratos permitió comprobar que los efectos de la aplicación de enmiendas perduraron más de dos años, lo que indica que la

repercusión metabólica de las dosis aplicadas ha de medirse en plazos de tiempo superiores a los dos años.

- Los consumos de arginina, glucosa, ácido cítrico y ácido protocatéquico fueron característicos de la presencia en los suelos de enmiendas orgánicas por lo que podrían ser utilizados como marcadores para determinar la existencia de alteraciones en el suelo.
- La adición de residuos orgánicos influyó de forma significativa sobre la estructura de las poblaciones microbianas del suelo modificando su composición durante un periodo prolongado de tiempo.
- El incremento de la materia orgánica y, en especial, de los compuestos lábiles presumiblemente favoreció el desarrollo de algunos grupos bacterianos oportunistas del suelo (como *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*) y la disminución relativa de otros con un metabolismo oligotrófico (como *Acidobacteria* y *Cyanobacteria*) en los suelos enmendados.
- Algunos elementos de los filos *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *Planctomycetes* mostraron alteraciones en su abundancia durante todo el ensayo aunque la influencia de las enmiendas en su presencia no es clara.
- Los cambios que produce en el suelo la adición de las enmiendas podrían estimular el crecimiento de algunos grupos bacterianos poco abundantes del suelo como *Epsilonproteobacteria*, *Deinococcus-Thermus* o *Nitrospira*.
- La aplicación del lodo anaerobio produjo los cambios más importantes en el suelo como el incremento de la abundancia de las bacterias de los filos *Firmicutes* (clases *Clostridia* y *Erysipelotrichi*), *Synergistetes*, *Chloroflexi* (clase *Anaerolineae*) y *Bacteroidetes* (clase *Bacteroidia*) durante los primeros muestreos.
- Pese a la complejidad del análisis se pueden proponer algunos OTUs antes no propuestos, que podrían ser usados para detectar de forma exclusiva la aplicación de lodos anaerobios en el suelo: 542 (*Bacteroidetes*), 1484 y 1548 (*Deltaproteobacteria*), o bien para la detección de ambos tipos de lodos (aerobio y anaerobio): 790, 843 y 846 (*Clostridia*). Sin embargo, en el presente trabajo no hemos podido detectar marcadores nuevos exclusivos para el uso de lodos aerobios ni para el uso de basura compostada.
- Confirmamos el uso del OTU 1122 (*Alphaproteobacteria*) como marcador específico de lodo aerobio, con respecto a experimentos previos.

## Conclusión final

---

- La aplicación de las enmiendas orgánicas produjo alteraciones microbianas en el suelo agrícola. En particular, al poco tiempo de aplicarse, los suelos tratados con lodos anaerobios fueron los que registraron un mayor número de alteraciones microbianas, pudiéndose definir un conjunto de marcadores microbianos más relevantes (grupos bacterianos y OTUs). Los datos observados indican que el suelo agrícola no solamente es sensible a las perturbaciones inducidas por las enmiendas, sino que no es capaz de recuperarse de los efectos de éstas, es decir, que no mostró resiliencia durante el periodo de tiempo analizado. No obstante, los perfiles metabólicos observados señalaron que los valores de las tasas de consumo de cada tipo de sustrato fueron más equitativos entre sí, hecho que podría ser interpretado como una mayor diversidad funcional, lo que supondría un incremento de la redundancia funcional y, por consiguiente, la resistencia y resiliencia de los suelos tratados podría verse favorecida.
- Entre las distintas enmiendas aplicadas podemos decantarnos por el uso de residuos orgánicos compostados (BC). Este tipo de enmiendas ofrece a nivel microbiológico un conjunto de efectos más beneficiosos para el suelo tras su aplicación ya que se produce una mejora de las características fisiológicas de la microbiota, se incrementa la diversidad metabólica y sus muestras de suelo no manifestaron microorganismos potencialmente patógenos.
- Los resultados obtenidos nos permiten proponer, entre otras, la asociación de algunos representantes del filo Proteobacteria y Acidobacteria con el consumo de algunos sustratos (azúcares y ácidos orgánicos).



## Capítulo I

---

### **1 Efectos de la aplicación de residuos orgánicos en la salud del suelo**



## 1.1 El suelo y su función en el ecosistema

---

El suelo se define como la materia sólida, líquida y gaseosa existente entre la atmósfera y la litosfera. En el ambiente cumple una serie de funciones elementales: es un soporte mecánico para las plantas, es el hábitat natural de diversos organismos (microorganismos, hongos y animales), es un reservorio de materia orgánica y de agua, pero, a su vez, es un suministrador de nutrientes (Lavelle y Spain, 2003; Gardiner y Miller, 2008; White, 2013). Su formación depende de factores tales como el relieve, el clima, el tiempo, la roca madre y de los propios seres vivos que viven en él (Buscot, 2005). Todos ellos influyen en los ciclos biogeoquímicos de los elementos en la Tierra, en los cuales el suelo tiene un papel de gran importancia (Paul, 2015).

Desde un punto de vista agrícola, el suelo es fundamental para el desarrollo de los cultivos vegetales (Costanza *et al.*, 1997; White, 2013). Sin embargo, puede considerarse como un recurso natural no renovable, cuyas tasas de degradación son elevadas y contrastan con la lentitud de sus procesos de formación y regeneración (Van-Camp L. *et al.*, 2004; Lal, 2008).

### 1.1.1 Composición química del suelo

Atendiendo a su composición química, el suelo contiene una fracción inorgánica y otra orgánica. El componente inorgánico del suelo está compuesto por minerales (como cuarzo, feldespato, mica, carbonatos, yesos, óxidos y silicatos), gases (como nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono y metano) y cationes procedentes de la hidrólisis de los minerales (como, por ejemplo, aluminio, hierro, calcio y potasio) (Lavelle y Spain, 2003; Gardiner y Miller, 2008). La parte orgánica de los suelos, comúnmente conocida como materia orgánica (compuestos de estructura carbonada), se compone fundamentalmente de materia orgánica fresca o no humificada y de materia orgánica humificada. La primera de ellas está integrada por compuestos lábiles, biomasa vegetal, macro y mesofauna y microorganismos, mientras que la segunda está compuesta por los productos complejos derivados de la transformación de la materia orgánica fresca (Brookes *et al.*, 2008). Esta transformación se lleva a cabo, en parte, por los microorganismos del suelo y constituye una forma de almacenamiento más o menos compleja de sustancias que contienen elementos esenciales para el desarrollo biológico (Porta *et al.*, 2003; Guggenberger, 2005). A su vez, esta materia orgánica humificada puede descomponerse de nuevo en sustancias sencillas fácilmente degradables por la acción de los microorganismos (Grinhut *et al.*, 2007). Por lo tanto, dada la composición fundamental de la materia orgánica y las transformaciones que sufre, ésta constituye uno de los eslabones fundamentales del ciclo biogeoquímico del carbono (C). En este ciclo, la oxidación de la materia orgánica es crucial ya que a partir de ésta se produce la liberación de compuestos de C desde el suelo a la atmósfera, principalmente en forma de CO<sub>2</sub> (Morris y Blackwood, 2015). El proceso contrario es el secuestro de C, que permite su almacenamiento en el suelo de una forma estable, por ejemplo, en forma de materia orgánica humificada o en forma de biomasa microbiana, evitando así su emisión a la atmósfera. En este sentido, diversos estudios sugieren que la correcta gestión de la materia orgánica del suelo permitiría incidir a corto y medio plazo en el secuestro de C ya que es una manera de

almacenarlo y con ello frenar la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera (Hayes y Clapp, 2001; Álvaro-Fuentes *et al.*, 2009; Kirkby *et al.*, 2014).

La cantidad de materia orgánica del suelo depende de diversos factores, entre ellos, las características intrínsecas del suelo, como la cobertura vegetal o la pendiente, y de factores climáticos, como la temperatura y la precipitación (Lal, 2007; Veum *et al.*, 2014). La pérdida de cobertura vegetal y de materia orgánica expone al suelo a la acción de agentes erosivos por lo que se vería afectada su estabilidad (Bastida *et al.*, 2006). Además, la pérdida de materia orgánica conlleva un incremento en la evaporación y una reducción de la actividad y diversidad de los organismos del suelo, que finalmente influye sobre la estructura física del suelo (Voroney y Heck, 2015). En particular, la elevada temperatura y la deficiencia de lluvias propias del clima mediterráneo producen la pérdida de materia orgánica del suelo si se compara con la presente en climas más fríos y húmedos (Roig *et al.*, 2012; Curiel Yuste *et al.*, 2014).

### 1.1.2 Estructura física del suelo

El suelo se organiza en horizontes, que son capas horizontales diferenciables entre sí por sus características edáficas (materia orgánica, color, dureza, textura,...). A su vez, los horizontes del suelo están compuestos por partículas y agregados. Las partículas se clasifican según su diámetro en arcillas, limos y arenas que, tras la influencia de diversos factores físicos, químicos y biológicos, pueden organizarse para formar agregados junto con la materia orgánica (White, 2013). Las estructuras agregadas dan lugar a la formación de poros en su interior, los cuáles en algunos casos pueden suponer cerca del 50 % del volumen total del suelo. En ese espacio es en donde viven los organismos del suelo, ya que en los poros se contiene agua, aire y materia orgánica (Dexter, 2004). Los agregados se categorizan en microagregados (<250  $\mu\text{m}$  de diámetro) y macroagregados (>250  $\mu\text{m}$ ) que se originan a partir de los primeros (Six *et al.*, 2000). Los microagregados, al ser de menor tamaño, son más estables y se ven menos afectados por los usos agrícolas del suelo (Six *et al.*, 2004).

La estabilidad de las estructuras del suelo se incrementa con la presencia de materia orgánica y de cobertura vegetal (Blanco y Lal, 2010; Jha *et al.*, 2012). En este sentido, los factores biológicos son de extrema relevancia en la formación de los agregados, ya que contribuyen al mantenimiento de las estructuras del suelo (Wagner *et al.*, 2007; Rousk *et al.*, 2009; White, 2013). Entre ellos, se encuentran los organismos del suelo (plantas, fauna y microorganismos), así como los productos derivados de su metabolismo (por ejemplo, polisacáridos) que actúan como cemento biológico para la formación de los agregados (Preston *et al.*, 2001; Rillig y Mummey, 2006; Maier *et al.*, 2009; Verchot *et al.*, 2011).

### 1.1.3 Distribución de los microorganismos del suelo

El suelo es un hábitat natural para una serie de organismos que constituyen la fauna del suelo. Dentro de esta fauna se encuentran la macrofauna (macroartrópodos y anélidos), la mesofauna (nematodos y microartrópodos) y la microfauna (protozoos, arqueas, bacterias, hongos, algas unicelulares y virus) (White, 2013; Coleman y Wall, 2015). De hecho, es uno de los mayores reservorios de diversidad biológica del planeta lo que le confiere la capacidad de realizar un elevado número de funciones, muchas de las cuales son debidas a la actividad de los microorganismos (Bastida *et al.*, 2013; Paul, 2015).

La naturaleza y tamaño de las poblaciones microbianas del suelo se encuentran fuertemente influenciadas por distintos factores abióticos relacionados con su contexto climático y edáfico (Philippot *et al.*, 2009; Garbisu *et al.*, 2011). Entre ellos, los nutrientes, la textura del suelo, la temperatura y la humedad juegan un papel clave no solo en la composición de las poblaciones, sino en sus funciones (Berard *et al.*, 2011; Berard *et al.*, 2012; Curiel Yuste *et al.*, 2014). Pero también existen factores bióticos que condicionan la distribución de los microorganismos, como la competencia ecológica que existe entre ellos, ya sea en términos nutricionales compitiendo por un mismo sustrato, por depredación o por la presencia de sustancias inhibitorias del crecimiento como son los antibióticos (Killham y Prosser, 2015).

Dentro de los microorganismos del suelo, las bacterias son los organismos más numerosos y con mayor biodiversidad. Por regla general, la mayor parte de los filos bacterianos están presentes en todos los suelos. La distribución vertical de las bacterias en el suelo muestra que las bacterias Gram negativas dominan los horizontes superficiales del suelo, mientras que las Gram positivas se distribuyen en horizontes inferiores (Frey, 2015). Concretamente, se ha estimado que los filos bacterianos más dominantes en el suelo (aproximadamente un 92 % de los filos del suelo) son *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* y *Firmicutes* (Janssen, 2006). Debido a su elevada diversidad, estos microorganismos se distribuyen en función de diferentes gradientes en el suelo (pH, temperatura, agua, materia orgánica,...), pero también lo hacen conforme sus necesidades y comportamientos fisiológicos como, por ejemplo, su tipo respiratorio (Pepper y Gerba, 2005), o metabólicos, dependiendo de si se trata de bacterias oligotróficas o copiotróficas (Philippot *et al.*, 2010). Las primeras necesitan una pequeña cantidad de nutrientes y sus tasas metabólicas son bajas, en cambio, las bacterias copiotróficas se encuentran adaptadas a una mayor cantidad de nutrientes y sus tasas metabólicas son elevadas (Fierer *et al.*, 2007).

A diferencia de las bacterias, los hongos ocupan una mayor proporción de la biomasa de los microorganismos, aunque tienen una menor diversidad biológica y, en general, son resistentes a condiciones abióticas extremas como la sequía o la falta de nutrientes (Thorn y Lynch, 2007; Maier *et al.*, 2009; Curiel Yuste *et al.*, 2011). Aunque su papel es complejo de definir contribuyen junto con las bacterias a la funcionalidad del suelo. Entre las funciones que desempeñan está la de descomponer compuestos orgánicos diversos, desde los más lábiles (como los azúcares) a los más complejos (como polímeros de celulosa y lignina) (Nannipieri *et al.*, 2003). De esta manera, los hongos pueden metabolizar una gran variedad de compuestos, en muchas ocasiones

más complejos que los que pueden degradar las bacterias. Además, su crecimiento en forma de hifas les confiere cierta ventaja en la obtención de nutrientes (Ritz y Young, 2004). No obstante en los suelos agrícolas roturados se ha descrito un descenso de su biomasa, hecho que podría estar relacionado con la erosión física que se produce con estas prácticas la cual daña las estructuras fúngicas, lo que explica que su la biomasa sea mayor en los suelos forestales (Wardle, 1995; Frey *et al.*, 1999; García-Orenes *et al.*, 2013).

Las bacterias y los hongos constituyen más del 90 % de la biomasa microbiana del suelo (Six *et al.*, 2006), pero además, en el suelo existen otros tipos de microorganismos, como las algas unicelulares, los protozoos, los virus y las arqueas. En primer lugar, las algas participan en la estabilidad de los agregados del suelo, al secretar sustancias extracelulares (Maier *et al.*, 2009), además de participar en la fijación del nitrógeno atmosférico. Por su parte, los protozoos intervienen en la regulación de las poblaciones de bacterias, hongos y algas, ya que se alimentan de éstos, aunque también son capaces de metabolizar y excretar otras fracciones de la materia orgánica del suelo (Coleman y Wall, 2015). Por último, los virus y las arqueas son organismos que pueden encontrarse en el suelo, aunque, el número de estudios de estos grupos es bajo debido a sus particularidades ecológicas. En el caso de los virus, su distribución está muy limitada a sus hospedadores, y en el caso de las arqueas a condiciones ambientales extremas (Kimura *et al.*, 2008; Swanson *et al.*, 2009; Killham y Prosser, 2015).

#### 1.1.4 ¿Qué factores influyen sobre los microorganismos del suelo?

La composición y la actividad de las poblaciones microbianas del suelo pueden verse afectadas por factores de origen biótico o abiótico. Dentro de los primeros se encuentran los antropogénicos (que modifican la estructura y composición química del suelo) o los relacionados con la introducción de microorganismos alóctonos o la influencia de otros organismos superiores (como las plantas y los animales). Dentro de los segundos, los aspectos climáticos o edáficos.

Las actividades antropogénicas influyen sobre la composición de la microbiota del suelo. Obviando la parte correspondiente al desarrollo urbanístico, las actividades mineras, los incendios y otros focos de contaminación cercanos a las ciudades (Wong, 2003; Villar *et al.*, 2004; Clarke y Smith, 2011; de Santiago-Martín *et al.*, 2013), las actividades agrícolas también modifican la proporción, el tipo y la actividad de los microorganismos del suelo (Mijangos *et al.*, 2006; Diacono y Montemurro, 2010). Por ejemplo, los fertilizantes químicos, tanto inorgánicos (tipo NPK) como orgánicos, influyen en la biomasa microbiana y en su actividad metabólica generalmente incrementando el valor de estos parámetros (Enwall *et al.*, 2007; Geisseler y Scow, 2014). El uso de enmiendas orgánicas también puede introducir microorganismos exógenos que alteren la composición y la actividad de los autóctonos del suelo (Singh y Agrawal, 2008; de Araujo *et al.*, 2010; Nakatani *et al.*, 2011; Gondim-Porto, 2012; Vierheilig *et al.*, 2012). Dentro de los factores bióticos naturales, la presencia de otros microorganismos, animales, o las propias plantas también regulan la distribución y la actividad de las poblaciones microbianas del suelo pero, a su vez, las poblaciones

microbianas también pueden condicionar la fertilidad del suelo y el estado de las plantas que crecen en él (Zak *et al.*, 2003; Brussaard *et al.*, 2004; Bastida *et al.*, 2008b; Coleman y Wall, 2015; Lange *et al.*, 2015).

Los aspectos físicos y químicos, como los climáticos y edáficos, también regulan la microbiota del suelo (Curiel Yuste *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2010). Por ejemplo, el incremento moderado de la temperatura puede producir un aumento general de la actividad metabólica y de la biomasa microbiana (Fierer *et al.*, 2006; Rey y Jarvis, 2006), al igual que la presencia de agua en el suelo que favorece la activación de las reacciones químicas y, por tanto, la actividad metabólica de los microorganismos (Frey *et al.*, 1999; Geisseler *et al.*, 2011). Por el contrario, un aumento de la temperatura junto con una disminución de la humedad conduce a un estado de sequía que podría seleccionar a los microorganismos mejor adaptados a estas condiciones (Schimel *et al.*, 2007b; Curiel Yuste *et al.*, 2011; Berard *et al.*, 2012). Generalmente, estas variables (temperatura y humedad) definen las estaciones climáticas, por lo que la distribución de los microorganismos tiene en muchos casos una dependencia estacional (Buckeridge *et al.*, 2013; Bevivino *et al.*, 2014). Por otra parte, los aspectos edáficos de tipo químico, como el pH, el contenido en sales o la materia orgánica del suelo, o físicos, como el tamaño de los agregados, pueden condicionar la estructura de las poblaciones del suelo (Rietz y Haynes, 2003; Fierer y Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2009; Lagomarsino *et al.*, 2012).

### 1.1.5 ¿Qué papel tienen los microorganismos en el suelo?

Las comunidades microbianas del suelo participan en los **ciclos biogeoquímicos** de los elementos (carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, hierro,...) a través de las reacciones bioquímicas que desempeñan en el suelo (Morris y Blackwood, 2015). En estos procesos, los compuestos inorgánicos y orgánicos (de origen animal, vegetal, o bien añadidos de forma exógena) son utilizados por los microorganismos para obtener energía y construir sus estructuras. Una vez procesados, los compuestos derivados de su metabolismo tienen varios destinos: 1) Como nutrientes para los vegetales y otros organismos en forma de moléculas sencillas, 2) liberados a la atmósfera en forma de gas, 3) lavados hacia horizontes inferiores, o 4) hacia la formación de compuestos húmicos que constituyen un almacén de carbono y nitrógeno en el suelo (Porta *et al.*, 2003; van der Heijden *et al.*, 2008; Horwath, 2015).

Dentro del ciclo biogeoquímico del carbono (C) los microorganismos se encargan fundamentalmente de la descomposición de la materia orgánica consumiéndola para crecer o para liberar compuestos biodisponibles para las plantas y otros organismos, pero también participan en la liberación de gases como el CO<sub>2</sub>. En particular la emisión de CO<sub>2</sub> sucede relativamente rápido cuando los compuestos de carbono son químicamente lábiles. Por el contrario, si este carbono es más difícil de degradar como, por ejemplo, las ligninas o los taninos, su permanencia puede ser prolongada en el suelo como formas recalcitrantes (Horwath, 2015).

Los microorganismos participan también en varios procesos del ciclo del nitrógeno (N), los cuales tienen una especial importancia en el suelo, ya que el N puede ser un nutriente limitante para el desarrollo de las plantas y los

microorganismos (Schimel y Weintraub, 2003; Agren *et al.*, 2012). Intervienen, por ejemplo, en la **fijación del N** atmosférico para la producción de N microbiano que posteriormente es aprovechado por los vegetales. También lo hacen en la mineralización de los desechos orgánicos (plantas, animales y microorganismos), en la oxidación del amonio que puede dar lugar a nitritos y nitratos (nitrificación) o en el retorno del nitrógeno a la atmósfera a través de la desnitrificación, que en condiciones anóxicas utiliza las formas oxidadas de nitrógeno ( $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) como aceptores de electrones volviendo a la forma original de nitrógeno elemental (Morris y Blackwood, 2015). Además de en los ciclos del C y N, los microorganismos del suelo también participan en los ciclos del fósforo, azufre y hierro, entre otros elementos (Kertesz y Frossard, 2015). Por lo tanto, dentro de los ciclos biogeoquímicos, las poblaciones microbianas son capaces de **descomponer** la materia orgánica para obtener energía y elementos para su autoconstrucción.

Finalmente, se podría decir que la diversidad y versatilidad metabólica de los microorganismos, que derivan en las reacciones que se producen en estos ciclos biogeoquímicos constituyen una red muy compleja que, en términos agrícolas, facilita un flujo de los nutrientes desde el suelo hacia las plantas, lo que promueve el incremento de la **fertilidad del suelo** (Nannipieri *et al.*, 2002; Six *et al.*, 2006; Bastida *et al.*, 2008b). Pero además, también existen más procesos por los cuales los microorganismos pueden favorecer la fertilidad de un suelo, por ejemplo, mediante la degradación de compuestos contaminantes, mediante el control de plagas que afectan a las plantas o mediante la producción de antibióticos frente a bacterias potencialmente patógenas para las plantas (Garbeva *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004; Susilo *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2015).

### 1.1.6 Importancia de los microorganismos para un suelo fértil

Un suelo se considera fértil cuando proporciona condiciones físicas, químicas y biológicas óptimas para el desarrollo vegetal (Diacono y Montemurro, 2010). Los microorganismos intervienen en la fertilidad del suelo a través de relaciones complejas con el propio suelo y las plantas principalmente de dos maneras (Chaparro *et al.*, 2012). Por un lado, mediante la fijación del nitrógeno atmosférico en el suelo, la mejora de la biodisponibilidad de otros elementos químicos y la liberación de sustancias más asimilables por la plantas a partir de la descomposición de desechos orgánicos (Murphy D.V *et al.*, 2007; van der Heijden *et al.*, 2008). Y, por otro lado, mediante la inmovilización de nutrientes en forma de biomasa microbiana o en formas recalcitrantes que constituyen, a largo plazo, una reserva de nutrientes (Brookes *et al.*, 2008). En este proceso podríamos incluir la humificación, donde se transforman los derivados de la materia orgánica de distintas procedencias en compuestos de mayor complejidad química cuya degradación es extremadamente lenta, pudiendo persistir durante cientos de años en el suelo sin degradarse (Guggenberger, 2005; Diacono y Montemurro, 2010).

En el aspecto físico, las sustancias que secretan los microorganismos intervienen favoreciendo la estabilidad de la estructura del suelo que es fundamental para la fertilidad del mismo y para la distribución homogénea del agua.

Concretamente, las bacterias secretan sustancias adherentes en forma de polisacáridos que contribuyen a la formación de micro y macroagregados que proporcionan estabilidad en el suelo (Voroney y Heck, 2015). Un suelo bien estructurado favorece la germinación y el sustento físico de los cultivos, proporcionando un buen reparto del agua evitando la inundación ante un exceso y su escasez en periodos de sequía (Tejada *et al.*, 2006).

En términos puramente biológicos, el mantenimiento de la diversidad microbiana es fundamental para mantener la funcionalidad del suelo y, por tanto, su fertilidad (Kirk *et al.*, 2004; Bhatia, 2008; Kaschuk *et al.*, 2010). La **diversidad microbiana** podríamos dividirla en dos aspectos, uno taxonómico y otro funcional, ambos relacionados entre sí. El primero contempla la variedad de taxones microbianos y, el segundo, la variedad de funciones o reacciones bioquímicas que realizan esos taxones en el suelo (Zak *et al.*, 1994; Lavelle y Spain, 2003). Las perturbaciones que sufre el suelo (temperatura, sequía, fertilización, enmiendas orgánicas) pueden modificar su diversidad microbiana (taxonómica y funcional), bien porque alteran la función de los microorganismos presentes en el suelo, o bien porque desequilibran la abundancia y el reparto de las poblaciones presentes en el suelo (Shade *et al.*, 2012). Por lo tanto, para que se mantenga la funcionalidad del suelo es importante que se conserve su diversidad microbiana original. Una mayor diversidad microbiana suele estar aparejada con una mayor **redundancia funcional**, es decir, con la capacidad que tiene un ecosistema de no perder una función gracias a que ésta es llevada a cabo por otro organismo distinto (Allison y Martiny, 2008). Precisamente esta cualidad conduce a una mayor posibilidad de que una población se mantenga estable frente a una perturbación (Kennedy y Stubbs, 2006; Nakatani *et al.*, 2011; Griffiths y Philippot, 2013). Una de las maneras de cuantificar la estabilidad (frente a una perturbación) de un ecosistema es por medio de la determinación de su **resistencia** y **resiliencia**. La resistencia es la capacidad por la cual se mantienen las características originales de las comunidades de un ecosistema ante una perturbación, mientras que la resiliencia es la capacidad de recuperación del estado original de esas comunidades tras sufrir una alteración (Shade *et al.*, 2012). Conociendo estos parámetros se puede predecir el comportamiento de una población previamente expuesta a una perturbación como, por ejemplo, la sequía (Berard *et al.*, 2012). Hay que destacar que tanto la resistencia como la resiliencia son cualidades independientes, es decir, que una misma comunidad puede tener grados distintos de resistencia y de resiliencia. Esto significa que frente a la misma perturbación, una comunidad microbiana puede presentar una mayor sensibilidad que otra (menor resistencia), independientemente de su capacidad de recuperación del estado original (resiliencia). Controlando estos factores de la microbiota del suelo se puede estimar el estado de la misma y de sus funciones y, por consiguiente, conocer una parte de la fertilidad del suelo.

Resumiendo, una diversidad microbiana elevada (taxonómica y funcional) es de suma importancia para mantener las funciones del suelo, como la degradación de la materia orgánica o de contaminantes emergentes, y la asimilación de algunos compuestos inorgánicos. También es importante para preservar la estabilidad de la microbiota (resistencia y resiliencia) frente a las perturbaciones que el suelo puede sufrir. Es más, incluso se ha relacionado el grado de diversidad microbiana del suelo con el control de la proliferación de microorganismos alóctonos, algunos de ellos

patógenos, ya que, de esta manera, son capaces de competir nutricionalmente con los organismos invasores (Garbeva *et al.*, 2004; van Elsas *et al.*, 2012). Así, se puede prevenir el desarrollo de organismos patógenos para las plantas, permitiendo la disminución del uso de plaguicidas. La suma de estos efectos provoca en el suelo que se mantengan las condiciones químicas, físicas y biológicas que dan lugar a la fertilidad del suelo (Figura 1).

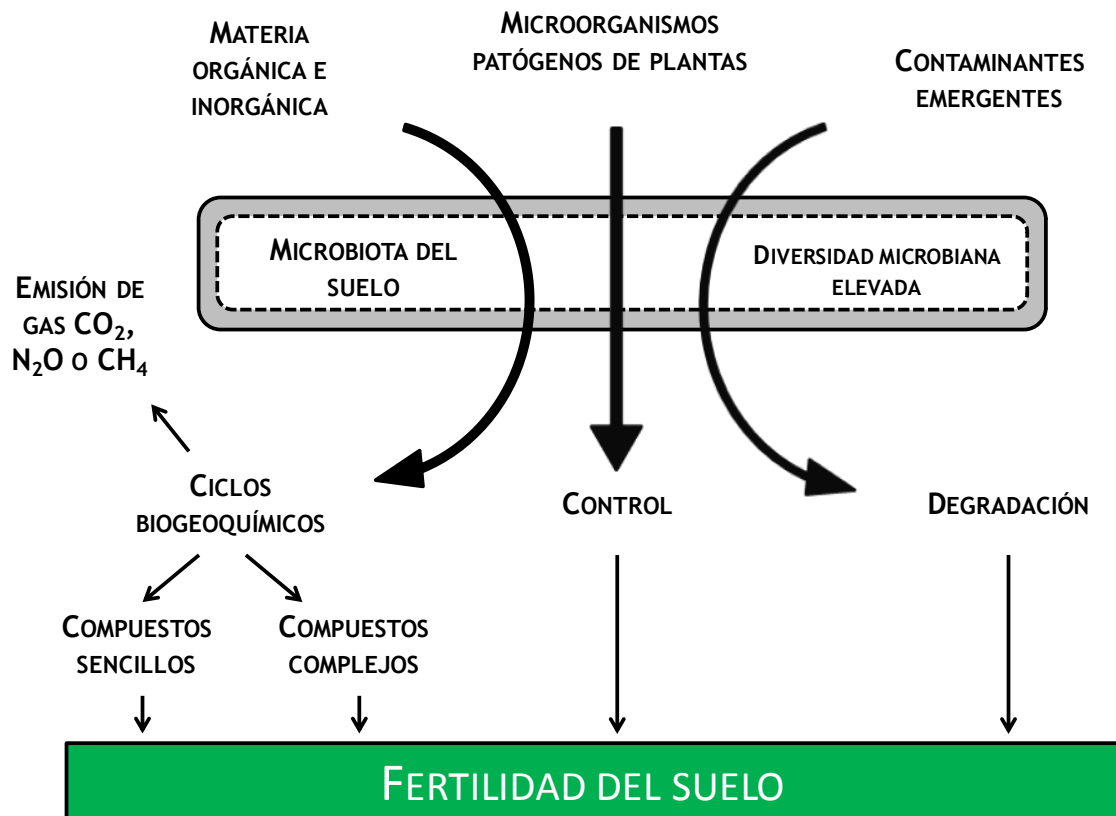


Figura 1. Importancia de los microorganismos para un suelo fértil.

### 1.1.7 Pérdida de la fertilidad del suelo

Las prácticas agrícolas intensivas, las cuales hacen un uso elevado de agroquímicos (pesticidas), fertilizantes de tipo inorgánico (NPK), una roturación agresiva del suelo, así como el exceso de regadío, han potenciado la pérdida de nutrientes y la degradación de los suelos (Tilman *et al.*, 2002; Jangid *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2010; Lal, 2011). En los suelos de clima mediterráneo, las altas temperaturas y las escasas e irregulares precipitaciones están acelerando la degradación del suelo, favoreciendo que se pierda la materia orgánica a mayor velocidad de la que se repone y promoviendo la pérdida de C en forma de CO<sub>2</sub> (Montemurro *et al.*, 2007; Diacono y Montemurro, 2010). Esta disminución de la materia orgánica también afecta a las poblaciones microbianas ya que se genera una pérdida de su biomasa y por tanto de su diversidad produciendo un efecto desfavorable para la fertilidad del suelo (Mader *et al.*, 2002).

Por el contrario, las técnicas más conservativas, propias de la agricultura sostenible, que evitan la roturación e incrementan la fertilización con enmiendas de tipo orgánico, contribuyen a una producción agrícola económicamente sostenible, manteniendo las características del suelo y la diversidad del ecosistema (Fließbach *et al.*, 2007; Coleman *et al.*, 2012). Así, el mantenimiento de la diversidad puede resultar un hecho caro en términos económicos al comienzo pero, sin embargo, los beneficios obtenidos posteriormente pueden ser incluso mayores, por la reducción de costes en regadío, en el uso de pesticidas o de maquinaria agrícola (Pimentel *et al.*, 1997).

## 1.2 ¿Cómo se mejora la fertilidad del suelo?

---

Históricamente el ser humano ha intentado mejorar el rendimiento de las explotaciones agrícolas mediante el uso de fertilizantes que, fundamentalmente, se clasifican en inorgánicos (NPK) u orgánicos (enmiendas orgánicas). En concreto, dentro de estos últimos, la aplicación de residuos orgánicos como enmienda de fertilización en suelos agrícolas es una práctica muy extendida para reciclar estos desechos (Rauch y Becker, 2000; Diacono y Montemurro, 2010), como una alternativa más económica a mantenerlos en vertederos o incinerarlos (Petersen *et al.*, 2003) y, de esta forma, disminuir el uso de fertilizantes de tipo inorgánico (Hargreaves *et al.*, 2008). Estos residuos orgánicos pueden tener diferentes orígenes: desechos vegetales o animales, industrial o urbano (Sofo *et al.*, 2014; Sciubba *et al.*, 2014). Pero todos ellos tienen en común la aportación de grandes cantidades de materia orgánica al suelo que mejoran las propiedades del suelo, incrementan la fertilidad y mejoran las propiedades microbianas (biomasa, actividad y diversidad), ayudando a mantener las funciones que se realizan en el mismo (Montemurro *et al.*, 2004; Carbonell *et al.*, 2011; Sciubba *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de los tratamientos que sufren estos productos antes de su aplicación en agricultura, el uso de las enmiendas orgánicas de procedencia urbana puede provocar efectos adversos a nivel ambiental y sanitario en el suelo (alteraciones químicas, metales pesados, introducción de patógenos,...) (Singh y Agrawal, 2008; Zerzghi *et al.*, 2010; Gondim-Porto, 2012).

### 1.2.1 Los residuos orgánicos de origen urbano

El crecimiento de la población mundial y su concentración en las zonas urbanas conlleva la producción de altas cantidades de residuos en estas áreas. Una gran parte de estos residuos proceden de la recogida de basuras y de la depuración de aguas residuales urbanas (aguas negras, grises y pluviales) (Singh y Agrawal, 2008; Srivastava *et al.*, 2015). En el caso de la Unión europea, en 2008 se generaron más de 88 millones de toneladas de residuos orgánicos procedentes de residuos urbanos (peso seco) y más de 10 millones de toneladas de lodos de depuradora (peso seco), estimándose que en el año 2020 estos valores se incrementarán en un 10% (SEC2010, 2010). Por lo tanto, la gestión de este tipo de residuos ocupa un papel importante dentro de la política ambiental de los organismos europeos y nacionales.

La gestión de los residuos urbanos sólidos se realiza en plantas de residuos, mientras que la de las aguas residuales sucede en las Estaciones de Depuración de Aguas Residuales (EDAR), estando ambas actividades reguladas conforme a la *Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados* y el *Plan Nacional Integrado de Residuos* (PNIR) (Secretaría de Estado de Cambio Climático y Gobierno de España, 2009; MAGRAMA y Gobierno de España, 2009; BOE, 2011). Esta legislación regula que la elaboración de estos productos se realice respetando la protección del medio ambiente y la salud humana, y establece que los productos generados se eliminen preferentemente como fertilizantes en agricultura. Y si esto no fuera posible, se procedería a su incineración o, por último, a su depósito controlado en vertederos.

### 1.2.1.1 Compost de residuos urbanos (*basura compostada*)

Los residuos sólidos urbanos, también llamados basuras, son los desechos sólidos generados en domicilios particulares, comercios, oficinas o servicios y que son gestionados preferentemente por los ayuntamientos mediante el reciclado, la recuperación y la obtención de nuevas materias primas o su utilización para la generación de energía, según contempla el PNIR (Secretaría de Estado de Cambio Climático y Gobierno de España, 2009).

Una vez recogidos, estos residuos son llevados a plantas de tratamiento donde se clasifican y se valorizan. Una de las operaciones de valorización es la recuperación y tratamiento de los compuestos orgánicos para su posterior compostaje, donde sufren una descomposición aeróbica, se reduce la cantidad de patógenos, se sintetizan compuestos más estables y se genera un producto más homogéneo con una mayor seguridad sanitaria y ambiental (**Figura 2.a**) (Cai *et al.*, 2007; Bastida *et al.*, 2008b; Tarrasón *et al.*, 2010; Ramdani *et al.*, 2015). En el proceso de compostaje se pueden diferenciar dos fases principales: descomposición y estabilización.

En la fase de descomposición en la materia orgánica se producen modificaciones químicas y físicas, como la disminución del pH, la degradación de los compuestos más lábiles y el descenso de su volumen (40-50 %). En esta fase la temperatura puede ser variable, oscilando entre los 15-40 °C (fase mesófila) hasta los 65 °C (termófila), reduciéndose posteriormente la temperatura (fase de decrecimiento o maduración). Con el incremento de la temperatura se favorece la eliminación de los microorganismos patógenos y parásitos (Epstein, 1997; Ndegwa y Thompson, 2001). En la fase de estabilización, los residuos se someten a temperaturas menores (25-50 °C), realizándose un control del oxígeno por medio de volteados y la temperatura por medio de sondas. En esta fase se producen los compuestos de materia orgánica más complejos (sustancias húmicas) (de Araujo *et al.*, 2010; Ramdani *et al.*, 2015).



**Figura 2. Basura compostada (a) y lodo de depuradora (b).**

### **1.2.1.2 Lodos de depuradora**

La depuración de las aguas residuales urbanas es un proceso necesario, previo a la devolución de las aguas a los cursos naturales de agua, debido a la presencia de contaminantes químicos, microorganismos patógenos y parásitos (Stackelberg *et al.*, 2004; Nwachuku y Gerba, 2004). Como producto de la depuración del agua se obtienen fangos o lodos de diversa consistencia (**Figura 2.b**). Sin embargo, la elevada presencia de contaminantes y patógenos en estos productos hace necesario disminuir el riesgo potencial de estos residuos por medio de los diferentes procesos de tratamiento de lodos (Bitton, 2005), los cuales también reducen el contenido de agua y estabilizan la materia orgánica. Fundamentalmente, los procesos del tratamiento de los lodos de depuradora son: espesamiento, estabilización, acondicionamiento y deshidratación.

El **espesamiento** consiste en la eliminación del contenido líquido y concentración de los lodos primarios. Con este proceso se elimina el agua libre con el fin de reducir la cantidad de material a tratar, lo que supone una disminución del gasto económico y obteniéndose un material más homogéneo. En la **estabilización** se realiza una digestión microbiana mediante la cual se disminuye la cantidad de compuestos volátiles (olores) y de microorganismos patógenos, produciéndose compuestos más estables a partir del metabolismo de los microorganismos digestores. La digestión puede realizarse en condiciones aerobias o anaerobias. La digestión aerobia del lodo se lleva a cabo en presencia de oxígeno produciéndose CO<sub>2</sub> y agua principalmente. Por otra parte, la digestión anaerobia genera biogás (principalmente CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>), que mediante su combustión puede usarse para la obtención de energía (IDAE y Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía, 2007; Johansen *et al.*, 2013). Una vez estabilizados, los lodos de depuradora sufren un proceso de acondicionamiento y deshidratación. En el proceso de **acondicionamiento** se realiza un secado final, donde también pueden adicionarse compuestos químicos acondicionadores como floculantes orgánicos o inorgánicos para aumentar el tamaño de los coloides y de esta manera facilitar su deshidratación. En la **deshidratación** se elimina el agua por medio de distintos métodos físicos: evaporación, filtración, prensado, centrifugación. Gracias a este proceso se consigue un porcentaje mayor de materia seca y se elimina gran parte de los microorganismos presentes en los lodos.

Por tanto, según su material de procedencia y los procesos que sufren para su elaboración, los residuos orgánicos obtenidos tienen una composición química variable. En cualquier caso, independientemente de su proceso de elaboración, son ricos en materia orgánica, nutrientes esenciales para las plantas y una gran variedad de microorganismos. Sin embargo, pueden contener niveles altos de metales pesados (Zn, Cu y Cd), y xenobióticos, además de microorganismos patógenos y, por eso, su uso posterior (como enmienda agrícola, incinerado o en vertederos,...) se encuentra regulado (Stackelberg *et al.*, 2004; Venkatesan y Halden, 2014).

## 1.2.2 Legislación para la aplicación de los residuos orgánicos como enmienda agrícola

Según los datos de *Eurostat* correspondientes al año 2012, en España se compostaron un 10 % de los residuos urbanos los cuales pudieron emplearse como enmienda orgánica en agricultura (<http://ec.europa.eu/eurostat/product?code=8-25032014-AP>), mientras que, por otra parte, el Registro Nacional de Lodos declara que el 80 % de los lodos procedentes de la depuración de aguas se está destinando para la misma función en agricultura (<http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestionresiduos/flujos/lodos-depuradora/>). En España, la aplicación de estos residuos producidos en las urbes se encuentra regulada para su uso en agricultura (BOE, 1990; Rauch y Becker, 2000; European Commission, 2004; de Araujo *et al.*, 2010; Diacono y Montemurro, 2010; Franco-Otero *et al.*, 2012). Dentro de esta legislación, se hace especial referencia al contenido en metales pesados de las enmiendas que se aplican, debido a que sus niveles en los residuos orgánicos tienen concentraciones superiores a las del suelo, por lo que su aplicación como enmienda puede provocar su acumulación, pudiendo afectar a las plantas y a los microorganismos (Diacono y Montemurro, 2010; Carbonell *et al.*, 2011; de Santiago-Martín *et al.*, 2013).

A nivel microbiológico, la legislación española exige la declaración, por parte de los productores y los gestores de los lodos en agricultura, de la presencia de especies del género *Salmonella* (UNE-EN ISO 6579) y el recuento de la bacteria *Escherichia coli* por medio de métodos selectivos diferenciales de detección de coliformes (ISO 7251), aunque no indica qué niveles son los aceptables (BOE, 2013). En cambio, en otros países como Francia existe una regulación más estricta con este asunto (Brochier *et al.*, 2012) aunque, a nuestro juicio, no lo demasiado detallada como para contemplar otros aspectos importantes relacionados con la transmisibilidad de resistencias microbianas a antibióticos o la transmisión de patógenos (Haynes *et al.*, 2009; Gondim-Porto, 2012).

## 1.2.3 Impacto de los residuos orgánicos en el suelo

La erosión y degradación que sufren los suelos por efecto del clima mediterráneo puede ser remediada mediante el uso de enmiendas orgánicas (Ros *et al.*, 2003b; Roig *et al.*, 2012; Siles *et al.*, 2014). De esta manera se consigue una mejora de las características de la calidad del suelo (Van-Camp L. *et al.*, 2004; Tamanini *et al.*, 2008; Bastida *et al.*, 2008b; Cellier *et al.*, 2012). Sin embargo, no conviene descuidar los posibles riesgos para la salud humana derivados de la aplicación de estos productos, como la contaminación química y/o biológica, o la pérdida de diversidad biológica (Singh y Agrawal, 2008; Berard *et al.*, 2014; Riber *et al.*, 2014). Por estas razones, se ha incrementado el número de trabajos que evalúan el efecto de diferentes tipos de enmiendas orgánicas urbanas en el suelo a lo largo de diferentes periodos de tiempo y diferentes regímenes de aplicación (Bastida *et al.*, 2013; Riber *et al.*, 2014; Ramdani *et al.*, 2015).

### **1.2.3.1 Alteraciones químicas de los suelos enmendados**

La aplicación de residuos orgánicos en el suelo supone principalmente un aporte externo de materia orgánica con nutrientes favorables para las plantas (Mantovi *et al.*, 2005; Diacono y Montemurro, 2010). Este hecho aumenta la capacidad de intercambio iónico del suelo debido al incremento de las cargas negativas, factor clave en la disponibilidad de cationes para las plantas. Además con las enmiendas también se incrementan los compuestos inorgánicos de nitrógeno (amonio, nitratos y nitritos) y el fósforo disponible.

Desde la perspectiva de cómo se afecta el ciclo del C tras la aplicación de enmiendas en el suelo agrícola, fundamentalmente se produce un incremento general del C orgánico ( $C_{org}$ ) (Lal, 2004a; Bastida *et al.*, 2013). La permanencia de este C en el suelo depende del grado de complejidad química de los compuestos de C de la enmienda aplicada, que a su vez depende del proceso de elaboración de la misma (Tarrasón *et al.*, 2010). Una parte de ese  $C_{org}$  se encuentra como fracción soluble ( $C_{sol}$ ) que contiene una proporción considerable de carbono de fácil degradación (lábil) que potencia la actividad de los microorganismos del suelo puesto que es fácilmente degradable. Sin embargo, también parte de este  $C_{org}$  puede ser recalcitrante y presenta una degradación será más lenta, pudiendo permanecer más tiempo en el suelo (Marschner *et al.*, 2003; Blagodatskaya y Kuzyakov, 2008; Hao *et al.*, 2013).

Por otra parte, los compuestos de N también se incrementan con la adición de las enmiendas orgánicas, lo que es importante ya que tiene un carácter limitante en los suelos del clima mediterráneo (Bastida *et al.*, 2009). Al igual que ocurre con los compuestos de carbono, con los de N también existen diferencias según la naturaleza del residuo orgánico que se aplique. Se pueden encontrar compuestos orgánicos (aminoácidos o proteínas) o inorgánicos (amonio, nitratos y nitritos). Los residuos compostados parecen tener una menor proporción de compuestos de N inorgánico (Fourti, 2013), mientras que en los lodos de depuradora sin compostar predominan las formas inorgánicas como el amonio (Smith y Tibbett, 2004). Con respecto a la fracción orgánica del N aportada por las enmiendas, ésta es mineralizada para dar lugar a amonio (Geisseler *et al.*, 2010), que tras sucesivas oxidaciones, puede transformarse en nitrito y nitrato (nitrificación) (Ojeda *et al.*, 2006). Este proceso metabólico se potencia cuando se añaden enmiendas orgánicas al suelo, debido al aumento generalizado de la actividad metabólica. Por su parte, el N inorgánico puede quedar retenido en los coloides del suelo (arcillas o materia orgánica) pudiendo hacerse biodisponible para las plantas (Santibáñez *et al.*, 2007). No obstante, también puede movilizarse hacia horizontes más profundos del perfil del suelo por medio de procesos de lixiviación, pudiendo provocar efectos contaminantes a nivel freático (Esteller *et al.*, 2009).

Sin embargo, existen también efectos químicos perniciosos para la salud de los organismos que viven en el suelo derivados de la aplicación de residuos urbanos, que también pueden crear un riesgo sanitario por introducirse en la cadena alimentaria, como es el caso de los contaminantes orgánicos emergentes (Carbonell *et al.*, 2009; Clarke y Smith, 2011; Zuloaga *et al.*, 2012). A modo de ejemplo, se ha descrito que determinados pesticidas pueden permanecer un mayor tiempo en el suelo al encontrarse protegidos por la materia orgánica añadida y no ser degradados por los

microorganismos (Said-Pullicino *et al.*, 2004). Otros compuestos que suponen un riesgo para la salud son los metales pesados. Su presencia ha sido detectada en las enmiendas orgánicas (Singh y Agrawal, 2008; Poulsen *et al.*, 2013; Berard *et al.*, 2014) y es un factor limitante a la hora de su utilización en agricultura, por lo que se promueve la disminución de su contenido mediante la separación de los residuos antes de la elaboración de las enmiendas (Hargreaves *et al.*, 2008). Sin embargo, una vez en el suelo, estos elementos pueden ser inmovilizados por el contenido en sustancias húmicas y por el pH (básico) o bien ser movilizados por lixiviación, pudiéndose transferir a las aguas subterráneas (Singh y Agrawal, 2008). La presencia de metales en el suelo puede generar un estrés sobre la microbiota del suelo (Fließbach *et al.*, 1994; Giller *et al.*, 1998).

### **1.2.3.2 Alteraciones físico-químicas y físicas de los suelos enmendados**

Como hemos visto hasta ahora, la aplicación de enmiendas produce cambios en la composición química del suelo. Asociados a ellos hay otros cambios importantes como son el pH, la conductividad eléctrica o la cantidad de agua. El efecto sobre el pH del suelo depende del tipo de enmienda que se adiciona y sobre todo del propio suelo (Choudhary *et al.*, 2011), pudiéndose producir un aumento o una disminución (Singh y Agrawal, 2008). Los cambios de pH en el suelo influyen sobre la disponibilidad de los nutrientes y de algunos contaminantes (metales pesados), pero también sobre la actividad biológica del suelo (Hargreaves *et al.*, 2008; Franco-Otero *et al.*, 2012). Por otra parte, la presencia de compuestos cargados, así como de sales inorgánicas tras la aplicación de enmiendas supone también un incremento de la conductividad eléctrica (Pascual *et al.*, 2007). A altas concentraciones estas sustancias pueden llegar a ser nocivas para el desarrollo de algunos cultivos vegetales y de algunos microorganismos (Sardinha *et al.*, 2003; Singh y Agrawal, 2008; Hargreaves *et al.*, 2008; Iwai *et al.*, 2012). La adición de enmiendas también produce un incremento de la humedad, muchas veces ocasionado por el contenido de agua que contienen los propios residuos, aunque también porque se puede mejorar la capacidad de retención de agua del suelo (*water holding capacity*, WHC), lo cual favorece la actividad de los microorganismos del suelo (Manzoni *et al.*, 2011; Schjønning *et al.*, 2011; Berard *et al.*, 2012).

El aporte de materia orgánica mejora las características físicas del suelo (Diacono y Montemurro, 2010; Hemmat *et al.*, 2010; González-Ubierna *et al.*, 2012). Así, su aplicación se ha relacionado con la presencia de compuestos de carbono lábiles que intervienen en la formación de agregados, al menos a corto plazo (García-Orenes *et al.*, 2009). Pero, además, otras fracciones del carbono mucho más complejas también son capaces de interactuar con las fracciones minerales del suelo, contribuyendo a que la estabilidad de los agregados resultantes sea mayor (Tarrasón *et al.*, 2007). En este proceso las cargas eléctricas de la materia orgánica promueven la formación de nuevos enlaces iónicos, produciéndose la formación de poros y la disminución de la densidad aparente y, finalmente, incrementándose la estabilidad del agregado y mejorándose la WHC, como se ha comentado anteriormente (Singh y Agrawal, 2008; Hargreaves *et al.*, 2008). Esta mejora de las propiedades físicas del suelo por incremento de la agregación y de la acumulación de agua es una medida preventiva frente a la erosión del suelo (Ojeda *et al.*, 2003) y mejora la estabilidad y el

desarrollo de las funciones de los ecosistemas edáficos (Tejada *et al.*, 2009; Jha *et al.*, 2012).

### **1.2.3.3 Alteraciones microbiológicas de los suelos enmendados**

Los cambios de carácter químico y físico tras la aplicación de enmiendas alteran la microbiota del suelo a nivel poblacional y metabólico (Bastida *et al.*, 2008b; Abubaker *et al.*, 2013). Aunque realmente se trata de un sistema interrelacionado (**Figura 3**).

La estructura de las poblaciones puede modificarse porque se promueve el crecimiento de algunos grupos microbianos, presentes ya en el suelo o introducidos con las enmiendas (Ros *et al.*, 2003b; Jangid *et al.*, 2008; Bastida *et al.*, 2008b; Tejada *et al.*, 2009). Por el contrario, también puede producirse la inhibición de algunos grupos microbianos debido al exceso de nutrientes, cambios en el pH, aumento de salinidad, presencia de metales pesados u otros contaminantes presentes en las enmiendas. Por regla general, en términos metabólicos se produce el incremento de varias características microbianas del suelo, como son la biomasa microbiana y la actividad metabólica (Anderson y Domsch, 1990; Campbell *et al.*, 2003; Nannipieri *et al.*, 2003; Diacono y Montemurro, 2010), así como modificaciones en el perfil metabólico de consumo de determinados sustratos por parte de las poblaciones del suelo (Fraç *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2015). Por lo tanto, los cambios microbianos que se producen en el suelo tras la aplicación de las enmiendas pueden ser indicativos, de manera indirecta, de alteraciones en el estado físico y químico y por este motivo su observación se realiza para la evaluación de la calidad del suelo (Anderson, 2003; Bastida *et al.*, 2008c).

Por otro lado, aunque el tratamiento de las enmiendas durante su producción reduce de forma significativa la presencia de bacterias patógenas, la eliminación de las mismas no está totalmente garantizada (Bonjoch y Blanch, 2009). De hecho, en suelos enmendados se ha detectado la presencia de coliformes fecales u otras bacterias de origen fecal (Epstein, 1998; Hargreaves *et al.*, 2008; Rivière *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2013), las cuales pueden causar un riesgo a nivel sanitario y ambiental por ser patógenas o por ser potencialmente transmisoras de resistencias a antibióticos (Singh y Agrawal, 2008; Gondim-Porto, 2012; Fraç *et al.*, 2014; Riber *et al.*, 2014). De esta forma, con la aplicación de enmiendas orgánicas se podría modificar la microbiota natural del suelo por la introducción de microorganismos alóctonos, además de compuestos químicos tóxicos (como metales, detergentes, pesticidas o derivados farmacéuticos). Esto puede suponer un riesgo ambiental y sanitario en el suelo, ya que podrían proliferar microorganismos patógenos que pueden llegar a los cultivos o al agua además de producirse una alteración de la biodiversidad del suelo lo que conlleva efectos negativos en su funcionalidad y fertilidad.

# APLICACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN EL SUELO

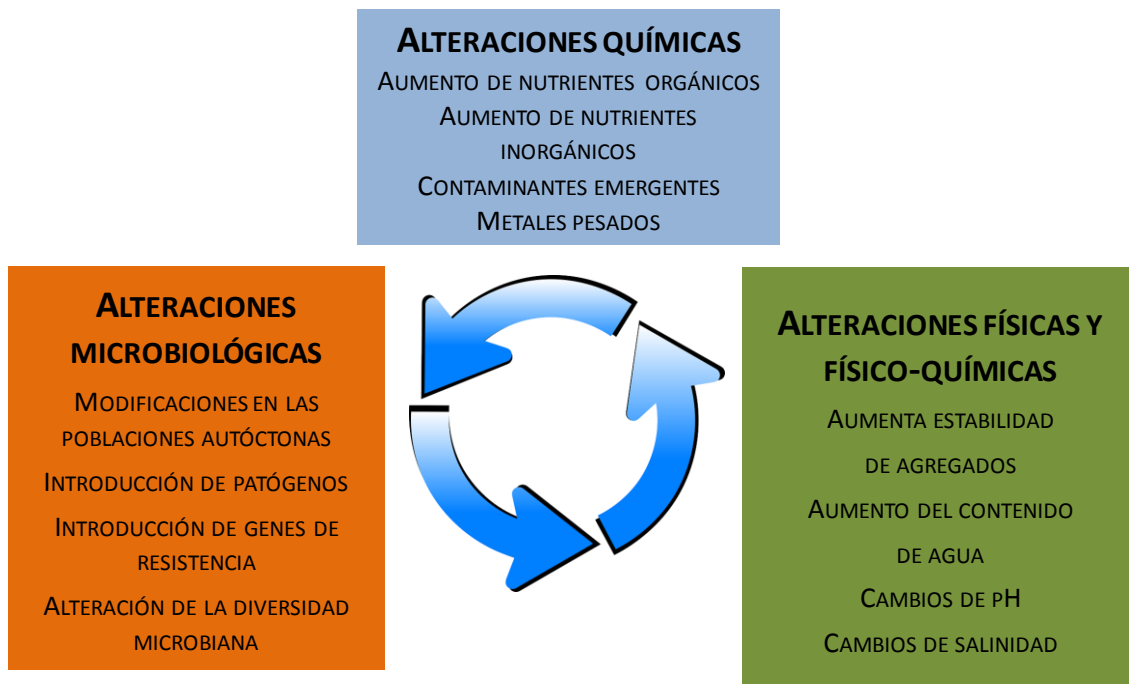


Figura 3. Alteraciones producidas en el suelo tras la adición de enmiendas orgánicas.

## 1.3 ¿Cómo se puede determinar si la aplicación de enmiendas orgánicas es perjudicial para el suelo?

---

Como hemos podido comprobar en los apartados anteriores, las alteraciones que se producen en el suelo (entre las que se encuentran las derivadas de la aplicación de enmiendas orgánicas) son beneficiosas o perjudiciales para el suelo en función de diversos parámetros medidos. Una perspectiva a partir de la cual se pueden contemplar estos parámetros es a través del estudio de la salud o de la calidad del suelo. A grandes rasgos, los términos de *salud* y *calidad* del suelo vienen a definir, con sus matices, la capacidad del suelo de realizar sus funciones. Estos términos pueden emplearse semánticamente de forma indistinta. No obstante, hemos preferido utilizar el término *salud del suelo* porque consideramos que tiene un significado más amplio que engloba el uso del suelo en agricultura dentro de un contexto de preservación del ambiente.

### 1.3.1 ¿Qué significa el término *salud del suelo*?

Una de las definiciones más establecidas de *salud del suelo* en la literatura científica se refiere a “la capacidad que tiene un suelo vivo de desarrollar sus funciones de ecosistema, llevando a cabo fines agropecuarios de forma sostenible, manteniendo la calidad del aire y del agua y promoviendo, así, la salud de las plantas, animales y humanos” (Doran, 2002). Cuando el ecosistema del suelo se desequilibra y comienza a necesitar el aporte externo de nutrientes para la producción vegetal se produce una pérdida de su salud (Brussaard *et al.*, 2004). Esta situación tiene lugar en diversas circunstancias: cuando se retira la cubierta vegetal del suelo, cuando se producen determinados eventos naturales (e.g. incendios), o cuando se emplean en el suelo técnicas de cultivo intensivas que provocan la pérdida de nutrientes (Diacono y Montemurro, 2010). En esta línea, el suelo del clima mediterráneo se ha señalado como uno de los suelos más especialmente afectados (Siles *et al.*, 2014).

### 1.3.2 ¿Cómo podemos evaluar la salud del suelo?

Para determinar el estado de la salud de un suelo es necesario analizar una serie de características o indicadores químicos, físicos y biológicos, que responden de forma diferente a las perturbaciones que sufre el suelo (Doran, 2002). La textura del suelo, la estabilidad de los agregados, la humedad y la porosidad son los indicadores físicos más utilizados, mientras que los indicadores químicos más empleados son los que determinan la cantidad de la materia orgánica, el carbono total, el nitrógeno total y algunos compuestos minerales (Idowu *et al.*, 2008). Sin embargo, la información que proporcionan todos estos indicadores se encuentra incompleta sin la aportación de los indicadores de tipo biológico, que proporcionan una respuesta a veces más rápida y de mayor riqueza porque aportan información acerca de las funciones que se realizan en el suelo (Mijangos *et al.*, 2006). En términos generales, desde un punto de vista puramente microbiológico, los tres tipos de indicadores pueden clasificarse en **no microbianos** y **microbianos** (Garbisu *et al.*, 2011). Dentro de los primeros podríamos

incluir los químicos y físicos y algunos biológicos de carácter no microbiológico, basados en plantas o en animales, como la medición de la mesofauna (microartrópodos y nematodos) y macrofauna (macroartrópodos y anélidos). Los **microbianos** se dividen en indicadores de la cantidad de biomasa, como el carbono microbiano ( $C_{mic}$ ) del suelo, la tasa respiración inducida a través de sustrato (SIR) o el nivel de ATP; e indicadores de la actividad microbiana, como la respiración basal (RB), el N degradable, la nitrificación potencial o la actividad de determinadas enzimas. Por último, se podrían mencionar los indicadores de diversidad microbiana o funcional, como la determinación de los perfiles metabólicos o CLPPs (*community level physiological profiles*) (Bhatia, 2008).

### 1.3.3 Indicadores no microbianos

#### 1.3.3.1 Químicos

Aunque el contenido de materia orgánica puede considerarse como un indicador de tipo biológico (Idowu *et al.*, 2008), en nuestro caso lo hemos clasificado dentro de los químicos (Veum *et al.*, 2014). Está considerada como un indicador muy útil, ya que tiene una presencia muy ubicua en el suelo y porque aporta información sobre la productividad del suelo y la estabilización física de su estructura (Lal, 2004b; Lal, 2006; Giacometti *et al.*, 2013). Y se correlaciona de forma positiva con la fertilidad del suelo al influir directamente en el almacenamiento de otros nutrientes esenciales, como el N, la capacidad de retención del agua, y la estabilidad de los agregados (Bennett *et al.*, 2010; Veum *et al.*, 2014).

Para completar el conjunto de indicadores químicos de la salud del suelo, Idowu y colaboradores realizaron una selección de componentes químicos también importantes en estos términos (Idowu *et al.*, 2008). Entre ellos se pueden destacar el fósforo disponible y algunos metales (K, Cu, Fe, Mn y Zn). Por nuestra parte, también consideramos relevante la inclusión del estudio de algunos metales pesados y otros contaminantes orgánicos emergentes como, por ejemplo, derivados de la industria química o farmacéutica (plásticos, gomas, fragancias, hormonas, antibióticos,...) (Poggio *et al.*, 2008; Clarke y Smith, 2011).

La aplicación de enmiendas orgánicas en el suelo produce un incremento del carbono orgánico total, del nitrógeno y del fósforo disponible (Sharma *et al.*, 2010; Katterer *et al.*, 2014; Aparna *et al.*, 2014). Este incremento de materia orgánica, además de a nivel químico, provoca efectos a nivel físico y biológico, los cuales se encuentran interrelacionados (Diacono y Montemurro, 2010), por lo que su estudio es de extrema importancia en los suelos enmendados con residuos orgánicos.

#### 1.3.3.2 Indicadores físicos y físico-químicos.

Generalmente, la determinación de estos indicadores tiene un coste bajo y se pueden medir de forma sencilla. Entre los indicadores que hemos clasificado como físicos, se encuentran la textura del suelo, la densidad aparente, la porosidad y la estabilidad de los agregados, que guardan relación con la consistencia del suelo. Estos

indicadores pueden correlacionarse con procesos hidrológicos como la escorrentía o la infiltración (Schoenholtz *et al.*, 2000; Arshad y Martin, 2002; Sharma *et al.*, 2010), por lo que a partir de sus valores se puede estimar el grado de erosión que puede sufrir el suelo analizado (Dexter, 2004). En general, los suelos que presentan una mayor estabilidad de su estructura cuentan con un mayor contenido de materia orgánica (Majumder *et al.*, 2010; Bini *et al.*, 2013), un grado elevado de macroporosidad, de permeabilidad frente al agua y al aire y con un óptimo desarrollo de las raíces vegetales en el suelo (Tejada *et al.*, 2006). Estas condiciones favorecen la existencia de diferentes nichos biológicos, promoviendo la actividad de los microorganismos y el mantenimiento de su diversidad (Qin *et al.*, 2010; Lagomarsino *et al.*, 2012).

Como indicador de tipo físico-químico de la salud del suelo, podemos considerar la determinación de la conductividad eléctrica (CE), que se encuentra relacionada con la salinidad del suelo. El incremento de este parámetro ha sido relacionado con un descenso de la productividad vegetal (Gupta y Abrol, 1990; Doran y Zeiss, 2000; Arshad y Martin, 2002; Eigenberg *et al.*, 2002; Ferreras *et al.*, 2006) y con alteraciones de la biomasa o de la estructura de las poblaciones microbianas del suelo (Pankhurst *et al.*, 2001; Sardinha *et al.*, 2003; Jorge-Mardomingo *et al.*, 2013). Por otra parte, el pH del suelo también ha sido empleado como indicador en un elevado número de investigaciones, ya que su valor se encuentra muy relacionado con la distribución de los nutrientes en el suelo, la toxicidad de algunos compuestos, como los metales pesados (Schoenholtz *et al.*, 2000; Arshad y Martin, 2002; Singh y Agrawal, 2008), (de Santiago-Martín *et al.*, 2013), e influye sobre la distribución de la microbiota del suelo de forma muy directa (Fierer y Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2009).

Las investigaciones de suelos tratados con enmiendas orgánicas señalan alteraciones de algunas de estas variables en el suelo como, por ejemplo, el descenso generalizado del pH, el aumento de la conductividad eléctrica y del grado de humedad medida en el suelo (Melero *et al.*, 2006; González-Ubierna *et al.*, 2012; Ge *et al.*, 2013). Por otro lado, el incremento de la materia orgánica contribuye a la formación de agregados en el suelo y, por tanto, a la estabilidad de su estructura física (Bongiovanni y Lobartini, 2006; Tejada y González, 2007; Verchot *et al.*, 2011).

### ***1.3.3.3 Indicadores biológicos (no microbianos)***

Cada vez se encuentra más extendido el uso de los indicadores biológicos para evaluar la salud del suelo debido a la importancia de los procesos biológicos en las funciones del suelo y la sensibilidad que muestran frente a las alteraciones del suelo como, por ejemplo, la aplicación de enmiendas orgánicas (Fliessbach *et al.*, 2007; Creamer *et al.*, 2014). El tipo de organismos que se puede utilizar es muy variado, pero habitualmente se usan invertebrados como los artrópodos y anélidos por su elevada diversidad en el suelo y proximidad a los microorganismos (Filip, 2002; Lavelle y Spain, 2003). Los **anélidos**, como las lombrices de tierra, se consideran buenos indicadores biológicos de la salud del suelo por su capacidad de producir canales y mejorar la aireación y distribución de agua, además de por ser portadores de una microbiota característica. En el caso de los **artrópodos**, la mayoría de ellos desarrollan alguna fase de su ciclo vital en el suelo favoreciendo la circulación del aire y del agua, además de formar parte de la cadena trófica, lo que redundaría en una mejor distribución de

nutrientes a lo largo del suelo aumentando su disponibilidad para los microorganismos (Coleman y Wall, 2015).

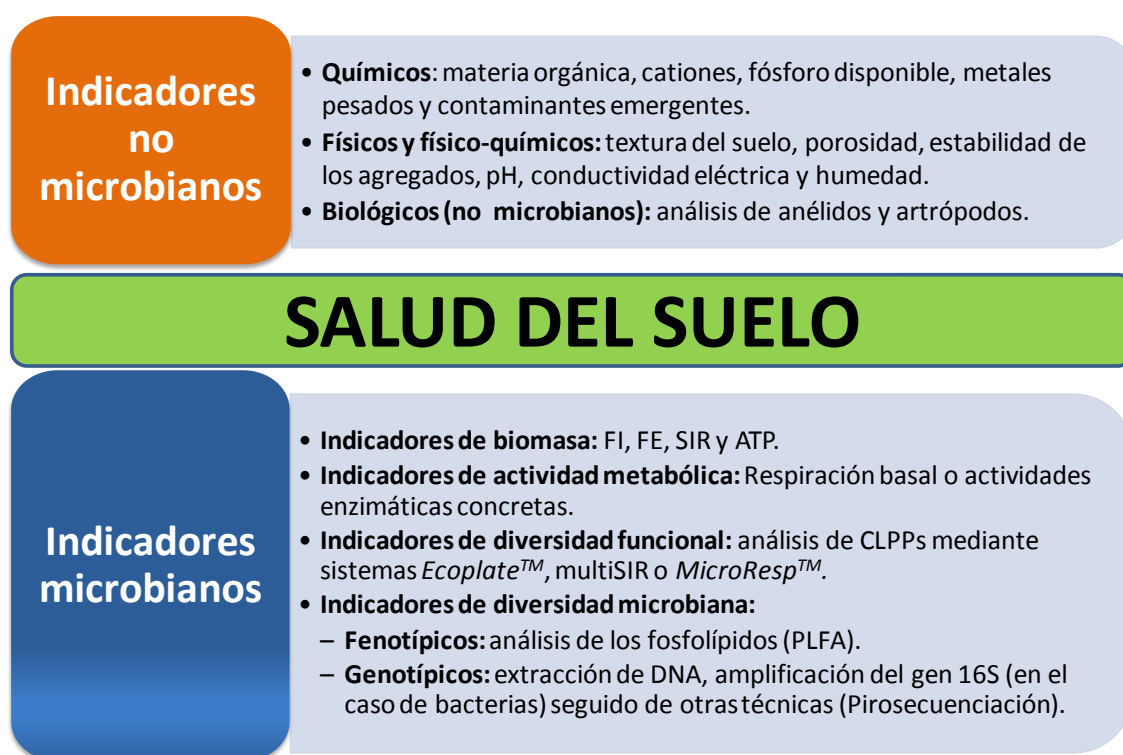


Figura 4. Indicadores de la salud del suelo.

### 1.3.4 Indicadores microbianos

Los indicadores microbianos son de gran importancia porque miden con rapidez y sensibilidad el estado del suelo frente a distintos usos agrícolas y tratamientos (Fliessbach *et al.*, 2007; García-Orenes *et al.*, 2013). Esto es debido a que el valor de estos indicadores depende de otros previamente comentados, como el contenido de materia orgánica, el pH, la estructura física del suelo, o de otros aspectos ambientales, como la temperatura y la humedad (Arshad y Martin, 2002; Brockett *et al.*, 2011).

#### 1.3.4.1 Indicadores de biomasa y actividad metabólica

La medición de la biomasa microbiana y su actividad metabólica se ha empleado en un gran número de análisis del estado de suelos alterados por diferentes motivos, como la influencia de los factores climáticos, técnicas agrícolas o diferentes regímenes de fertilización (Pérez-Piqueres *et al.*, 2006; Chapman *et al.*, 2007; Singh y Agrawal, 2008; Li *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2014).

La **biomasa microbiana** del suelo constituye la parte de los microorganismos vivos presentes en él y se ha relacionado con distintos aspectos como las funciones de

los microorganismos del suelo, la diversidad microbiana, la actividad enzimática, la descomposición de residuos orgánicos, los ciclos de los elementos, la solubilización de algunos nutrientes, la degradación de compuestos xenobióticos nocivos, la estructura del suelo, el almacenamiento de la materia orgánica y el control de patógenos de las plantas (Kaschuk *et al.*, 2010). Existen tres métodos habituales para la determinación de este parámetro (Kandeler, 2015): 1) por el método fumigación-incubación (FI) en el que se compara el CO<sub>2</sub> emitido en dos muestras del mismo suelo, una fumigada con cloroformo y otra no, (Jenkinson y Powlson, 1976), 2) por el método fumigación-extracción (FE) en el que se compara el carbono microbiano extraído de dos muestras del mismo suelo, una fumigada con cloroformo y otra no, medido mediante oxidación con permanganato potásico (Vance *et al.*, 1987) y 3) por determinación de la producción de CO<sub>2</sub> en presencia de una solución de glucosa o extracto de levadura (*Substrate induced respiration*, SIR) (Anderson y Domsch, 1978; Fierer y Schimel, 2003) que se produce por la estimulación de la respiración de parte de la población viva del suelo. Estas son las técnicas más empleadas, aunque con la medición de ATP en el suelo también se puede estimar la biomasa (Jenkinson y Oades, 1979), además de ser también un indicador de la actividad de las poblaciones del suelo (Dilly, 2001).

Dentro de la parte que se refiere a la **actividad microbiana**, se puede determinar la respiración basal del suelo (RB) (Bastida *et al.*, 2008c; Creamer *et al.*, 2014) o las actividades metabólicas concretas frente a determinados sustratos (actividades enzimáticas). En el primero de estos procesos se mide la producción de CO<sub>2</sub> debida a la respiración o mineralización de la materia orgánica presente en el suelo, la cual depende entre otros factores de su grado de complejidad y cantidad (Zhang *et al.*, 2006). Así, la pérdida de materia orgánica del suelo, por ejemplo por deforestación, reduce el contenido en materia orgánica y, por tanto, la RB de sus poblaciones microbianas (Bastida *et al.*, 2006). Por el contrario, en un suelo agrícola manejado de forma sostenible la actividad microbiana es mayor, favoreciéndose un aumento de su RB (Babujia *et al.*, 2010). El segundo de estos indicadores en realidad consiste en la medición de un conjunto de actividades enzimáticas que sirven para indicar la salud del suelo cuando se observan variaciones en ellas (Nannipieri *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Acosta-Martínez *et al.*, 2007; Bowles *et al.*, 2014). Las actividades enzimáticas de los microorganismos pueden proceder de enzimas constitutivas o adaptativas, relacionadas con la proliferación o con algunas reacciones concretas de los ciclos biogeoquímicos (Schimel y Bennett, 2004; Kandeler, 2015). Y también son capaces de indicar el tipo de actividad microbiana. Por ejemplo, la actividad de la catalasa y deshidrogenasa indicarían la actividad interna de los microorganismos porque son enzimas intracelulares, mientras que las enzimas hidrolasas (como la ureasa, proteasa, fosfatasa y glucosidasa, que son extracelulares) se emplean para conocer la cantidad y la calidad de la materia orgánica del suelo, ya que participan en sus procesos de degradación (Castaldi *et al.*, 2008). En general, estas técnicas detectan un incremento de la biomasa y la actividad metabólica de las poblaciones microbianas del suelo tras la adición de las enmiendas debido al incremento en nutrientes (Singh y Agrawal, 2008; de Araujo *et al.*, 2010) y son lo suficientemente sensibles como para aportar información acerca del tipo de enmienda utilizada y, además, de informar si ésta contiene algún compuesto tóxico que pudiera afectar a la microbiota del suelo (de Araujo *et al.*, 2010; Tarrasón *et al.*, 2010).

### **1.3.4.2 Indicadores de la diversidad funcional**

Este tipo de indicadores mide los perfiles de consumo de una serie de sustratos y su uso cada vez se encuentra más extendido porque aporta información sobre los procesos metabólicos que el suelo es capaz de desempeñar. Es de gran utilidad especialmente cuando no es posible obtener una información más precisa de las poblaciones, como su diversidad taxonómica (Kennedy y Smith, 1995; Sharma *et al.*, 2010; Kandeler, 2015). Teniendo en cuenta que el metabolismo microbiano es reflejo de la diversidad genética y los factores ambientales y ecológicos, los perfiles metabólicos son de gran utilidad para determinar el estado del suelo (Zak *et al.*, 1994). Así, una de las formas de determinar la diversidad funcional es por medio de los perfiles metabólicos de consumo de una serie de sustratos orgánicos o CLPPs (*Community-level physiological profiles*) (Garland y Mills, 1991), puesto que el metabolismo de los sustratos de carbono es fundamental para el desarrollo de las funciones ecológicas que realizan los microorganismos en el suelo (Campbell *et al.*, 2008; Lerch *et al.*, 2013). Existen diferentes dispositivos comerciales para la medición de CLPPs. El método original fue desarrollado por Garland como *Biolog plate*, que consistió en un ensayo miniaturizado de la degradación por oxidación de 95 sustratos de carbono donde se produce la reducción de un compuesto que da color en el medio de cultivo (Garland y Mills, 1991). La selección de los sustratos de carbono utilizados se basó en aquellos presentes de forma habitual en el suelo, perfeccionándose más tarde con nuevos sustratos de una mayor relevancia ecológica (Campbell *et al.*, 1997). Posteriormente, se introdujeron mejoras en estos sistemas, como por ejemplo en el sistema *Ecoplate*<sup>TM</sup>, que disponía únicamente de 31 sustratos más específicos (Insam, 1997). La principal crítica a estos sistemas reside en que la actividad se mide únicamente en la fracción procedente de un extracto de suelo (Chapman *et al.*, 2007). Además de estos sistemas, otros se basan en la determinación del oxígeno consumido para la degradación de los distintos sustratos (Garland *et al.*, 2003) y otros que, por el contrario, miden la cantidad de CO<sub>2</sub> emitida en el mismo proceso. Dentro de estos últimos, Degens y colaboradores desarrollaron un método en el que se medía la respiración inducida por los sustratos (SIR) con muestras de suelo entero introducidas en botellas (multi-SIR) (Degens y Harris, 1997). Posteriormente, esta metodología fue miniaturizada en placas multipocillo por Campbell en el dispositivo *Microresp*<sup>TM</sup> (Campbell *et al.*, 2003). *MicroResp*<sup>TM</sup> ofrece un método rápido y sensible para la determinación de CLPPs en el suelo, por lo que se ha utilizado para diferentes tipos de suelos de cultivo, suelos contaminados, suelos tratados con distintas enmiendas o bajo distintas condiciones ambientales (Campbell *et al.*, 2008; Oren y Steinberger, 2008; Berard *et al.*, 2011; Berard *et al.*, 2012; Wakelin *et al.*, 2013; Berard *et al.*, 2014). Con el uso de estas técnicas en los suelos tratados con enmiendas orgánicas no hay un único resultado y se ha comprobado la aparición tanto de un incremento de la diversidad catabólica (CLPP) (Fraç *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2015), como una disminución (Bastida *et al.*, 2013). Sin embargo, las técnicas basadas en la medición de CLPPs son útiles para discriminar la presencia de diferentes enmiendas orgánicas en el suelo, así como para determinar el estado de su microbiota (Pérez-Piqueres *et al.*, 2006; Cordovil *et al.*, 2011).

### **1.3.4.3 Indicadores de la diversidad microbiana**

La salud de un suelo puede ser evaluada analizando la estructura de las comunidades microbianas, dado que las variaciones de éstas son muy sensibles a los cambios producidos en el suelo como, por ejemplo, tras el uso de distintas técnicas agrícolas (Allison y Martiny, 2008; Rachid *et al.*, 2013). Según Alkorta y colaboradores, las técnicas que analizan las comunidades microbianas se pueden clasificar en **fenotípicas** o **genotípicas**. Las primeras recogerían los indicadores comentados en el punto anterior, correspondientes a la funcionalidad de las poblaciones (CLPPs) y las actividades enzimáticas, y al estudio molecular de otras estructuras celulares (fosfolípidos), mientras que las segundas englobarían al conjunto de técnicas moleculares derivadas del estudio del material genético, que son independientes de cultivo (Alkorta *et al.*, 2003). La principal razón que motiva el uso de estas técnicas moleculares radica en su mayor significación estadística ya que analiza un mayor número de datos de las poblaciones presentes en las muestras de suelo. En cambio, las técnicas dependientes de cultivo (fenotípicas) solamente son capaces de detectar una pequeña parte de la microbiota del suelo (cerca al 10 % en el caso de las bacterias), debido a la dificultad que existe a la hora de desarrollar condiciones de crecimiento apropiadas (Torsvik *et al.*, 1998; Atlas y Bartha, 2002; Shokralla *et al.*, 2012).

Entre las técnicas **moleculares** podemos encontrar las que miden algunas estructuras celulares o las que se basan en la determinación del material genético presente en el suelo. En las primeras, una de las técnicas más empleadas es la que estudia la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de membranas celulares (*phospholipid fatty acid analysis*, PLFA) que es distinta en función del tipo de microorganismo, pudiéndose determinar de esta manera las proporciones existentes de cada uno de ellos entre los distintos tipos de comunidades microbianas y, de esta forma, conocer si se han producido alteraciones tras distintas condiciones. Esta técnica se ha empleado en el análisis del suelo bajo distintas condiciones ambientales (Frostegård *et al.*, 1991; Bossio *et al.*, 1998; Bailey *et al.*, 2002; Normand *et al.*, 2015), o por el uso de distintas enmiendas (Petersen *et al.*, 2003; Bastida *et al.*, 2008b; Nicolás *et al.*, 2014). A pesar de la rapidez de esta técnica, el uso de la misma podría ser impreciso en algunos casos ya que la proporción de estos componentes de membrana es variable según las condiciones ambientales en las que se encuentren los microorganismos y su estatus fisiológico (Joux *et al.*, 2015), por lo que se sugiere el empleo de otras técnicas con una mayor resolución, como aquellas basadas en el análisis del material genético (García-Orenes *et al.*, 2013).

Estas técnicas están basadas en el genotipo y más concretamente en el estudio de la metagenómica (Myrold *et al.*, 2014). Para el estudio de las bacterias, muchas de ellas se encuentran basadas en la secuenciación del gen 16S bacteriano, cuyo análisis ha contribuido a grandes avances para el estudio de la biodiversidad y la ecología microbiana (Tringe *et al.*, 2005; Elshahed *et al.*, 2008; Bevivino *et al.*, 2014). La amplificación de este gen seguida de distintos métodos, denominados *de huella digital* (*fingerprinting*), como DGGE/TGGE, T-RFLP, ARDRA, RISA (Kirk *et al.*, 2004), o simplemente utilizando técnicas de secuenciación sencillas (Sanger) o de tipo masivo como la pirosecuenciación (Roesch *et al.*, 2007; Hamady *et al.*, 2008; Ros *et al.*, 2011; Curiel Yuste *et al.*, 2014), son de gran utilidad para conocer la composición de las comunidades microbianas en diferentes ambientes. Una de las ventajas de estas

técnicas es que se puede profundizar en todos los niveles taxonómicos de las poblaciones desde el nivel de *filo* bacteriano hasta el de *especie*. No obstante, el concepto de *especie* en microbiología es complicado de definir dada la gran variabilidad que tienen los microorganismos así como la existencia de procesos de transmisión horizontal de material genético entre diferentes organismos. Sin embargo, pese a la potencia de estas técnicas, éstas no deben de considerarse de forma única puesto que pueden presentar limitaciones (Ushio *et al.*, 2014). Por ello, es necesario complementar la información obtenida entre diversas técnicas (Ge *et al.*, 2013).

Por lo tanto, la importancia de medir la salud del suelo por medio de indicadores microbianos moleculares es debida a la elevada proporción de información genética que nos proporciona (Bastida *et al.*, 2008c), que se encuentra basada en un rango de 3000 a 11000 genes por gramo de suelo (Torsvik y Øvreås, 2002). Por esta razón, el incremento en el número de estudios que usan estos indicadores ha crecido de forma importante (Fierer *et al.*, 2012b; Carbonetto *et al.*, 2014). Como ya se ha comentado previamente, la diversidad microbiana es de gran importancia para que el suelo pueda llevar a cabo sus funciones. Por lo que con la información obtenida mediante estos indicadores microbianos genéticos podemos describir la diversidad taxonómica de las poblaciones presentes en el suelo, además de la diversidad funcional, por ejemplo mediante la determinación de genes que codifiquen enzimas involucradas en distintas funciones del suelo (Bastida *et al.*, 2008c).

En términos de diversidad microbiana, la adición de enmiendas en el suelo provoca distintos efectos. La mayor parte de los estudios señala un incremento de la diversidad, tanto taxonómica como funcional, debido a la adición externa de una mezcla de compuestos orgánicos (Farrell *et al.*, 2010; Thuy *et al.*, 2014; Zhen *et al.*, 2014). Sin embargo, en algunos casos también puede producirse una disminución de la misma (Chaudhry *et al.*, 2012), debida a diferentes aspectos relacionados directamente con las enmiendas como, por ejemplo, el contenido en metales pesados (Gans *et al.*, 2005), o bien, a cambios físico-químicos como la modificación del pH (Fierer y Jackson, 2006). Otra razón, ahora microbiológica, podría ser la sustitución temporal de las poblaciones nativas del suelo por parte de las poblaciones añadidas por las enmiendas en grandes cantidades (Gondim-Porto, 2012).

A partir de un ensayo previo en el que se evaluó el efecto de distintas cantidades de lodos de depuradora en el mismo tipo de suelo agrícola (Gondim-Porto, 2012), mediante el análisis presente hemos pretendido ampliar el estudio de la evaluación de los efectos sobre la salud del suelo tras la aplicación de una cantidad elevada de basura compostada y de lodos de depuradora ( $160 \text{ Mg ha}^{-1}$ ). La razón de utilizar esta cantidad se debe a que los agricultores emplean cantidades elevadas a veces durante años consecutivos. Nosotros hemos preferido realizar la aplicación en una sola vez, analizando su evolución sin ninguna otra manipulación durante 30 meses, de tal manera que la cantidad anual total aplicada fuese muy similar a la que se utiliza en agricultura de manera habitual. En este trabajo hemos pretendido describir cómo se afecta la salud del suelo mediante marcadores microbianos (fisiológicos, de actividad microbiana y de diversidad funcional y taxonómica) medidos de forma trimestral a lo largo de, al menos, 24 meses, de tal manera que nos permitiera sugerir qué tipo de enmienda es más favorable para el suelo desde el punto de vista ambiental.

## 1.4 Objetivos generales

---

- **Evaluar el impacto de diferentes enmiendas orgánicas en un suelo agrícola bajo clima mediterráneo mediante el estudio de 1) la biomasa y la respiración microbiana, 2) los perfiles metabólicos de las poblaciones microbianas y 3) los perfiles taxonómicos.**
- **Describir marcadores metabólicos y taxonómicos que definan las alteraciones microbianas que se producen en un suelo enmendado.**

## Capítulo II

---

### **2 Análisis fisiológico de la microbiota de suelos agrícolas enmendados con altas dosis de enmiendas orgánicas**



## 2.1 Resumen

---

La aplicación de residuos orgánicos en el suelo se realiza principalmente por dos razones: para eliminar la gran cantidad de residuos orgánicos generados en las urbes y para mejorar las características del suelo mediante un aumento de su cantidad de materia orgánica. No obstante, su aplicación provoca cambios en la composición química y en el estado físico del suelo, que se reflejan en la aparición de cambios en la microbiota presente en el mismo. En este sentido, algunas variables fisiológicas de las poblaciones microbianas del suelo, como la respiración basal (RB) y la biomasa, son útiles para evaluar el estado microbiano de un suelo tratado con estos residuos. Por regla general, se produce un incremento del valor de estas variables, el cual indica una potenciación de la actividad microbiana del suelo y, por tanto, de su funcionalidad. Sin embargo, también se pueden producir aspectos negativos como una liberación excesiva del carbono a la atmósfera en forma de CO<sub>2</sub> o alteraciones de la biomasa microbiana, que pueden persistir durante años. Es por ello, que consideramos que la monitorización de estos parámetros en el suelo constituye un enfoque apropiado para evaluar el impacto a largo plazo de diferentes enmiendas orgánicas sobre la microbiota de los suelos agrícolas.

En el presente análisis se ha determinado la RB y la biomasa microbiana de suelos agrícolas tratados con elevadas dosis (160 Mg ha<sup>-1</sup>) de diferentes residuos orgánicos: basura compostada (suelo B) y lodos de depuradora aerobio (suelo A) y anaerobio (suelo N). Los muestreos se realizaron trimestralmente a lo largo de dos años en el caso de los suelos A y N, y dos años y medio en el del suelo B. Para medir estos parámetros microbiológicos se ha utilizado una adaptación del sistema comercial MicroResp<sup>TM</sup>, que permite la evaluación de gran cantidad de muestras en un formato de multipocillo.

La RB del suelo se incrementó durante el primer año, especialmente en los primeros muestreos de todos los suelos enmendados. Durante el segundo año de ensayo, la RB del suelo se mantuvo elevada en los suelos enmendados con lodos de depuradora pero disminuyó en el suelo B, alcanzando valores próximos a los del suelo control. La distinta composición química de las enmiendas podría ser la responsable de estas diferencias, puesto que los valores de RB dependieron fundamentalmente de la fracción más lábil del carbono añadido. Por otra parte, la biomasa microbiana se incrementó y fue superior a la del suelo control en la mayor parte de los suelos tratados con enmiendas a lo largo de todo el análisis, en este caso debido a un aumento generalizado de la cantidad de materia orgánica. A pesar de que las enmiendas ejercieron un papel importante en el desarrollo de estos cambios, sobre todo en los primeros muestreos, la influencia de los factores climáticos como la humedad y la temperatura también fue relevante.

Del análisis de los valores del cociente metabólico (qCO<sub>2</sub>, relación de la actividad respiratoria por unidad de biomasa) podemos concluir que las poblaciones microbianas de los suelos A y N permanecieron alteradas incluso 2 años después de la aplicación de las enmiendas, indicando que no se encontraban completamente adaptadas. Sin embargo, las poblaciones del suelo B adquirieron una estabilidad similar a la del suelo control caracterizada por valores bajos de qCO<sub>2</sub>, lo que indica que las enmiendas compostadas afectan durante menos tiempo la actividad metabólica de las poblaciones microbianas del suelo, disminuyendo la producción de gases de efecto invernadero, pero sin dejar de incrementar la cantidad de materia orgánica.

## 2.2 Introducción

---

La utilización de residuos orgánicos procedentes de áreas urbanas para mejorar las condiciones del suelo constituye una práctica muy extendida en agricultura que ayuda a resolver el problema del incremento constante de la cantidad de residuos producidos en las ciudades. Esta adición provoca la modificación de muchas características del suelo (Diacono y Montemurro, 2010) como, por ejemplo, la estabilidad de los agregados, el pH y otros factores físico-químicos, así como la composición en materia orgánica y otros nutrientes que, finalmente, influyen sobre la biomasa microbiana y su actividad (Enwall *et al.*, 2007; Franco-Otero *et al.*, 2012; Nicolás *et al.*, 2014), especialmente si estas enmiendas son aplicadas a dosis elevadas. En términos ambientales y agrícolas, el incremento de la actividad de los microorganismos tras la adición de las enmiendas promueve la liberación de compuestos que mejoran el desarrollo de la vegetación y la formación de agregados en el suelo (de Araujo *et al.*, 2010; Thangarajan *et al.*, 2013; Nicolás *et al.*, 2014).

Gran parte de las investigaciones indican que la adición de enmiendas orgánicas con un alto contenido en nutrientes lábiles promueve el incremento de la actividad microbiana. Ésta puede ser determinada por medio de la medición de la respiración basal (RB), la cual se incrementa inmediatamente como respuesta a la adición de compuestos de fácil degradación, proceso conocido como efecto activador o *priming effect* (Kuzakov *et al.*, 2000; Blagodatskaya y Kuzakov, 2008). De esta manera, el grado de complejidad química de las sustancias (lábiles o recalcitrantes) de las enmiendas orgánicas influye directamente sobre la actividad de los microorganismos del suelo (Tarrasón *et al.*, 2010). En este sentido, la presencia de compuestos de carbono lábiles provoca una mineralización más rápida (Marschner *et al.*, 2003; Saviozzi *et al.*, 2014), mientras que la degradación de compuestos de carácter químico más complejo provoca una mineralización más lenta al metabolizarse en plazos de tiempo más largos (Zhao *et al.*, 2008).

Además del incremento de la RB, la aplicación de enmiendas orgánicas provoca el incremento de la biomasa microbiana (Watson *et al.*, 2002; de Araujo *et al.*, 2010; Diacono y Montemurro, 2010; Sciubba *et al.*, 2014). Este incremento se encuentra relacionado con la disponibilidad de nutrientes en el suelo, debido a que las poblaciones microbianas son capaces de utilizarlos para su crecimiento (Pavan *et al.*, 2005). Por otro lado, diversos autores sugieren que parte del incremento de la biomasa microbiana también se debe a la adición de los propios microorganismos presentes en las propias enmiendas (García-Gil *et al.*, 2000; Ros *et al.*, 2006a).

La determinación de la RB se fundamenta en la medición del CO<sub>2</sub> emitido por parte de los microorganismos del suelo. De forma similar, la biomasa se puede determinar estimulando la respiración del suelo mediante la adición de una solución de glucosa o de extracto de levadura (*substrate induced respiration*, SIR). Ambos se tratan de métodos fisiológicos habituales en este campo (Anderson y Domsch, 1978; West y Sparling, 1986; Fierer *et al.*, 2003; Berard *et al.*, 2011) que presentan ventajas como su sencillez, rapidez y bajo coste (Kandeler, 2015). Además, la medición de la respiración basal (RB) y de la biomasa microbiana del suelo tras la aplicación de enmiendas orgánicas se utiliza habitualmente para evaluar el estado de la microbiota del suelo (Ros *et al.*, 2006b; Bastida *et al.*, 2008b; Sciubba *et al.*, 2014). La mayor parte

de los estudios realizados coinciden en que se produce un incremento del valor de dichas variables, que puede observarse durante periodos largos de tiempo (Bastida *et al.*, 2008a; Gondim-Porto, 2012), y que ha sido siempre considerado como un signo positivo de la salud del suelo (Diacono y Montemurro, 2010).

Sin embargo, no siempre un incremento de la respiración y/o biomasa supone un efecto beneficioso, ni un síntoma de un estado saludable del suelo. Independientemente de que la aplicación de enmiendas orgánicas mejore las características físicas y químicas del suelo (Lal, 2004a), la microbiota del suelo puede verse afectada por la presencia de sustancias tóxicas en los residuos orgánicos (Singh y Agrawal, 2008; Martínez-Blanco *et al.*, 2013). Por ejemplo, los metales pesados u otros compuestos nocivos de las enmiendas podrían alterar los valores normales de respiración y de biomasa microbiana del suelo (Pavan *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2007; de Araujo *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). En este sentido, la observación de algunos índices fisiológicos, como el cociente metabólico ( $qCO_2$ ), que relacionan ambas variables, puede ser una manera útil de abordar el impacto causado sobre las poblaciones microbianas (Anderson y Domsch, 2010). De hecho, su uso se encuentra muy extendido en este tipo de estudios (Jorge-Mardomingo *et al.*, 2013; Bran Nogueira Cardoso *et al.*, 2013; Mattana *et al.*, 2014). Así, un incremento de la actividad respiratoria por unidad de biomasa ( $qCO_2$ ) suele ser interpretado en algunos casos como un síntoma de estrés de las poblaciones microbianas del suelo (Kayikcioglu, 2013).

Por lo tanto, la aplicación de enmiendas orgánicas en suelos agrícolas influye de forma positiva sobre las características del suelo, aunque a la luz de diversos trabajos la microbiota del suelo puede verse afectada de diferente manera en función del tipo y cantidad de enmienda aplicada. Por esta razón, consideramos que el estudio de las alteraciones fisiológicas, provocadas por la adición de altas dosis de distintas enmiendas orgánicas en la microbiota del suelo a través de la medición de la RB y de la biomasa microbiana, puede ayudar a esclarecer el impacto sanitario y ambiental de esta práctica agrícola.

## 2.3 Objetivo específico

---

- **Evaluar el impacto fisiológico que se produce sobre las poblaciones microbianas del suelo derivado de la aplicación de diferentes enmiendas orgánicas (compostadas y sin compostar) mediante la determinación de la respiración basal (RB) y la biomasa microbiana y su evolución a lo largo del tiempo.**

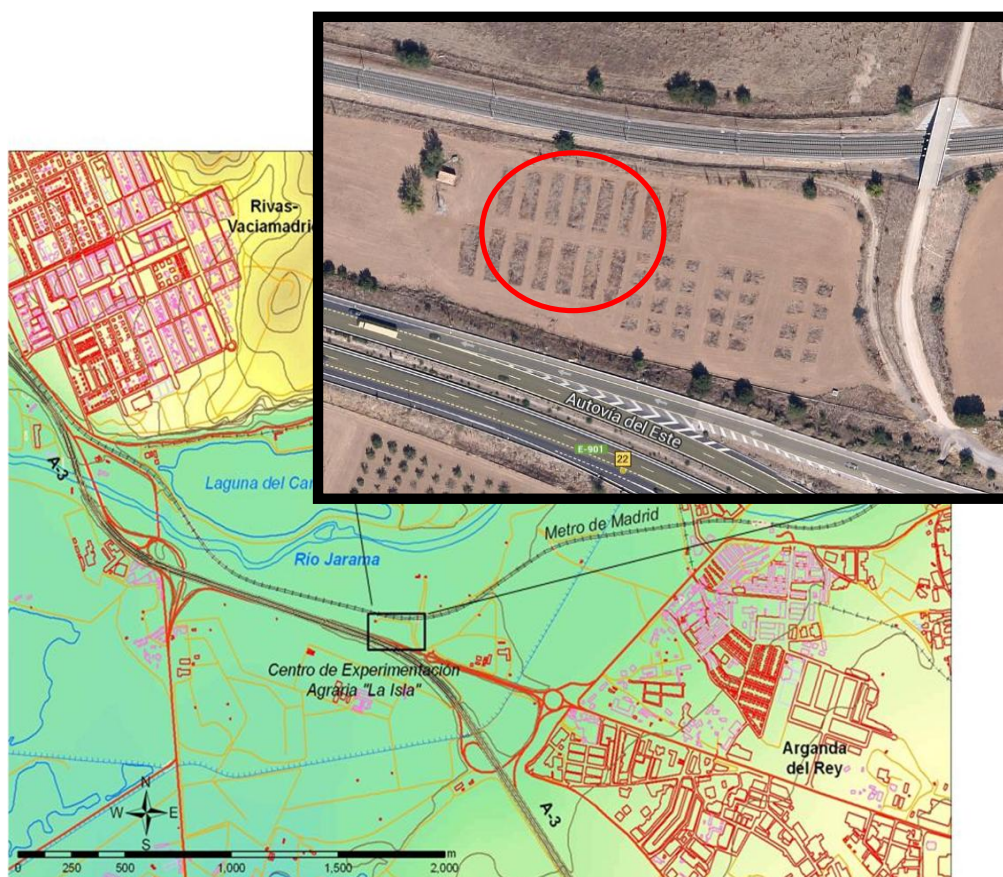
## 2.4 Materiales y métodos

### 2.4.1 Características del suelo agrícola y de las enmiendas orgánicas

A continuación se describen el suelo agrícola utilizado durante todo el trabajo y las enmiendas orgánicas que se aplicaron sobre el mismo. Estas enmiendas orgánicas fueron proporcionadas por una planta de gestión de residuos sólidos urbanos (basura compostada, BC) y por dos estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR) (lodo aerobio, LAE; y lodo anaerobio, LANAE) durante los años 2009 y 2010.

#### 2.4.1.1 Área de estudio: localización y contexto edafológico

El presente trabajo se llevó a cabo en unas parcelas agrícolas localizadas en el centro de experimentación agraria “La isla”, propiedad del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) de la Comunidad de Madrid en el municipio de Arganda del Rey (**Figura 5**).



**Figura 5. Localización de las parcelas de estudio.**

Localización y disposición de las parcelas en la finca experimental “La isla” del IMIDRA situado a 40° 18′ 43″ de latitud, 3° 26′ de longitud y 618 m de altitud. En la ampliación se muestra una fotografía de satélite de las parcelas agrícolas de experimentación.

El suelo de la finca experimental estaba compuesto de sedimentos cuaternarios de la cuenca del río Jarama. Estos sedimentos de origen aluvial dieron lugar a un *Fluvisol* calcáreo que en la actualidad presenta características propias de *Antrosol* (IUSS Working Group WRB, 2007), por tener una marcada influencia humana debido a su uso agrícola, a pesar de que llevaba más de 10 años sin utilizarse con estos fines.

Morfológicamente se pudieron diferenciar tres horizontes, en primer lugar un horizonte antropopedogénico **superficial** (Ap) (0-40 cm) con propiedades análogas a un horizonte *Anthragric*, con un contenido en carbono orgánico próximo al 1 %, un pH moderadamente básico (pH=8), baja pedregosidad superficial y alta permeabilidad. En este primer horizonte es en el cual se tomaron las muestras (**Tabla 1**). Inmediatamente debajo de este horizonte, el suelo contenía un horizonte subsuperficial (AC) (40-105 cm) con una marcada compactación por el uso de maquinaria agrícola de manera intensiva, aunque también se apreció en la morfología cambios texturales de acumulación de arcillas. Por último, se distinguieron diversos horizontes de tipo C, entre los 105-200 cm, que se diferenciaron por cambios texturales de los materiales provenientes del transporte fluvial.

Profundidad (cm)	Arena fina (%)	Limo (%)	Arena (%)	Arcilla (%)	Clase textural
0-20	7,8	41,3	23,6	27,3	Franco-arcilloso
20-40	1,5	29,1	41,1	28,1	Franco-arcilloso

**Tabla 1. Textura del horizonte superficial del que se obtuvieron las muestras.**

Datos cedidos por el grupo del profesor Casermeiro del Departamento de Edafología de la Facultad de Farmacia (UCM).

#### **2.4.1.2 Enmiendas orgánicas: Basuras compostadas y lodos de depuradora**

Las enmiendas orgánicas constituyen un producto derivado del procesamiento de los principales residuos generados en las áreas urbanas. Tras diversos tratamientos, las basuras recogidas (residuos urbanos) son procesadas en instalaciones de gestión de residuos. Por otra parte, de la depuración de aguas urbanas en EDAR se obtienen los lodos. Las enmiendas utilizadas en este trabajo fueron:

- **Basura compostada (BC):** residuos urbanos cuya fracción orgánica sufrió un proceso de compostaje. La enmienda procede del centro de compostaje del Parque Tecnológico de Valdemingómez, que procesa los residuos urbanos procedentes del municipio de Madrid.
- **Lodos generados por digestión aerobia (LAE):** Tras el proceso de digestión se realiza un proceso de secado al aire. Este lodo proviene de la EDAR de Toledo (Castilla-La Mancha).
- **Lodos generados por digestión anaerobia (LANAE):** Este lodo proviene de la EDAR de San Fernando de Henares (Madrid).

La composición química de los residuos se muestra en la **Tabla 2**.

	BC	LAE	LANAE		BC	LAE	LANAE
Peso seco (%)	33,9	23,2	22,1	P (g kg <sup>-1</sup> )	3,7	7,4	15,3
pH	6,5	8,2	7,7	K (g kg <sup>-1</sup> )	4,7	5,4	4,4
CE (dS m <sup>-1</sup> )	15,8	1,5	1,4	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	41	35	50
TOC (g kg <sup>-1</sup> )	195,3	344,9	249,9	Mg (g kg <sup>-1</sup> )	5,1	3	4,8
Lp <sub>1</sub> (%C)	4,5	6,9	3,8	Fe (g kg <sup>-1</sup> )	5,1	4	6,1
Lp <sub>2</sub> (% C)	4,3	9,5	3,6	Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	0,89	0,78	2
R (%C)	7,04	8,5	6,3	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	108	17	71
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (%)	5,9	1,3	4,1	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	231	91	232
N <sub>T</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	19,1	42,01	46,01	Hg (mg kg <sup>-1</sup> )	1,4	0,1	5
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	0,16	2,2	2,1	Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	7	21	35
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	0,05	nd	nd	Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	132	28	265
C/N	10,2	8,2	5,4	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	433	237	1296

**Tabla 2. Composición química de las enmiendas orgánicas.**

Basura compostada (BC); lodo obtenido por digestión aerobia (LAE) y anaerobia (LANAE); Parámetros físicos y químicos: conductividad eléctrica (CE), carbono orgánico total (TOC), fracción de carbono lábil 1 (Lp1), fracción de carbono lábil 2 (Lp2), fracción de carbono recalcitrante (R), nitrógeno total (N<sub>T</sub>), dato no disponible (nd). Estos datos fueron proporcionados por los suministradores respectivos de la enmiendas. Todos los datos de la tabla están referidos a peso seco de la enmienda.

Los tres residuos mostraron un contenido en metales pesados por debajo de la concentración umbral establecida por la legislación para su utilización en agricultura (European Commission, 1986; BOE, 1990; European Commission, 2004).

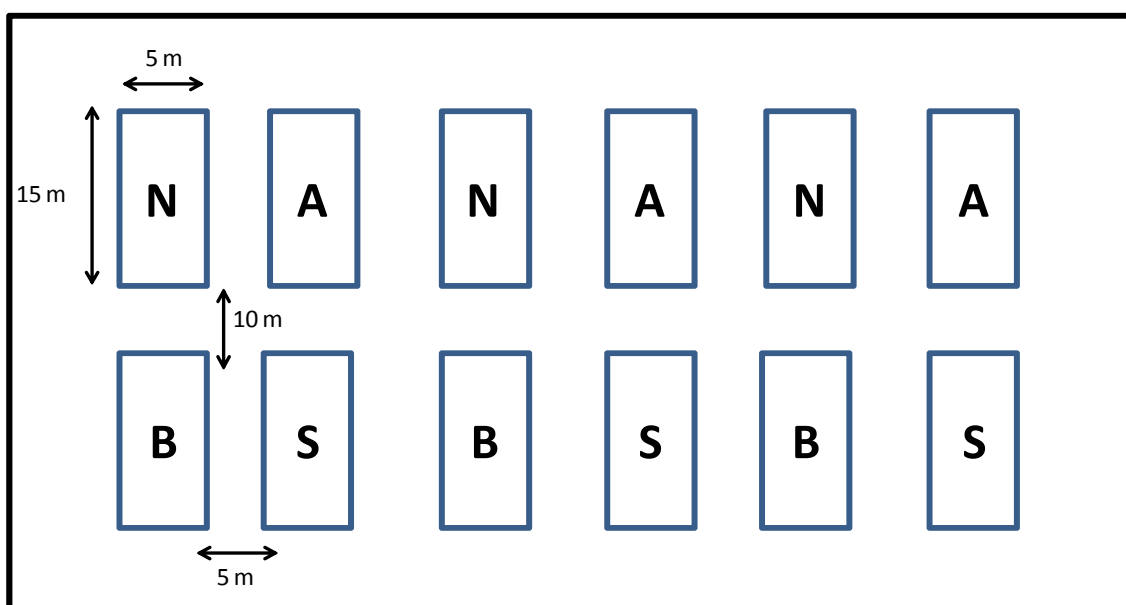
## 2.4.2 Diseño experimental

Las enmiendas fueron recibidas y aplicadas en dos momentos distintos del año (como se detalla más adelante) realizándose el primer muestreo una semana después de ser adicionadas. Se decidió aplicar una concentración elevada (160 Mg ha<sup>-1</sup>) al igual que en otras investigaciones realizadas por nuestro grupo de investigación (Gondim-Porto y Navarro-García, 2010; Gondim-Porto, 2012; González-Ubierna *et al.*, 2012; Jorge-Mardomingo, 2014).

### 2.4.2.1 Distribución de las parcelas, nomenclatura, calendario y datos climáticos de los muestreos

Las enmiendas orgánicas se depositaron en parcelas de 15 x 5 m a una concentración de 160 Mg ha<sup>-1</sup>, en dos momentos concretos: noviembre de 2009 para el caso de la basura compostada (BC) y mayo de 2010 para los lodos de depuradora (LAE y LANAE). Además de las parcelas con enmiendas (suelos B, A y N,

respectivamente para cada enmienda) se incluyó una parcela control (suelo S) en la que se realizaron los mismos análisis que en las parcelas de suelos enmendados (**Figura 6**). Este esquema básico de 4 tipos de parcelas se realizó por triplicado. Las parcelas se distanciaron de las adyacentes (5 o 10 m) para evitar posibles influencias o contaminaciones cruzadas. Las enmiendas se mezclaron con el horizonte superficial mediante el uso de un motocultor dejando transcurrir una semana hasta que se realizó el primero de los muestreos, el cual se llevó a cabo el 1 de diciembre de 2009 para las parcelas de S0 y B0 (**Tabla 3**) o el 10 de mayo de 2010 para las parcelas de A0 y N0. Desde el momento de la aplicación de las enmiendas no se realizó ninguna actividad agrícola, ni de mantenimiento ni de regadío. En las estaciones de primavera y verano se observó el crecimiento de vegetación silvestre sin destacarse grandes diferencias entre unas parcelas y otras.



**Figura 6. Esquema de la distribución, dimensiones de las parcelas y nomenclatura de las mismas.**

Suelo control (S), suelo enmendado con basura compostada (suelos B), suelo enmendado con lodo aerobio (suelos A) y suelo enmendado con lodo anaerobio (suelos N). En total 12 parcelas independientes.

#### **2.4.2.2 Recogida y pre-tratamiento de las muestras**

La recogida de muestras se realizó entre los meses de diciembre de 2009 y junio de 2012 tomándose las muestras cada 3 meses (**Tabla 3**), conforme a la metodología descrita por Paetz (Paetz y Wilke, 2005). Se utilizó una barrena ergonómica de la casa comercial *Eijkelkamp*, diseñada para la toma de muestras cilíndricas de suelo. En cada parcela se muestrearon tres puntos distintos de suelo (submuestras). Las tres submuestras cilíndricas se mezclaron en una bolsa estéril, distinta para cada parcela (réplica), y a continuación se almacenó en dos fracciones: una mayoritaria para los análisis metabólicos, en recipientes de análisis clínicos

estériles de 2 L, y una menor, para los análisis moleculares, en tubos estériles de tipo *Falcon* de 50 mL (Labolan, REF. 100489). En total, en cada muestreo, se recogieron **12 recipientes de 2 L y 12 tubos Falcon**, correspondientes a las 12 parcelas.

En el laboratorio las muestras se almacenaron a distintas temperaturas. La parte de las muestras destinadas al análisis molecular (en tubos *Falcon*) se conservó a -80 °C hasta el momento de su análisis (descrito en el capítulo IV), mientras que la parte de destinada a los análisis metabólicos (envases de 2 L) se conservó a 4 °C.

S	B	A	N	Fecha	Estación	Amplitud térmica (°C)	Temperatura media (°C)	Humedad atmosférica media (%)	Precipitación (mm)
S0	B0	-	-	01/12/2009	Otoño	9,17	6,44	77,70	0,00*
S1	B1	-	-	22/03/2010	Invierno	15,56	13,05	69,03	0,00*
S2	B2	A0	N0	10/05/2010	Primavera	9,09	12,88	77,40	1,60*
S3	B3	A1	N1	12/07/2010	Verano	15,81	29,11	32,09	0,00
S4	B4	A2	N2	18/10/2010	Otoño	17,63	8,70	56,61	0,00*
S5	B5	A3	N3	24/01/2011	Invierno	13,24	0,91	50,99	0,00
S6	B6	A4	N4	12/04/2011	Primavera	14,82	16,42	51,73	0,00
S7	B7	A5	N5	11/07/2011	Verano	24,64	25,63	34,26	0,00
S8	B8	A6	N6	10/10/2011	Otoño	22,02	17,83	43,92	0,00
S9	B9	A7	N7	19/12/2011	Invierno	14,45	1,64	78,80	0,00*
S10	B10	A8	N8	09/04/2012	Primavera	20,59	13,81	58,94	0,00*

**Tabla 3. Nomenclatura, fechas y datos ambientales de los días de muestreo.**

Suelo control (S0-S10), suelo tratado con LAE (A0-A8) y suelo tratado con LANAE (N0-N8). Los muestreos marcados (\*) registraron precipitaciones durante la semana previa a la toma de muestras. Los datos se obtuvieron de la propia estación meteorológica de la finca experimental (código 3195, dependiente de la AEMET). Para consultar los datos climatológicos completos véase **ANEXO 1**.

Al final del estudio, se obtuvieron un total de 43 muestras correspondientes a 3 muestras de enmienda, y 40 muestras de suelo. Las muestras de suelo se corresponden con un total de 11 de las parcelas de suelo control (S0-S10), 11 de las parcelas de suelos tratado con BC (B0-B10), 9 de las parcelas de lodos aerobios (A0-A8) y 9 de las parcelas con lodos anaerobios (N0-N8). Al existir 3 réplicas de cada tipo de suelo, se obtuvieron un total de 123 submuestras.

### 2.4.3 Metodología para la medición de la respiración basal y de la biomasa microbiana

Para la determinación de la respiración basal (RB) y de la biomasa microbiana se realizó una adaptación del sistema MicroResp™, diseñado originalmente para la medición de CLPPs (Campbell *et al.*, 2003). Para el caso de la RB se midió el CO<sub>2</sub> emitido por las muestras de suelo tras la adición de agua. Para la determinación de la

biomasa microbiana se midió el CO<sub>2</sub> emitido por el suelo tras la adición de extracto de levadura, basándonos en la respiración inducida a partir de un sustrato (**SIR**) (Anderson y Domsch, 1978; Fierer *et al.*, 2003).

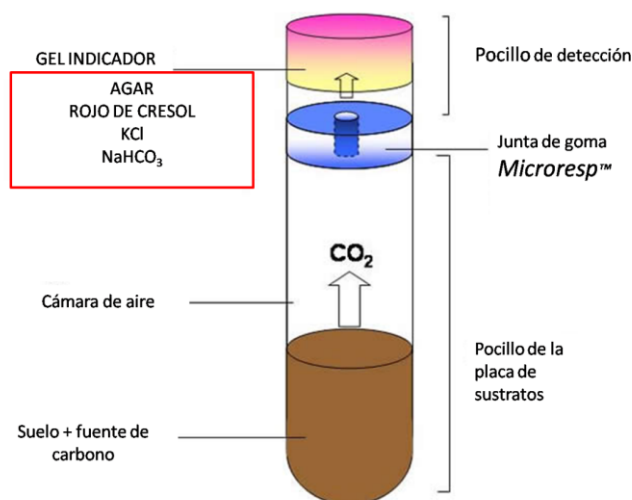
#### **2.4.3.1 Tratamiento de las muestras para análisis metabólicos**

Las muestras de suelo fueron conservadas a 4 °C hasta el momento de su análisis. Antes del ensayo se tamizaron (2 mm) y se procedió a la eliminación de piedras y restos vegetales. A continuación, se determinó la humedad de la muestra de suelo y se procedió a su ajuste con agua (en los casos necesarios) hasta alcanzar un valor entre el 30-60 % de la capacidad de campo del suelo (WHC), tal y como recomienda el manual de MicroResp™ (Campbell *et al.*, 2006). La razón básica de este ajuste reside en que las muestras no deben estar muy húmedas ya que se restringiría el intercambio gaseoso, pero tampoco han de estar muy secas ya que se vería afectada la actividad microbiana.

Posteriormente, se estabilizó la muestra de suelo dentro de un recipiente sellado herméticamente a 24 °C durante un periodo de 48 horas. Las condiciones internas del recipiente se mantuvieron a una humedad constante, mediante la adición de agua en el recipiente para conseguir un ambiente húmedo, y con una atmósfera pobre en CO<sub>2</sub> generada con la presencia de cal sodada (*Soda lime, Sigma-Aldrich*) que retiene la mayor parte del CO<sub>2</sub> del ambiente.

#### **2.4.3.2 Fundamento del sistema Microresp™**

Una vez estabilizadas las muestras como se indica previamente, se utilizó el sistema Microresp™ para la medición de la RB y de la biomasa microbiana. Este dispositivo captura el CO<sub>2</sub> emitido por la muestra de suelo con una placa de detección multipocillo (96 pocillos). En el caso de la RB se añadió agua ultrapura para estimular la respiración y determinar el CO<sub>2</sub> emitido sin la adición de otros sustratos distintos a los del suelo. Para determinar la biomasa microbiana se midió el CO<sub>2</sub> emitido a partir de la inducción de la respiración a través de un sustrato complejo como es una solución de extracto de levadura (**Substrate induced respiration, SIR**) (Fierer *et al.*, 2003). Tras 4 horas de ensayo, el CO<sub>2</sub> emitido, correspondiente al consumo de los sustratos presentes en el suelo (RB) o la solución de extracto de levadura (biomasa) añadida, se retuvo en la **placa de detección** que porta un gel indicador. El CO<sub>2</sub> es producido por la respiración de una parte de los organismos del suelo, especialmente los que crecen más rápido, como es el caso de las bacterias. Cuando el CO<sub>2</sub> emitido difunde a través del gel indicador lo acidifica, haciendo virar el color del indicador de pH de rojo a amarillo (**Figura 7**). Posteriormente se determina el cambio de color del indicador por medio de técnicas espectrofotométricas.

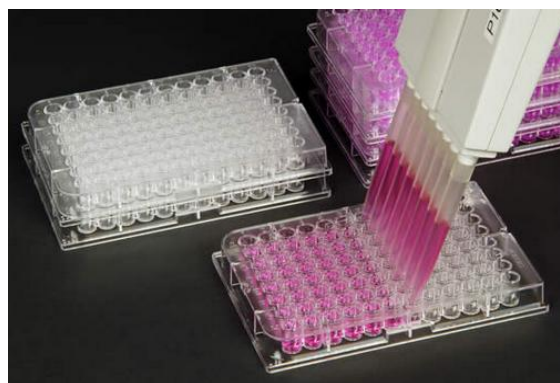


**Figura 7. Esquema de la determinación de CO<sub>2</sub> del sistema Microresp<sup>™</sup>.** Detalle de uno de los pocillos de la placa de incubación. Modificado del manual (Campbell *et al.*, 2006).

### 2.4.3.3 Preparación de las placas de detección de CO<sub>2</sub>

En cada placa de detección se distribuyó una mezcla alcalina en forma de gel compuesta por agar y un indicador de pH (rojo de cresol) (Figura 8). El gel indicador, previamente fundido, se dispensó manualmente con una pipeta multicanal en placas multipocillo (96 pocillos) de fondo plano (Nunc<sup>™</sup> F96 Cert. Maxisorp. Nunc-*inmuno plate*). Tras la solidificación del gel indicador, las placas de detección se almacenaron en una caja hermética en presencia de cal sodada para atrapar el CO<sub>2</sub>, y de agua para mantener la humedad. Antes de su utilización se realizó un control de calidad de las mismas a simple vista y midiendo su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placas de 96 pocillos (Model 680 *microplate reader*, Biorad).

Placa de detección	Concentración final en el pocillo
Rojo de cresol	20 µg mL <sup>-1</sup>
KCl	240 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4 mM



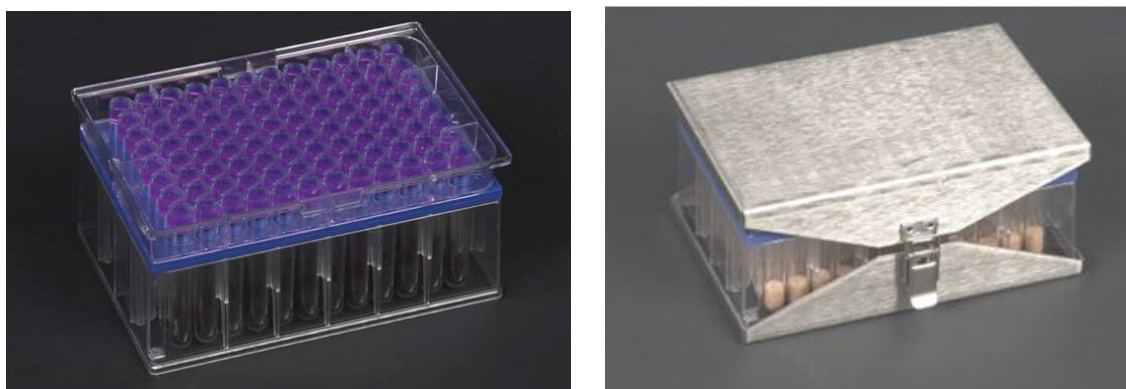
**Figura 8. Composición del gel indicador y preparación de las placas de detección.** Se utilizó la modificación del protocolo propuesta por (Lalor *et al.*, 2007).

#### 2.4.3.4 Preparación de las placas de ensayo

Para la determinación de la biomasa microbiana se preparó una solución acuosa de extracto de levadura al 16 % que se esterilizó por calor húmedo en autoclave. Por otra parte, para el ensayo de RB se utilizó agua estéril ultrapura (*Millipore*). Cada líquido se dispensó en cada mitad de una placa (esterilizada) de 96 pocillos con un volumen de 2 mL (*Nunc™ U96 PP 2 mL; Deepwell Natural*) a razón de 56,25  $\mu$ L en cada pocillo hasta completar la placa. El volumen de solución dispensado fue determinado en experimentos previos realizados en la puesta a punto de la técnica (Nadal, 2010).

#### 2.4.4 Medición de la respiración basal y de la biomasa microbiana del suelo

Cada muestra de suelo fue incubada a 24 °C en una placa en la que se midió simultáneamente la respiración basal (RB) y la biomasa microbiana del suelo. La cantidad de CO<sub>2</sub> emitida se determinó a partir de la diferencia de la densidad óptica a 595 nm, por lo que se realizaron dos mediciones, a las 0 horas y 4 horas. Previamente, el sistema *Microresp™* fue cargado con las muestras de suelo, como se indica en el manual de instrucciones del sistema (Campbell *et al.*, 2006), con la ayuda de un dispensador (incluido en el kit). En este caso, el suelo se distribuyó en 80 pocillos, 40 para calcular la RB con agua y 40 para la biomasa con extracto de levadura. Los 16 pocillos restantes correspondieron a los controles (agua y solución de extracto de levadura, respectivamente). La masa de suelo por pocillo se estimó por diferencia entre la placa vacía y la placa cargada dividiéndose, posteriormente, entre 80. Una vez medida la absorbancia inicial (0 h) de la placa de detección se colocó de forma invertida sobre la placa de ensayo, procediéndose al cierre del sistema *MicroResp™* mediante una junta de goma y unos pestillos de seguridad para garantizar que no hubiese contaminación cruzada con los pocillos adyacentes e impedir la pérdida del CO<sub>2</sub> (**Figura 9**). El sistema completo se incubó en una estufa durante 4 horas a una temperatura constante de 24 °C. El tiempo de incubación se determinó en ensayos previos realizados en la puesta a punto del método (Nadal, 2010).



**Figura 9. Dispositivo Microresp™.**

Partes del sistema (tomado de <http://www.microresp.com/>).

## 2.4.5 Tratamiento de los datos del sistema MicroResp™

Los datos de las absorbancias de la placa de detección, obtenidas al inicio (0 horas) y al final del tiempo de incubación (4 horas), fueron procesados como se indica en el manual de Microresp™ (**Expresión 1**) (Campbell *et al.*, 2006).

### 1. Estandarización de las medidas de densidad óptica.

$$A_{t(4h) \text{ estand.}} = (A_{t(4h)} / A_{t(0h)}) \times (\text{promedio } A_{t(0h)})$$

$$A_{t(0h) \text{ estand.}} = (A_{t(0h)} / A_{t(0h)}) \times (\text{promedio } A_{t(0h)})$$

$A_{t(0h) \text{ estand.}}$ : Lectura de la absorbancia del pocillo a  $t=0$  h.

$A_{t(4h) \text{ estand.}}$ : Lectura de la absorbancia del pocillo al finalizar la incubación  $t=4$  h.

### 2. Transformación de la absorbancia en %CO<sub>2</sub> emitido.

$$\%CO_{2(i)} = 0,0992 + (25,49 \times (4,24 \times 10^{-6})^{A_i})$$

Donde  $A_i$  puede ser:  $A_{t(0h) \text{ estand.}}$  o  $A_{t(4h) \text{ estand.}}$

### 3. Transformación de % CO<sub>2</sub> en tasa de producción de CO<sub>2</sub>.

$$\left( \frac{(\% CO_2 (4 \text{ h}) - \% CO_2 (0 \text{ h}))}{100} \times 950 \times \left(\frac{44}{22,4}\right) \times \left(\frac{12}{44}\right) \right) / 4 \text{ h}$$

( peso suelo por pocillo x (% peso seco/100) )

---

**Expresión 1.** Estandarización (1), transformación de las medidas de absorbancia (2), transformación del % CO<sub>2</sub> en tasa de producción de CO<sub>2</sub> (μg CO<sub>2</sub>-C/g/h) (3).

---

## 2.4.6 Conversión de los valores SIR-extracto de levadura en carbono microbiano ( $C_{mic}$ )

La respuesta respiratoria (SIR) con la que se estimó la biomasa con MicroResp™ es proporcional a la cantidad de C microbiano ( $C_{mic}$ ) presente en la muestra de suelo (Kandeler, 2015). De esta forma, los resultados de SIR-extracto de levadura pueden ser convertidos en biomasa de C microbiano aplicando el siguiente factor de conversión (**Expresión 2**), derivado de la calibración de SIR y la técnica de determinación de biomasa por fumigación con cloroformo descrita por Anderson (Anderson y Domsch, 1978).

$$C_{mic} = 40,04 \text{ SIR} + 0,37$$

$C_{mic}$ : biomasa C (mg 100 g<sup>-1</sup> suelo)

SIR: tasa de respiración (mL CO<sub>2</sub> 100 g<sup>-1</sup> suelo h<sup>-1</sup>)

---

**Expresión 2. Transformación de SIR en carbono microbiano  $C_{mic}$ .**

---

## 2.4.7 Tratamientos estadísticos

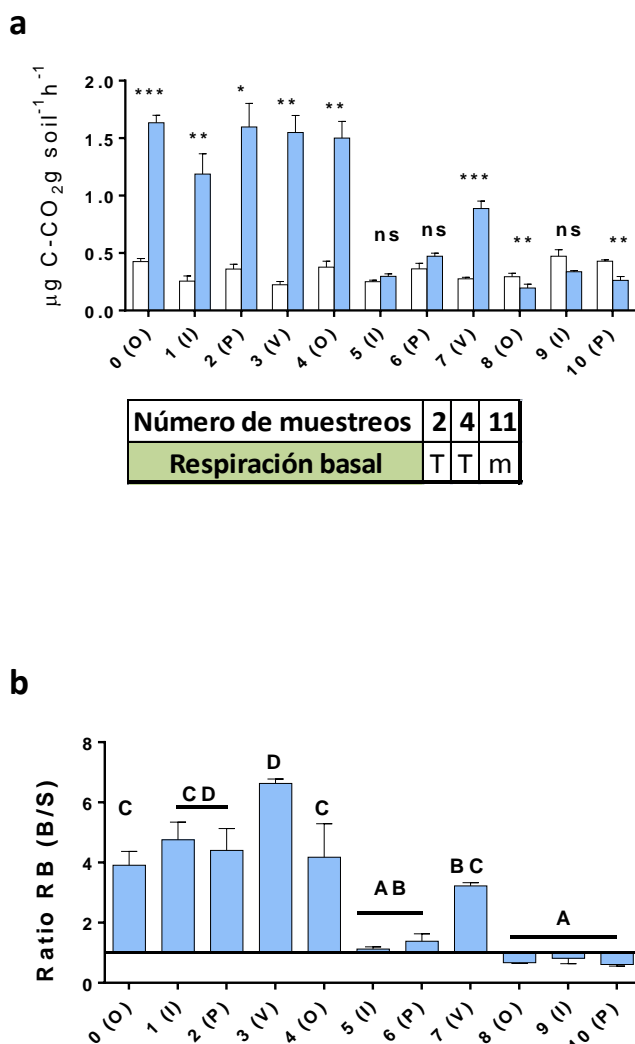
Los datos fueron procesados de forma rutinaria mediante Excel 2007 (*Microsoft*). La normalidad de los datos fue contrastada con el test de *Kolmogorov-Smirnov*. Para comprobar la homocedasticidad de las muestras se aplicó la prueba de homogeneidad de varianzas de *Levene* (SPSS v19, IBM). La comparación de medias se realizó con la prueba *T* de *Student* para dos muestras, ANOVA de un factor para más de dos muestras y ANOVA de dos factores para evaluar la influencia de los factores que intervinieron sobre las diferencias (*Prism 6, GraphPad software*). Por regla general, en los casos en los que la interacción de los factores del ANOVA de dos factores fue significativa, se consideró como predominante aquel factor que explicó al menos el doble del porcentaje de la varianza del otro factor. El test *post hoc* de *Tukey* se utilizó para la obtención de subgrupos homogéneos con un nivel de confianza superior al 95 % ( $P < 0,05$ ) (SPSS). Para el análisis de correlaciones (**ANEXO 4**) se utilizó el coeficiente de correlación de *Pearson r* (*Prism 6*).

## 2.5 Resultados

La RB y la biomasa microbiana fueron medidas en el suelo control (suelos S) y en los tres tipos de suelos enmendados (suelos B, A y N). Se analizaron un total de 11 muestras de S; 11 de B; 9 de A y 9 de N, a lo largo de los años 2009 a 2012.

### 2.5.1 Análisis de la respiración y biomasa del suelo B

La aplicación de basura compostada (BC) en el suelo produjo un aumento de la respiración basal (RB). En la **Figura 10.a** se puede observar que los valores de RB del suelo tratado con BC (suelo B) fueron significativamente superiores a los del suelo control (suelo S), principalmente durante los muestreos del primer año (0-4).



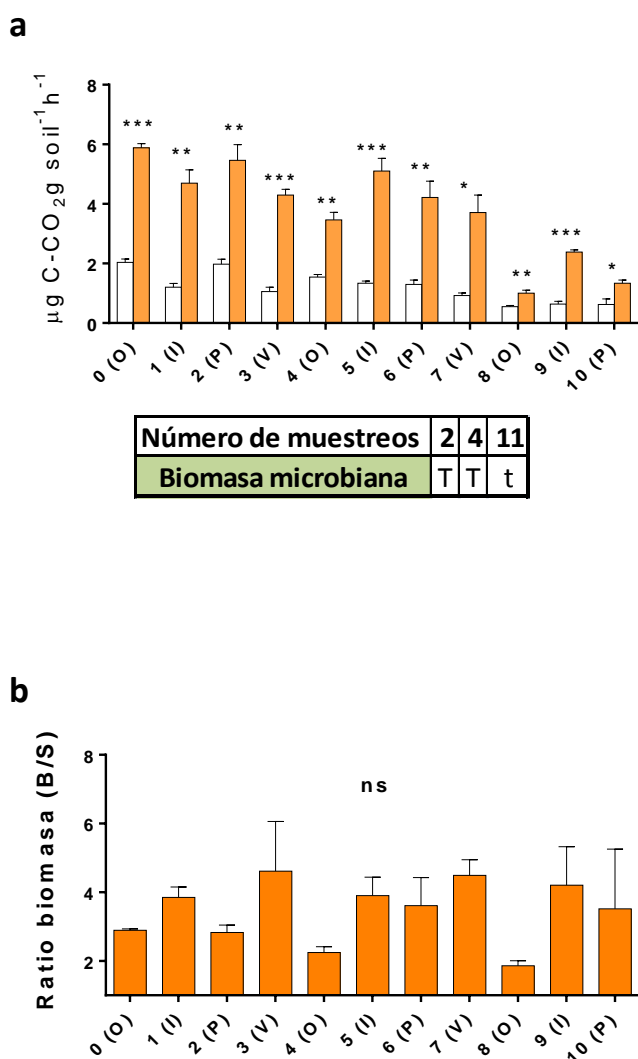
**Figura 10. Respiración basal del suelo B.**

**(a) Valores medios y tabla resumen del ANOVA de dos factores.**

**(b) Ratio de la respiración basal (suelo B/suelo S).**

(a). Las barras representan la media de la respiración basal ( $n=3$ ) con el error estándar medio (SEM). En color blanco, el suelo control, y en color azul el suelo tratado. Los símbolos \*\*\*, \*\* y \*, representan el grado de significación de las diferencias entre suelos ( $P<0,001$ ;  $P<0,01$  y  $P<0,05$ , respectivamente), "ns" indica que no hubo diferencias significativas. La tabla integrada en (a) muestra los factores predominantes del ANOVA de dos factores (realizado a lo largo de 2, 4 y 11 muestreos). "T" indica si predominó el factor *tratamiento* y "M" si fue el factor *muestreo*. Cuando se representa con letra minúscula indica que existió una interacción significativa entre ambos factores y en mayúscula que no hubo interacción. (b). Los diferentes subconjuntos en los que se agrupan los muestreos (test *post hoc* Tukey) a partir del ANOVA de un factor se indican mediante letras diferentes sobre las barras. En el eje de abscisas se muestra el número de muestreo (tomado cada tres meses) y las letras, las estaciones del año.

Igualmente, la proporción de la alteración, estimada mediante el cálculo del cociente (ratio) de RB (suelos B/suelo S), mostró resultados similares, en los que se comprueba que la RB se incrementó de 4 a 6 veces en el suelo B a lo largo del primer año (muestréos del 0 al 4) (**Figura 10.b**). Sin embargo, a partir del segundo año la RB del suelo B alcanzó valores similares a los del suelo control (muestréos 5, 6 y 9) e incluso mostró valores inferiores (8 y 10) (**Figura 10.a**). Según indican los resultados obtenidos en el ANOVA de dos factores, el incremento de la RB coincidió con la influencia predominante que ejerció la BC (factor *tratamiento*) durante los primeros muestréos, ya que no mostró interacciones significativas con el factor *muestreo* durante el primer año (0-4). En cambio, a lo largo de todo el análisis (11 muestréos), la interacción de ambos factores (*tratamiento* y *muestreo*) fue significativa pero, dentro de esa interacción, el factor *muestreo* fue el más influyente (**Figura 10.a**).



**Figura 11. Biomasa microbiana del suelo B.**

**(a) Valores medios y tabla resumen del ANOVA de dos factores.**

**(b) Ratio de la biomasa microbiana (suelo B/suelo S).**

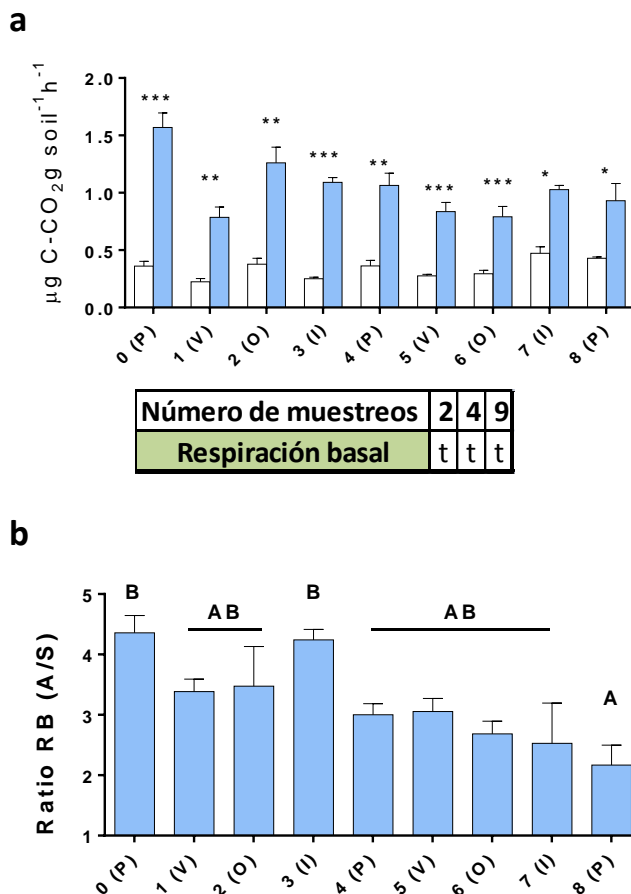
(a). Las barras representan la media de la respiración basal ( $n=3$ ) con el error estándar medio (SEM). En color blanco, el suelo control, y en color naranja el suelo tratado. Los símbolos **\*\*\***, **\*\*** y **\***, representan el grado de significación de las diferencias entre suelos ( $P<0,001$ ;  $P<0,01$  y  $P<0,05$ , respectivamente), “ns” indica que no hubo diferencias significativas. La tabla integrada en (a) muestra los factores predominantes del ANOVA de dos factores (realizado a lo largo de 2, 4 y 11 muestréos). “T” indica si predominó el factor *tratamiento* y “M” si fue el factor *muestreo*. Cuando se representa con letra minúscula indica que existió una interacción significativa entre ambos factores y en mayúscula que no hubo interacción. (b). Los diferentes subconjuntos en los que se agrupan los muestréos (test *post hoc Tukey*) a partir del ANOVA de un factor se indican con letras diferentes sobre las barras. En el eje de abscisas se muestra el número de muestreo (tomado cada tres meses) y las letras, las estaciones del año.

La biomasa microbiana se incrementó de forma significativa en el suelo B (**Figura 11.a** y **Figura 11.b**). Este incremento se observó a lo largo de los 11 muestréos del análisis detectándose un ligero descenso a lo largo del tiempo. No obstante, la

proporción del incremento fue similar en todos los muestreos (**Figura 11.b**), lo que significa que la biomasa microbiana del suelo control también sufrió un descenso similar al de la biomasa del suelo B. Los resultados del ANOVA de dos factores destacan que el factor predominante fue el *tratamiento* (**Figura 11.a**). De hecho, en la determinación realizada durante los primeros 4 muestreos la interacción no fue significativa (letra mayúscula). En cambio, a lo largo de los 11 muestreos se comprobó que la interacción con el factor *muestreo* fue más influyente que en los anteriores, pero siempre menor que la contribución del factor *tratamiento* (letra minúscula) (**Figura 11.a**).

## 2.5.2 Análisis de la respiración y biomasa del suelo A

La adición de lodo aerobio (LAE) en el suelo también provocó que la RB se incrementara de forma significativa a lo largo de todos los muestreos respecto del suelo control, como se muestra en la **Figura 12.a**. Una semana después de añadirse LAE (muestreo 0) se pudo observar el valor más elevado de RB, que fue descendiendo progresivamente hacia el final del experimento, aunque siempre con valores superiores a los del suelo control.



**Figura 12. Respiración basal del suelo A.**

(a) Valores medios y tabla resumen del ANOVA de dos factores.

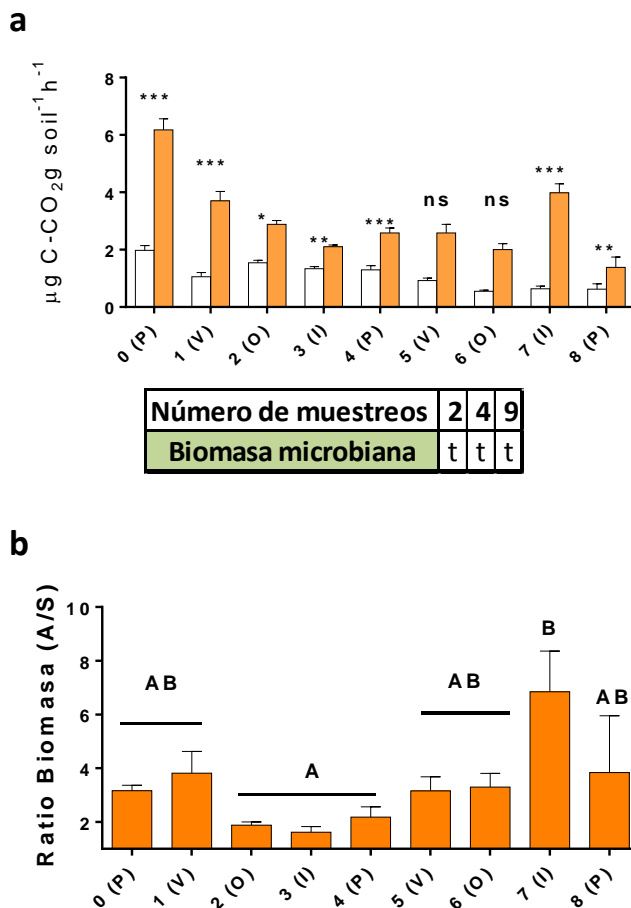
(b) Ratio de la respiración basal (suelo A / suelo S).

La interpretación de esta figura se realiza tal y como se explica en la **Figura 10**.

Cuando se compara la RB del suelo control con la del suelo A (**Figura 12.b**), los valores de RB de este último se incrementaron entre 3 y 4 veces sobre los del suelo control durante el primer año. Incluso, aunque las proporciones fueron disminuyendo desde el comienzo del segundo año hasta el final, la RB del suelo A todavía duplicaba a

la del suelo control (muestréos 4-8). Los resultados del ANOVA de dos factores, indicaron que aunque la interacción de los dos factores fue significativa (letra minúscula), el factor *tratamiento* fue el más relevante a la hora de explicar el incremento de la RB en las muestras de suelo tratadas con LAE (**Figura 12.a**). De esta forma, podemos decir que la aplicación de LAE en el suelo incrementó su RB en mayor medida en los primeros muestréos y disminuyó progresivamente a lo largo de los dos años de ensayo.

Además de la RB, la biomasa microbiana se incrementó de forma significativa cuando se aplicó LAE en el suelo, aunque en los muestréos 5 y 6 la diferencia de biomasa entre el suelo A y el suelo control no fuese significativa (**Figura 13.a**). En el primer muestréo de suelo A (muestréo 0) se observa que la biomasa alcanzó su mayor valor, disminuyendo posteriormente. Sin embargo, si observamos las ratios, el incremento relativo de la biomasa microbiana fue mucho mayor en el muestréo 7 (invierno), mientras que en el resto de los muestréos la ratio A/S fue más moderada (**Figura 13.b**).



**Figura 13. Biomasa microbiana del suelo A.**

(a) Valores medios y tabla resumen del ANOVA de dos factores.

(b) Ratio de la biomasa microbiana (suelo A/ suelo S)

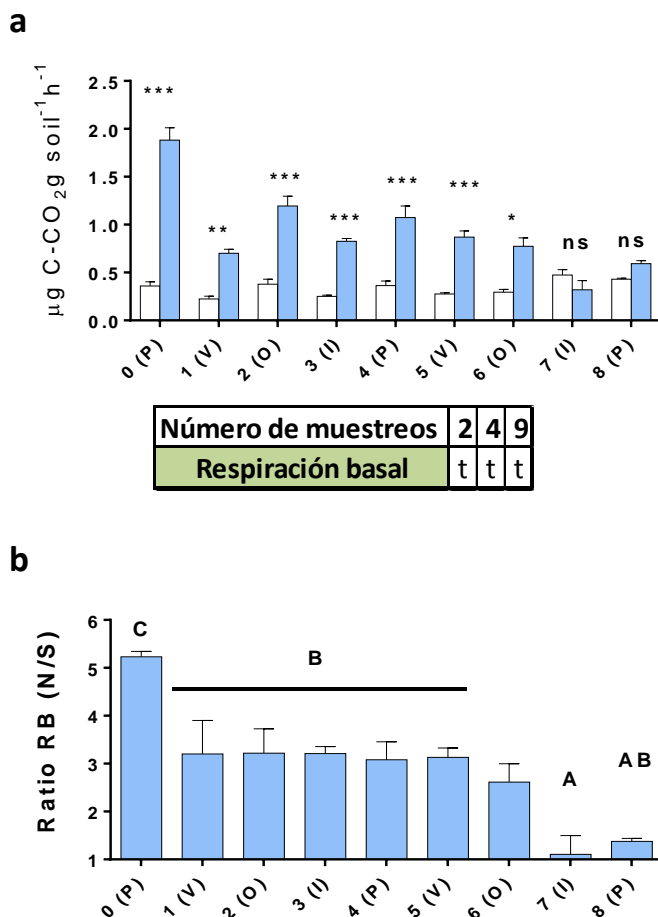
La interpretación de esta figura se realiza tal y como se explica en la **Figura 11**.

El ANOVA de dos factores reveló que el incremento de la biomasa microbiana estuvo influido por la interacción significativa del *tratamiento* y el factor *muestréo*, aunque el factor *tratamiento* manifestó una influencia mayor (**Figura 13.a**).

En este tipo de suelo tratado (A) la RB disminuyó levemente y de forma progresiva a lo largo del ensayo aunque siempre fue superior a la del suelo control. Por el contrario, la biomasa microbiana exhibió un comportamiento más inestable, aunque superó entre 2 y 4 veces a la del suelo control en la mayor parte de ellos.

### 2.5.3 Análisis de la respiración y biomasa del suelo N

La adición de lodo anaerobio (LANAE) en el suelo provocó un incremento significativo de la respiración basal (RB) que se registró en todos los muestreos, excepto en los muestreos 7 y 8 (invierno y primavera) donde no se hallaron diferencias significativas (**Figura 14.a**). Como también sucedió en el suelo A, el mayor valor de RB respecto del suelo control se produjo en el primer muestreo (0), seguido de un descenso en el siguiente (1). El resto de los muestreos presentaron una relación similar a este último, hasta los últimos dos muestreos (7 y 8) en los que no hay diferencias significativas con el suelo control. Los valores de las ratios N/S (**Figura 14.b**) mostraron incrementos de 2 a 4 veces más elevados en los muestreos del 0 al 6 del suelo tratado, observándose una dinámica similar a la mostrada en la **Figura 14.a**. Este incremento mantenido en el tiempo se encontró influido por la interacción de los dos factores estudiados, aunque el factor *tratamiento* mostró una influencia mayor a lo largo de todos los muestreos, como se puede interpretar a partir de los resultados del ANOVA de dos factores (**Figura 14.a**).



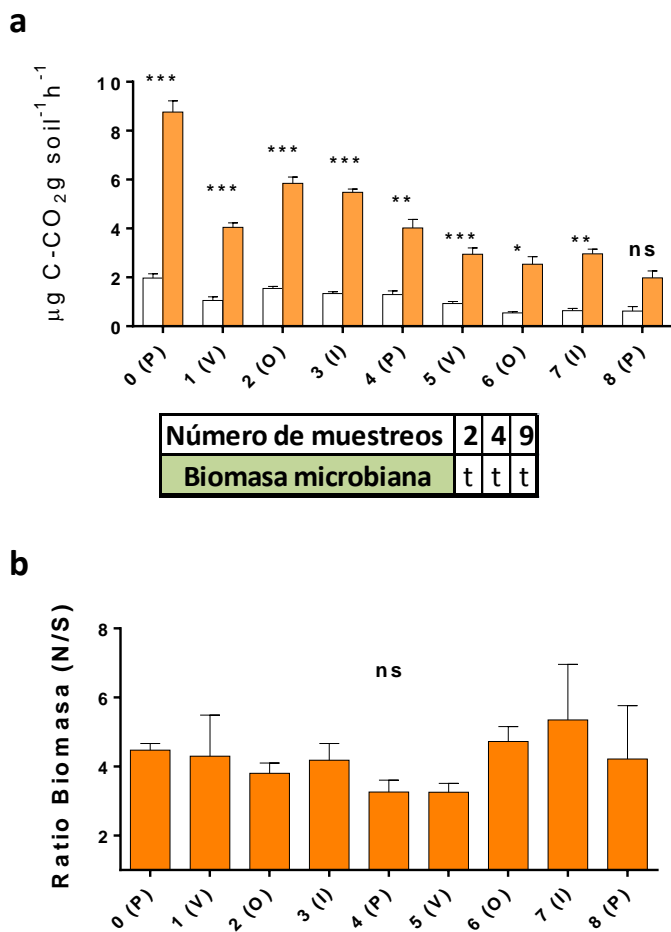
**Figura 14. Respiración basal del suelo N.**

(a) Valores medios y tabla resumen del ANOVA de dos factores.

(b) Ratio de la respiración basal (suelo N/ suelo S).

La interpretación de esta figura se realiza tal y como se explica en la **Figura 10**.

La biomasa microbiana se mantuvo elevada a lo largo de todos los muestreos del suelo N. En el muestreo 0 la biomasa alcanzó su mayor valor, observándose en los siguientes muestreos un descenso progresivo, hasta no apreciarse ninguna diferencia en el último de ellos (8) (**Figura 15.a**). La biomasa microbiana del suelo control también fue disminuyendo, como se puede comprobar en el análisis de las ratios (N/S), las cuales no mostraron diferencias significativas entre sí, lo que significa que la diferencia respecto del suelo control se mantuvo constante (sin diferencias significativas) a lo largo de todo el análisis (**Figura 15.b**). La biomasa microbiana, al igual que la RB, también estuvo influida por la interacción significativa de los dos factores analizados, aunque el factor *tratamiento* exhibió una mayor influencia en el análisis del ANOVA de dos factores (**Figura 15.a**).



**Figura 15. Biomasa microbiana del suelo N.**

(a) Valores medios y tabla resumen del ANOVA de dos factores.

(b) Ratio de la biomasa microbiana (suelo A/ suelo S).

La interpretación de esta figura se realiza tal y como se explica en la **Figura 11**.

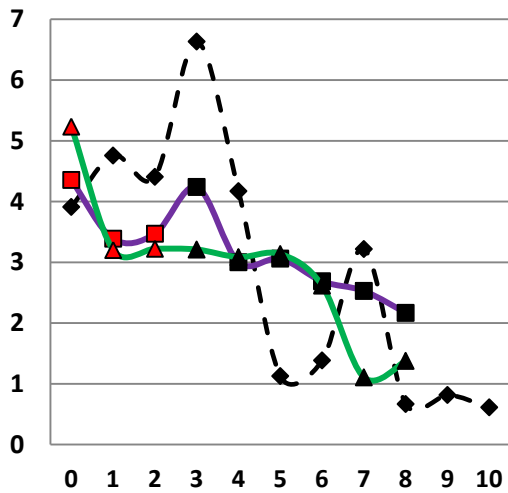
## 2.5.4 Evolución de la respiración basal y de la biomasa

La respiración basal y la biomasa microbiana se incrementaron tras la aplicación de los residuos orgánicos. La enmienda que produjo un mayor impacto tras su aplicación en el suelo fue LANAE, seguida de LAE, ya que mostraron los valores de RB y de biomasa microbiana más elevados (**Figura 16**). Pese al incremento generalizado, en el suelo B se produjo un incremento muy notable de la RB (superior al inicial) de forma tardía (muestreo 3), coincidiendo con el primer verano, en cambio, en los suelos A y N se registró un descenso con respecto a sus muestreos iniciales (**Figura 16.a y b**). Como se ha comentado, en el segundo año de muestreo de todos los suelos tratados algunas diferencias de RB no fueron significativas con respecto al suelo control, registrándose un descenso de los valores que coincidió con una disminución del efecto del *tratamiento* en el suelo (ANOVAs de dos factores). Esta disminución generalizada de la RB también se puede observar en la **Figura 16.a y b**.

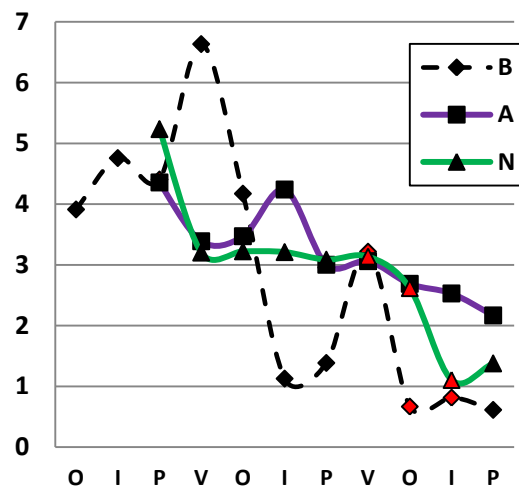
En los suelos tratados con lodos, A y N, existe una tendencia similar entre los valores de RB durante los primeros muestreos (muestreos 0, 1 y 2), posiblemente debido al efecto de la enmienda recién aplicada (**Figura 16.a**). Por otro lado, también se observó una tendencia similar de los valores de las ratios de la biomasa microbiana de los primeros muestreos de los suelos tratados B y A (cuyas enmiendas fueron aplicadas en momentos diferentes) (**Figura 16.c**). Por lo tanto, independientemente de la enmienda aplicada y del momento en el que se aplicó, en los muestreos iniciales se podrían interpretar comportamientos similares en los valores de la respiración y de la biomasa del suelo. Por el contrario, si se tiene en cuenta el momento de la adición de las enmiendas (**Figura 16.b y d**), se puede comprobar que la RB mostró patrones similares en los últimos muestreos de los suelos B y N (**Figura 16.b**). Por otra parte, los valores de la biomasa microbiana de todos los suelos tratados (B, A y N) mostraron una evolución similar en los últimos muestreos, observándose un incremento relativo de la biomasa en los muestreos de invierno de los suelos tratados (**Figura 16.d**).

Mediante este análisis se observa que al comienzo del ensayo el factor *tratamiento* tuvo un efecto predominante sobre algunos de los suelos tratados (**Figura 16 a y c**) y que, paulatinamente a lo largo del tiempo, la influencia del factor *muestreo* se incrementó de forma más evidente sobre la RB y la biomasa, como revelaron previamente los ANOVA de dos factores, y se puede observar en los últimos muestreos de cada suelo (**Figura 16 b y d**). La influencia inicial de la enmienda se puede destacar especialmente en el suelo B debido a que durante el primer año de análisis, en las mediciones de la RB y biomasa, se produjo un incremento influido de forma muy predominante por el factor *tratamiento* ya que no mostró interacción con el factor *muestreo* (la aplicación se realizó en los meses de invierno). En cambio, en los suelos A y N, cuya enmienda se aplicó en primavera, los valores de biomasa y RB estuvieron influidos por la interacción significativa entre ambos factores desde el comienzo.

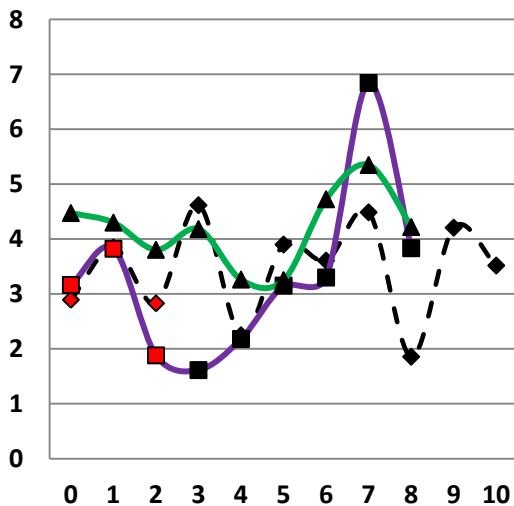
a. Respiración basal.



b. Respiración basal.



c. Biomasa microbiana.



d. Biomasa microbiana.

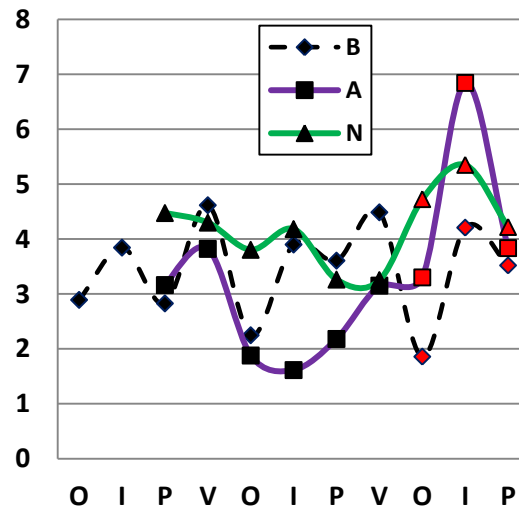


Figura 16. Evolución de los valores de las ratios de respiración basal (a y b) y de la biomasa microbiana (c y d).

En ordenadas se indica el valor de la ratio entre el suelo tratado (B, A y N) y el suelo control. Las gráficas a y c muestran la evolución de la ratio de la respiración basal y de la biomasa independientemente del momento en el que se aplicaron las enmiendas. Las gráficas b y d muestran la evolución de la ratio de la respiración y de la biomasa teniendo en cuenta cuándo se aplicaron las enmiendas. Aquellos marcadores que se muestran en rojo indican la existencia una evolución similar entre diferentes suelos tratados. La escala numérica en abscisas indica el número de muestreo en a y c, mientras que las letras en b y d indican las estaciones del año: otoño (O), invierno (I), primavera (P) y verano (V).



## 2.6 Discusión

---

La respiración basal (RB) y la biomasa microbiana constituyen indicadores microbianos de gran utilidad para evaluar la calidad del suelo (Pérez-Piqueres *et al.*, 2006; Singh y Agrawal, 2008; Bastida *et al.*, 2009; Garbisu *et al.*, 2011). En nuestro trabajo, la aplicación de residuos orgánicos produjo un incremento de la cantidad de la materia orgánica del suelo, lo que provocó el incremento generalizado de la biomasa y de la actividad respiratoria de la microbiota, como destacan otros trabajos (Roig *et al.*, 2012; Franco-Otero *et al.*, 2012). Este resultado fue observado en los tres suelos enmendados, independientemente de las características físico-químicas de las enmiendas o de la época del año en la que se añadieron. No obstante, el impacto (ratio suelo tratado/suelo control) causado en el suelo enmendado tuvo una magnitud y una duración distinta en función de cada enmienda, al igual que en otros estudios (Bastida *et al.*, 2008b; Tarrasón *et al.*, 2010).

### 2.6.1 ¿Por qué se incrementa la respiración basal y la biomasa microbiana de los suelos enmendados?

El incremento de la RB y de la biomasa se pudo observar fundamentalmente durante el primer año de análisis en todos suelos tratados, sin excepción. Este mismo resultado se ha comprobado en trabajos similares al nuestro, en los que también se han utilizado diferentes enmiendas orgánicas (compostadas y sin compostar) en suelos de clima mediterráneo (Fernández-Getino *et al.*, 2012; Jorge-Mardomingo *et al.*, 2013; Kayikcioglu, 2013; Nicolás *et al.*, 2014) y también en suelos agrícolas de otros climas (Lambais y do Carmo, 2008; Singh y Agrawal, 2008; Kaschuk *et al.*, 2010). En principio, se ha comprobado que generalmente este incremento sucede de una forma dependiente de la dosis aplicada (Sciubba *et al.*, 2014). Sin embargo, en experimentos llevados a cabo previamente por nuestro grupo de investigación se describieron resultados distintos, en los que se comprobó que la biomasa disminuyó en los suelos tratados con mayores dosis, atribuyéndose este hecho a posibles efectos de toxicidad derivados de la aplicación de las enmiendas (Gondim-Porto, 2012).

Tras el análisis de nuestros resultados, se podría pensar que la razón para justificar el incremento de estas variables se encontraría directamente relacionada con la adición de materia orgánica, con un alto contenido en nutrientes y en microorganismos exógenos. Sin embargo, también existen una serie de factores ambientales y edáficos capaces de influir en los valores de estas variables.

#### 2.6.1.1 Efectos debidos a los residuos orgánicos

El primero de los motivos del incremento de las variables estudiadas se apoya en el hecho de que se adiciona al suelo una extraordinaria cantidad de compuestos de carbono fácilmente degradables. La presencia de estos compuestos fue capaz de estimular el incremento de la RB del suelo acelerando las tasas de respiración por parte de las poblaciones microbianas, como se ha sugerido previamente (Ros *et al.*, 2003a; Franco-Otero *et al.*, 2012). Este suceso metabólico, en el que se potencian las

tasas de RB tras la adición de nutrientes químicamente lábiles, se denomina efecto de activación o *priming effect* (Kuzyakov *et al.*, 2000; Fontaine *et al.*, 2003) y su aparición se ha descrito en suelos donde se han aplicado residuos orgánicos (Jorge-Mardomingo *et al.*, 2013; Sradnick *et al.*, 2014). Microbiológicamente, se ha sugerido que las poblaciones que se encuentran detrás de este incremento de la respiración son poblaciones copiotrofas, que poseen una preferencia por consumir sustancias fácilmente degradables y cuya tasa de respiración por unidad de biomasa microbiana es elevada (Fierer *et al.*, 2012a). En nuestro trabajo, las correlaciones significativas entre la RB y el carbono orgánico ( $r=0,47$ ;  $P<0,01$ ), o el carbono soluble ( $r=0,48$ ;  $P<0,01$ ), apoyan la existencia de una relación directa entre los nutrientes lábiles y la RB, como se ha descrito previamente (Burton *et al.*, 2010). A este respecto, han sido publicados resultados muy similares en otros estudios con suelos enmendados (Marschner *et al.*, 2003; Bastida *et al.*, 2009). Independiente de la época del año en la que se aplicaron las enmiendas, la mayor proporción de carbono lábil aportado por los lodos LAE y LANAE con respecto a BC podría ser la razón para justificar que los suelos tratados con lodos tuviesen una RB mayor en los muestreos del primer año. El contenido de carbono lábil en los lodos de depuradora suele ser mayor debido a que en este caso no sufren un proceso de compostaje en su elaboración (Bastida *et al.*, 2012; Bolan *et al.*, 2012). Por el contrario, los valores bajos de la RB en el suelo B durante la primera parte del ensayo podrían estar relacionados con la liberación lenta de compuestos lábiles procedentes del carbono recalcitrante en el suelo B, ya que éstos suelen estar presentes en mayor proporción en las enmiendas compostadas (Tarrasón *et al.*, 2010; González-Ubierna *et al.*, 2012). Esto sucedería por una degradación más lenta de esos compuestos químicamente más complejos (Pascual *et al.*, 1998; Jorge-Mardomingo *et al.*, 2013) que, en muchas ocasiones, requieren de la presencia de enzimas extracelulares secretadas por hongos (Horwath, 2015). Durante el segundo año de muestreo, el descenso progresivo de la RB de todos los suelos enmendados podría deberse a la disminución de la cantidad de la fracción de carbono lábil (Pedra *et al.*, 2007). De hecho, nuestros resultados señalan que la disminución de la respiración del suelo B, que fue el tratamiento en el que se apreció una mayor disminución, coincidió con un descenso del carbono soluble en el segundo año de muestreo, como también apoyan las correlaciones realizadas para este tratamiento entre el carbono soluble y la RB durante el segundo año ( $r=0,81$ ;  $P<0,05$ ).

Además de la RB, el aumento de estos compuestos fácilmente degradables podría favorecer el desarrollo de la biomasa microbiana del suelo como se ha podido observar en varios experimentos llevados a cabo en suelos mediterráneos (Bastida *et al.*, 2008b; Tejada *et al.*, 2009; Cellier *et al.*, 2012; Tarrasón *et al.*, 2014). En este sentido, en nuestro trabajo encontramos correlaciones que apoyan esta idea, por ejemplo, entre la biomasa microbiana y la fracción de carbono lábil 1 ( $Lp_1$ ) ( $r=0,37$ ;  $P<0,05$ ), la fracción de carbono lábil 2 ( $Lp_2$ ) ( $r=0,62$ ;  $P<0,001$ ) o el carbono soluble ( $r=0,48$ ;  $P<0,01$ ). Pero más allá de esta idea, que solamente contemplaría el incremento de los compuestos más lábiles, se podría pensar que realmente el incremento general de los nutrientes (no solo de carbono sino de nitrógeno o de fósforo también) tras la aplicación de enmiendas, podría ser el motivo principal del aumento de la biomasa microbiana (de Araujo *et al.*, 2010). De esta forma, se hallaron correlaciones fuertes entre la biomasa microbiana y el carbono orgánico total ( $r=0,64$ ;  $P<0,001$ ), el nitrógeno total del suelo ( $r=0,78$ ;  $P<0,001$ ), el amonio ( $r=0,59$ ;  $P<0,001$ ), o

el fósforo ( $r=0,40$ ;  $P<0,05$ ). Todos estos nutrientes constituyen un conjunto de componentes esenciales para la síntesis de la biomasa microbiana (Brookes *et al.*, 1982; Gallardo y Schlesinger, 1992).

Mientras que los valores de biomasa en los suelos B y N fueron bastante estables durante el experimento, en el caso del suelo A mostraron un perfil más variable. Este resultado podría atribuirse a la influencia del nitrógeno en la formación de la biomasa. A pesar de que las correlaciones de la biomasa con el nitrógeno total ( $r=0,78$ ;  $P<0,001$ ) y el amonio ( $r=0,59$ ;  $P<0,001$ ) fueron positivas, los datos de biomasa microbiana del suelo A tuvieron unos valores de correlación especialmente significativos con las concentraciones de nitrógeno total ( $r=0,86$ ;  $P<0,01$ ) y de amonio ( $r=0,85$ ;  $P<0,01$ ) superiores a los del resto de los suelos enmendados, lo que podría sugerir una dependencia más fuerte entre el descenso de la biomasa y el descenso de la concentración de estos compuestos. De hecho, el suelo A es el suelo tratado donde se registró un descenso más notable de los compuestos de nitrógeno, lo que pudo influir en la estabilidad de los valores de biomasa microbiana, sin embargo, no hemos hallado reflexiones similares a las nuestras en la bibliografía consultada.

Respecto a la duración de los resultados observados, las experiencias previas realizadas en nuestro laboratorio (Gondim-Porto, 2012) también mostraron resultados similares a los encontrados en el presente trabajo. En el trabajo de Gondim-Porto se observó que tanto la RB como la biomasa microbiana de los suelos enmendados con lodos (a la misma concentración que en nuestro caso) se mantuvieron elevados incluso dos años después. Los niveles elevados de RB y biomasa microbiana durante periodos prolongados parecen ser habituales cuando se aplican este tipo de residuos en suelos agrícolas. De hecho, existen diversos estudios en los que el suelo se ha tratado con distintas enmiendas orgánicas a dosis similares a las nuestras que muestran que la biomasa microbiana permanece incrementada durante periodos de tiempo superiores a los de nuestro trabajo, próximos a los 5 años (Nicolás *et al.*, 2014), o incluso de más de diez años (Bastida *et al.*, 2008a; Bastida *et al.*, 2013). La duración de estos incrementos se ha atribuido a efectos secundarios provocados por la adición de las enmiendas orgánicas como, por ejemplo, a un incremento del desarrollo vegetal que conduce a la liberación de sustancias biodisponibles para los microorganismos, a la formación de agregados, o al incremento de la capacidad de retención de agua. No obstante, el incremento prolongado de la biomasa microbiana también se ha detectado en suelos tratados con dosis inferiores a las aplicadas en nuestro trabajo (Ros *et al.*, 2003a; Tarrasón *et al.*, 2010).

Por otra parte, se ha comprobado que los valores de RB y de biomasa microbiana se encuentran estrechamente relacionados. Así, en estudios previos se ha observado que el incremento de la RB coincidía con el incremento de la biomasa microbiana del suelo cuando se aplicaban residuos al suelo (Gondim-Porto, 2012). Esos resultados también coinciden con los obtenidos en el presente estudio, donde hallamos correlaciones muy significativas entre la RB y la biomasa microbiana del suelo ( $r=0,74$ ;  $P<0,001$ ), y también con los resultados de otros trabajos similares (Ros *et al.*, 2003b; Luo y Zhou, 2006; Ros *et al.*, 2006a; Lambais y do Carmo, 2008; Singh y Agrawal, 2008; Bastida *et al.*, 2008b; Iovieno *et al.*, 2009; Brockett *et al.*, 2011; Kayikcioglu, 2013). No obstante, existieron excepciones a la regla, ya que el aumento de la RB no se encontró siempre ligado a un incremento de la biomasa microbiana. Por

ejemplo, en el suelo B la biomasa permaneció elevada durante más de dos años y, en cambio, la RB disminuyó de forma significativa durante el segundo año (cosa que no ocurrió en los suelos A y N, donde ambas variables permanecieron incrementadas). De acuerdo con estas diferencias (entre la RB y la biomasa), Anderson y Domsch relacionaron que valores bajos de respiración por unidad de biomasa son indicativos de que las poblaciones del suelo realizan un uso eficiente del carbono para el desarrollo de la biomasa (Anderson y Domsch, 2010).

En definitiva, los residuos orgánicos provocan un incremento de la RB del suelo, así como un incremento de su biomasa microbiana, debido al aumento de la disponibilidad de nutrientes que se produce con la adición de los residuos orgánicos (Marschner *et al.*, 2003; Roig *et al.*, 2012). Pero además de las razones básicamente nutricionales, otra razón por la que se podría potenciar la biomasa microbiana podría ser por la adición de microorganismos exógenos (al menos temporalmente), como también sugieren otros autores (Blagodatsky *et al.*, 2000; Ros *et al.*, 2003b; Ros *et al.*, 2006a; Tejada *et al.*, 2009; de Araujo *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque inicialmente este hecho podría producirse, la proliferación de los microorganismos propios del suelo, debido a la elevada cantidad de materia orgánica introducida, sería una competencia que limitaría la proliferación de los microorganismos exógenos añadidos con la enmienda (Saison *et al.*, 2006; Bastida *et al.*, 2008b).

### **2.6.1.2 Efectos debidos a las variables ambientales y edáficas**

Aparte de las razones directamente relacionadas con la enmienda, comentadas en el apartado anterior, diversos trabajos apoyan una relación directa entre las variables ambientales (como son la temperatura y la humedad) y los valores de RB y/o biomasa microbiana (Fierer y Schimel, 2002; Feng *et al.*, 2003; Austin *et al.*, 2004; Fierer *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007; Brockett *et al.*, 2011). Concretamente, la humedad del suelo se suele incrementar con la aplicación de residuos orgánicos (Hueso *et al.*, 2012) y esto podría influir sobre la microbiota del suelo ya que el incremento del grado de humedad del suelo aumenta la biodisponibilidad de los nutrientes y la actividad de las enzimas que degradan la materia orgánica (Suseela *et al.*, 2012; Bran Nogueira Cardoso *et al.*, 2013). Aunque previamente ya se había descrito esta correlación (Bastida *et al.*, 2008b), en nuestro trabajo la correlación entre la biomasa microbiana y la humedad del suelo es significativa aunque no especialmente fuerte ( $r=0,32$ ;  $P<0,05$ ). En cambio, la precipitación (medida en mm) se relaciona mejor con el incremento de la biomasa microbiana del suelo ( $r=0,46$ ;  $P<0,001$ ).

Por otra parte, la temperatura también pudo haber influido sobre la RB y la biomasa microbiana. Al fin y al cabo, las variables microbianas medidas en el suelo muestran una gran dependencia del contexto climático (Blagodatskaya y Kuzyakov, 2008; Garbisu *et al.*, 2011). En este sentido, el hecho de que el factor *tratamiento* mostrase un mayor protagonismo en los primeros muestreos del suelo B (durante los primeros muestreos de invierno de 2010) que en los de los suelos A y N (cuyas enmiendas fueron añadidas en primavera de 2010), podría relacionarse con que las temperaturas más bajas causaron un efecto inhibitorio general de la actividad del suelo y, por tanto, de la biomasa y de la RB, lo que hizo destacar la influencia del factor *tratamiento* sobre el factor *muestreo* en el incremento de estas variables en estos

suelos (B). En cambio, en los suelos A y N, cuyos primeros muestreos fueron en primavera y en verano, el incremento de la actividad debido a la temperatura (Fierer *et al.*, 2006; Wallenstein *et al.*, 2011) podría explicar que el factor climático (factor *muestreo*) influyera de una forma similar al efecto que causa la enmienda (factor *tratamiento*).

Además de las variables climáticas, las variables edáficas de carácter físico-químico pueden relacionarse con la RB y biomasa. En nuestro trabajo, dentro de las variables físico-químicas se pudo observar que los valores de pH disminuyeron cuando se añadieron las enmiendas al suelo, hecho que coincidió con sendos incrementos de la RB ( $r=-0,53$ ;  $P<0,001$ ) y de la biomasa microbiana ( $r=-0,64$ ;  $P<0,001$ ). El descenso del pH es frecuente en este tipo de suelos agrícolas por la producción de ácidos tras la degradación de las enmiendas orgánicas (Antolín *et al.*, 2005; González-Ubierna *et al.*, 2012; Franco-Otero *et al.*, 2012) y parece ser que los microorganismos del suelo son sensibles al estrés provocado por este descenso (Zhang y Zak, 1998), promoviéndose un incremento de la RB del suelo como indican algunos autores (Anderson y Domsch, 1993; Enwall *et al.*, 2007). Así, el incremento de estas variables fue observado cuando el valor del pH se acercó a la neutralidad, como ocurrió en nuestro caso. En esta línea, se ha comprobado en diversos suelos sin enmendar que los valores más próximos a la neutralidad favorecen un incremento de la RB y de la biomasa microbiana (Fierer y Jackson, 2006) aunque, en nuestro caso, pensamos que el incremento de estas variables dependió en mayor medida de la elevada cantidad de nutrientes aportada.

## 2.6.2 ¿Mejoran los indicadores de salud del suelo?

El estudio de la RB y de la biomasa microbiana puede ser de utilidad para evaluar la salud del suelo (Bastida *et al.*, 2008c; Kaschuk *et al.*, 2010; Garbisu *et al.*, 2011; Creamer *et al.*, 2014). En concreto, la disminución de los valores de ambas variables está considerada como un indicador negativo de la salud del suelo ya que se ha relacionado con la pérdida de cobertura vegetal y de materia orgánica (de Araujo *et al.*, 2010; Bran Nogueira Cardoso *et al.*, 2013). Sin embargo, el uso de estos parámetros en solitario aporta una información útil pero limitada acerca del tamaño y de la funcionalidad de las poblaciones (Banerjee *et al.*, 1997), que puede complementarse con el uso de algunos índices fisiológicos, los cuales aportan mayor información y sensibilidad cuando se producen perturbaciones en el suelo (Moscatelli *et al.*, 2005; Bastida *et al.*, 2008c). De entre estos índices, el más empleado es el cociente metabólico ( $qCO_2$ ) que se define como la relación entre la respiración basal y la biomasa microbiana (Anderson y Domsch, 1993), e indica la eficiencia de respiración de los sustratos de carbono presentes en el suelo por parte de la biomasa residente en él. Generalmente, un valor bajo de este índice se atribuye a poblaciones microbianas maduras y en equilibrio, es decir, que no sufren el efecto de alguna perturbación (Insam y Domsch, 1988; Anderson y Domsch, 1990; Anderson y Domsch, 2010). Por el contrario, los valores de este índice se incrementan en suelos alterados por distintas perturbaciones: físicas, como la roturación, o químicas, como los metales pesados o compuestos orgánicos presentes en las enmiendas que permiten la proliferación de poblaciones más oportunistas (Bradley y Fyles, 1995; Ros *et al.*, 2006a; Tarrasón *et al.*,

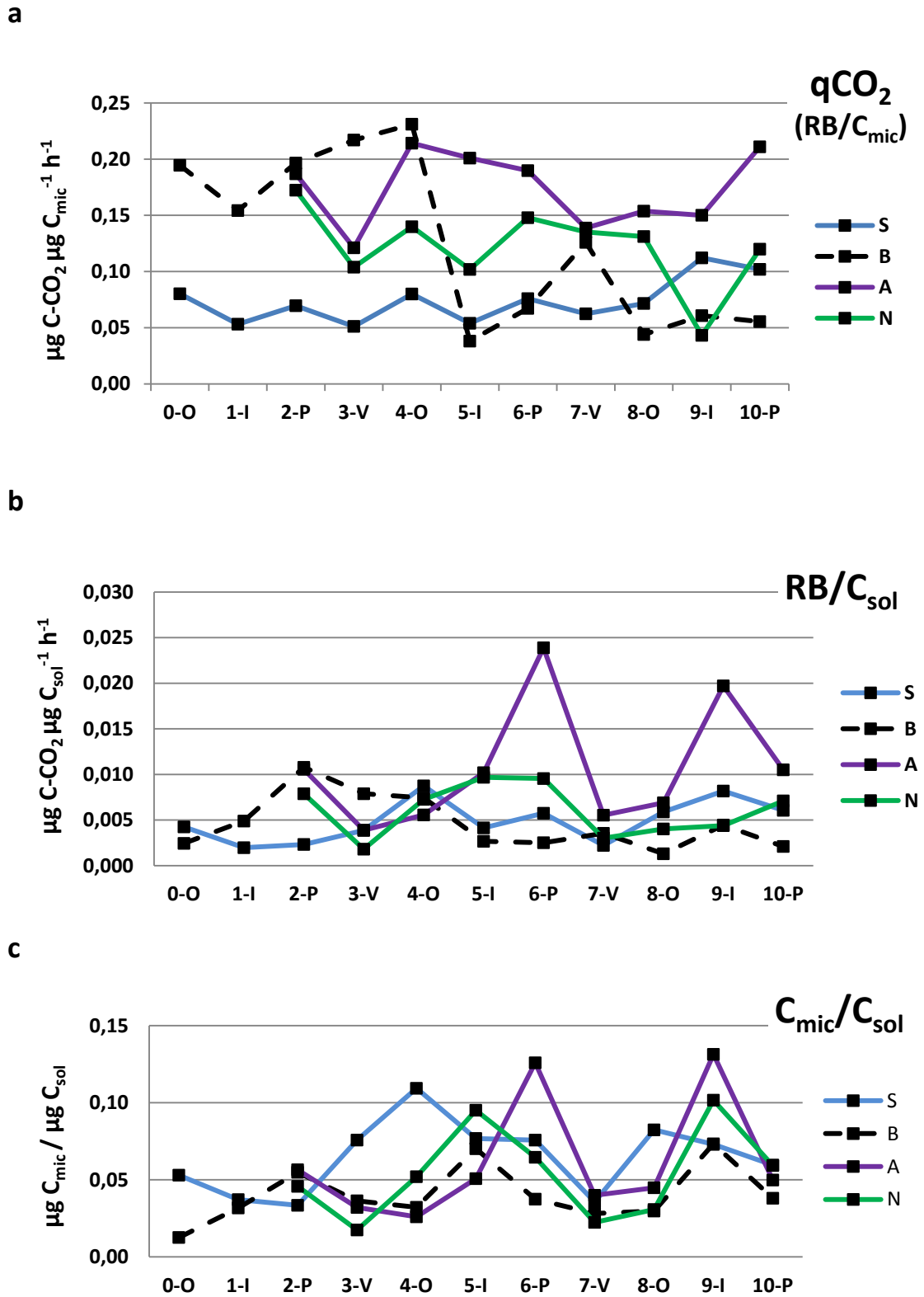
2010; Kayikcioglu, 2013; Berard *et al.*, 2014) o, también, como los cambios de pH o el aumento del contenido de sales (medido en forma de conductividad eléctrica) (Fließbach *et al.*, 1994; Enwall *et al.*, 2007; Jorge-Mardomingo *et al.*, 2013). Por esta razón, tradicionalmente el  $qCO_2$  se ha utilizado como un indicador del estrés que pueden sufrir las poblaciones del suelo. En este sentido, diversos autores justifican la existencia de estrés en las poblaciones microbianas porque se incrementa su respiración, de tal manera que la energía producida se emplearía principalmente en la supervivencia celular y se produciría una disminución de la asimilación del carbono en forma de biomasa (crecimiento de la población microbiana) (Killham, 1985; Bardgett y Sagar, 1994; Fisk y Fahey, 2001; Kayikcioglu, 2013). Sin embargo, otros autores sugieren otras explicaciones que no implican un concepto de estrés. De esta manera, los valores elevados de  $qCO_2$  podrían relacionarse con un incremento del metabolismo de una fracción de la población que es más activa ante la elevada cantidad de determinados nutrientes (Fisk y Fahey, 2001), por ejemplo, un aumento de las poblaciones microbianas oportunistas. Otros autores, en cambio, sugieren que cuando los microorganismos disponen de una gran cantidad de carbono y no lo pueden utilizar de forma inmediata para la síntesis de biomasa, se provoca un desbordamiento de su metabolismo que se traduce en un incremento de la respiración y, por tanto, del  $qCO_2$  (Tempest y Neijssel, 1992; Schimel y Weintraub, 2003). No obstante, ninguna de estas interpretaciones sería excluyente la una de la otra.

En nuestro trabajo se pudo apreciar un incremento de la RB y de la biomasa microbiana en las parcelas enmendadas, aunque no con la misma proporción ya que la primera de las variables (RB) lo hizo de forma más notable que la segunda (**Figura 16**), lo que provocó el incremento del  $qCO_2$  en los tres suelos enmendados durante los primeros muestreos (hasta 4-O, **Figura 17.a**), posiblemente favorecido por la proliferación de poblaciones oportunistas. A partir de ese momento los valores de  $qCO_2$  comenzaron a disminuir (**Figura 17.a**).

Sin embargo, considerando que simplemente con la observación del  $qCO_2$  no se conoce de forma exacta a qué pueden deberse sus variaciones, es decir, si es debido a un incremento de la RB o a una disminución de la biomasa, se procedió a la observación por separado del uso del carbono para la RB y la biomasa. Este enfoque desglosado del  $qCO_2$  se realizó asumiendo que el carbono soluble ( $C_{sol}$ ) es el que las células microbianas son capaces de integrar más fácilmente para su metabolismo (Marschner *et al.*, 2003), por lo que se estandarizó la respiración y la biomasa por la cantidad de carbono soluble presente en cada suelo y muestreo (**Figura 17.b y c**). De esta manera, los valores elevados de  $qCO_2$  en la primera parte del ensayo se explicarían por la respiración masiva de la gran cantidad de materia orgánica lábil aportada por las enmiendas, pero que no iría destinada completamente a la síntesis de biomasa puesto que la relación  $C_{mic}/C_{sol}$  es inferior o igual en estos suelos enmendados a la que se obtiene en el suelo control (**Figura 17.c**). Por ello, podríamos deducir que a pesar de que existe una gran cantidad de carbono soluble no se está usando con destino a la producción de biomasa, aunque podría hacerlo (hay carbono suficiente), apuntando a que la mayor parte no se está usando de manera “rentable” (desde el punto de vista de síntesis de biomasa). El destino de este consumo respiratorio del  $C_{sol}$  sería bien para sobreponerse al estrés que supone la adición de sustancias extrañas, o bien para eliminar gran parte del carbono en ciclos fútiles.

En la segunda parte del análisis, sin embargo, se observó una disminución considerable del  $qCO_2$  en el suelo B, asemejándose al del suelo control (S), y que coincide con una menor RB. En términos químicos, este descenso podría deberse a la disminución de la cantidad de carbono de fácil degradación a lo largo del tiempo, el cual influye de forma determinante en la respiración del suelo, como proponen más investigaciones (Thirukkumaran y Parkinson, 2000; Pedra *et al.*, 2007). En el suelo B, la concentración baja de carbono de fácil degradación podría proceder de una liberación mantenida en el tiempo a partir de las especies recalcitrantes de carbono que presentan una concentración estable en este suelo (B) durante la segunda parte del ensayo. Este tipo de carbono más complejo suele estar en altas proporciones en las enmiendas compostadas (BC) y es mineralizado de forma más lenta por la microbiota del suelo, que produce, por lo tanto, valores inferiores de respiración, como ha sido reportado en varios trabajos (Jiménez *et al.*, 2007; Tarrasón *et al.*, 2010; García-Orenes *et al.*, 2010). Microbiológicamente, este comportamiento metabólico podría relacionarse con la adquisición de un estado de madurez de las poblaciones presentes en el suelo (Anderson y Domsch, 1989), cuya actividad metabólica se asemejaría a la de las poblaciones autóctonas (suelo S) (Insam y Haselwandter, 1989), las cuales presentan valores de  $qCO_2$  menores, en comparación con los suelos con poblaciones oportunistas (Bradley y Fyles, 1995). Por otra parte, desde un punto de vista físico, las enmiendas favorecen la formación de agregados en el suelo y, en concreto, las sustancias recalcitrantes favorecen una mayor estabilidad de los mismos (Lugato *et al.*, 2010), aspecto que se pudo comprobar principalmente en los muestreos de suelo B. Los agregados pueden dificultar el acceso a los nutrientes y disminuir el consumo de la materia orgánica por los microorganismos (Majumder *et al.*, 2010; Navarro-García *et al.*, 2012) y, por este motivo, se podría producir también una disminución de la mineralización del carbono presente en el suelo B.

En el extremo opuesto se encuentran las muestras de suelo A, que presentaron los valores de  $qCO_2$  más elevados dentro de los tres suelos enmendados a partir del tercer muestreo (4-0) (**Figura 17.a**). Estos resultados coinciden con los publicados previamente por Jorge-Mardomingo y colaboradores (donde se aplicó una metodología ligeramente distinta) los cuales relacionaron estas observaciones con una mayor proporción de compuestos lábiles en estos suelos (Jorge-Mardomingo *et al.*, 2013). Sin embargo, a partir de las explicaciones propuestas, que tienen en cuenta el tipo de carbono del suelo, no podríamos justificar este incremento del  $qCO_2$ , ya que las proporciones de carbono lábil, carbono recalcitrante o carbono soluble disminuyeron a la vez a lo largo del tiempo. Por tanto, en realidad, las poblaciones presentes en este tipo de suelos enmendados tendrían un metabolismo menos eficiente para la síntesis de biomasa a pesar de su metabolismo respiratorio elevado. ¿A qué podría ser debido, por tanto, este incremento de  $qCO_2$ ? La razón podría estar en dos de las tres explicaciones que hemos comentado previamente para este fenómeno: (1) la existencia de procesos dañinos para las células, que se ven obligadas a desarrollar mecanismos de protección y/o reparación que requieren grandes cantidades de energía; o (2) la selección de poblaciones extraordinariamente activas frente a determinados compuestos presentes en el suelo enmendado. La explicación que indica que se podría metabolizar de manera ineficiente el carbono por la presencia de grandes cantidades de éste quedaría descartada puesto que ya hemos comentado que la cantidad de carbono disponible ha disminuido en esta segunda parte del ensayo.



**Figura 17. Relación de la respiración basal y la biomasa microbiana.** (a) Cociente metabólico,  $qCO_2$  ( $RB/C_{mic}$ ), (b) rentabilidad del uso del carbono soluble en respiración basal ( $RB/C_{sol}$ ) y (c) rentabilidad del uso del carbono soluble para la producción de biomasa microbiana ( $C_{mic}/C_{sol}$ ).

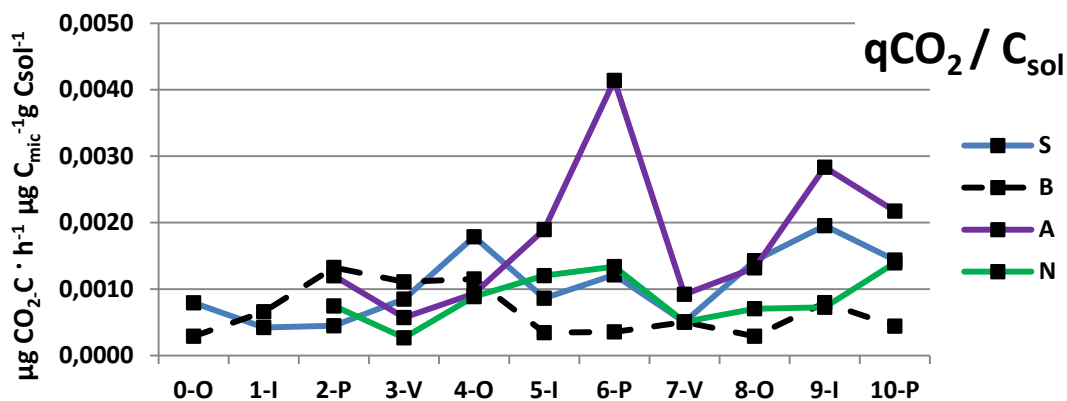
Pese al incremento de  $qCO_2$ , se observó un descenso de ambas variables, pero proporcionalmente más pronunciado de la biomasa (por ejemplo, en el muestreo 10-P del suelo A), lo que indicaría que la biomasa presente en ese muestreo tiene un metabolismo respiratorio más elevado. Esta disminución de la biomasa podría ser explicada por la existencia de un fenómeno deletéreo para ésta y, por tanto, el incremento de respiración podría ser utilizado para la obtención de gran cantidad de energía necesaria para el desarrollo de procesos de supervivencia. Un ejemplo similar puede observarse en el caso del suelo N en los muestreos 5-I y 6-P. En ambos muestreos hay una utilización similar del carbono para la respiración (**Figura 17.b**) y, sin embargo, la biomasa por unidad de carbono soluble disminuye en 6-P (**Figura 17.c**) indicando que, muy probablemente, se den (1) circunstancias adversas que provoquen una necesidad de obtener mayor cantidad de energía para resolver problemas que afectan a la supervivencia de la población microbiana.

En cambio, en algunos muestreos la cantidad de biomasa microbiana se mantuvo (o varió ligeramente) coincidiendo con un incremento de la respiración basal (muestreo 4-O del suelo A; incremento de  $qCO_2$ ). En este caso, ambas explicaciones (1 y 2) podrían ser útiles: el carbono del suelo se utilizaría para la obtención de energía para el mantenimiento de la supervivencia celular frente una situación de estrés, sin ser empleado en la síntesis de biomasa, o bien, habría un incremento del metabolismo de una población concreta.

Continuando con este punto de vista, en la segunda parte del ensayo, la mayor rentabilidad respiratoria (menor  $qCO_2$ ) del suelo B en el uso del carbono soluble para la producción de biomasa microbiana, en vez de para la respiración, indicaría que se ha producido una estabilización de las poblaciones microbianas que emplean principalmente el carbono en la construcción de biomasa (por ejemplo, muestreo 5-I en el suelo B) (**Figura 17.b** y **c**). Por esta razón, los valores de  $qCO_2$  de este suelo disminuyen y se mantienen bastante estables en este tipo de suelos tratados.

Puesto que la respiración y la biomasa son dependientes de la cantidad de carbono soluble presente en el suelo, la estandarización del  $qCO_2$  respecto del carbono soluble nos permitiría determinar la eficacia de la biomasa presente en términos de respiración respecto de la cantidad de carbono soluble y, por tanto, poder comparar entre todos los tratamientos (rentabilidad del  $qCO_2$  por unidad de carbono soluble, **Figura 18**). Así, los valores de la relación  $qCO_2/C_{sol}$  del suelo B también son inferiores a los del suelo control, lo que nos indica que la tasa de consumo neta apenas varía, confirmando que las poblaciones han alcanzado un equilibrio metabólico.

En cambio, los valores de la relación  $qCO_2/C_{sol}$  del suelo A fueron mayores que en el resto de los suelos enmendados (**Figura 18**), lo que indica que los microorganismos de estos suelos (A) consumieron menos eficientemente el carbono disuelto en el suelo desde el punto de vista de la construcción de biomasa. Esto podría significar que las poblaciones microbianas de los suelos A no se encontraban todavía adaptadas y respondieron al estrés que suponen las circunstancias concretas del crecimiento en ese suelo, reduciendo la cantidad de energía obtenida por la respiración del carbono soluble para la síntesis de biomasa (García-Orenes *et al.*, 2010) (**Figura 17**), e incrementándola para la reparación celular.



**Figura 18. Evolución de la relación del cociente metabólico con el carbono soluble presente en el suelo.**

Por lo tanto, la aplicación de las enmiendas orgánicas produjo un incremento de su actividad respiratoria, así como de su biomasa, y este hecho puede ser indicativo de la mejora de la salud del suelo ya que un aumento de estas variables favorece el flujo de energía y de materia en el suelo (de Araujo *et al.*, 2010; Creamer *et al.*, 2014). Sin embargo, los valores de  $qCO_2$  indican que se produce un aumento mayor de la actividad respiratoria por unidad de biomasa fundamentalmente en los suelos tratados con lodo (A y N), disminuyendo la eficiencia de la conversión de carbono en biomasa (García-Orenes *et al.*, 2010). Pese a esta última consideración, salvo el incremento del  $qCO_2$  al comienzo del ensayo en el suelo B, con el transcurso del tiempo este índice se estabilizó en este tipo de suelo (siendo, incluso, la mitad que el del suelo control), además de producirse un incremento del carbono orgánico con la adición de la enmienda. El cambio metabólico de las poblaciones probablemente fue debido a que se alcanzó un mayor grado de madurez en ellas como señalan otros autores (Bradley y Fyles, 1995; Anderson y Domsch, 2010). De esta manera, a lo largo de los muestreos, la enmienda BC fue la que causó cambios más favorables en los indicadores microbianos de salud del suelo (respiración basal, biomasa microbiana y  $qCO_2$ ), promovándose una mayor fijación de carbono en el suelo al evitar su pérdida en forma de  $CO_2$  y manteniéndose (secuestrado) en forma de materia orgánica en el suelo.

## 2.7 Conclusiones

---

1. La respiración basal de los suelos enmendados fue superior a la del suelo control durante el primer año tras la adición de las enmiendas. Este incremento dependió especialmente de los nutrientes más fácilmente degradables (lábilés).
2. La respiración basal durante el segundo año de ensayo fue superior a la del suelo control solo en el caso de los suelos tratados con lodos de depuradora, lo que indica que la naturaleza química de las mismas es determinante en cuanto a la respuesta microbiana que se produce.
3. La biomasa microbiana se incrementó en los suelos enmendados durante todo el ensayo, independientemente del tipo de tratamiento. En particular, el aumento de la humedad y el de la cantidad de algunos compuestos de nitrógeno parecen regular este incremento.
4. Las poblaciones de los distintos suelos provocaron un incremento considerable del valor de  $qCO_2$ , en algunos casos presumiblemente achacable al incremento de la actividad de una parte de la población, pero en otros casos como una respuesta al estrés que supone la presencia de algunas enmiendas.
5. La aplicación de la enmienda compostada (BC) produjo un incremento en términos globales de la materia orgánica del suelo y disminuyó la producción de  $CO_2$ , suponiendo un impacto más moderado sobre las poblaciones del suelo.



## Capítulo III

---

### **3 Análisis metabólico de la microbiota de suelos agrícolas tras la aplicación de enmiendas orgánicas**



## 3.1 Resumen

---

El uso de los residuos orgánicos como fertilizantes en suelos degradados es una práctica muy extendida en agricultura. Sin embargo, a pesar de existir una abundante documentación acerca de los cambios químicos y físicos que se producen en la salud del suelo por esta actividad, el impacto que se produce en la microbiota del suelo no se encuentra completamente estudiado, especialmente a nivel funcional. Una de las formas de estudiar los cambios funcionales producidos en el suelo es por medio del cálculo de las tasas de consumo de una serie de sustratos concretos, que se traduce en la descripción de los perfiles metabólicos de las comunidades microbianas que habitan en ese suelo (*Community level physiological profiles*, CLPP). Este tipo de análisis muestra las preferencias nutricionales de las poblaciones microbianas en función de cómo se comportan frente a diferentes sustratos similares a los del suelo. En nuestro trabajo hemos escogido el sistema MicroResp<sup>TM</sup> como forma de determinar los CLPPs de los suelos tratados.

En este estudio se analizaron los CLPPs de suelos agrícolas de clima mediterráneo enmendados con una única dosis (160 Mg ha<sup>-1</sup>) de basura compostada (BC), y con lodos procedentes de la depuración de aguas residuales LAE (digestión aerobia) y LANAE (digestión anaerobia), respecto del suelo control (suelo S). Los perfiles metabólicos fueron medidos a lo largo de dos años para los suelos tratados con lodos (suelos A y N) y durante dos años y medio en el caso del suelo tratado con BC (suelo B). Se utilizaron 14 sustratos de grupos químicamente distintos (ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos).

Las poblaciones microbianas de los suelos enmendados mostraron un uso preferente de los azúcares y de los aminoácidos, frente a una disminución del consumo de los ácidos orgánicos, resultados que se podrían justificar por la proliferación de microorganismos oportunistas y por el incremento de la demanda de algunos sustratos en particular. Con respecto a la evolución de las modificaciones, las altas dosis añadidas provocaron que los perfiles de consumo se mantuvieran alterados incluso dos años después de la aplicación. No obstante, la influencia de las circunstancias climáticas (temperatura y humedad) y edafológicas (formación de agregados) constituyó también un factor importante en la evolución de los cambios.

La comparación del cociente metabólico (qCO<sub>2</sub>) de los sustratos utilizados por los suelos enmendados respecto del suelo control permitió comprobar que el suelo B durante los primeros muestreos presentó una mayor diversidad funcional, probablemente debido a las diferencias químicas existentes entre las enmiendas compostadas y sin compostar. Además, el consumo de la arginina, la glucosa y el ácido cítrico nos permitieron proponer a estos sustratos como marcadores de gran relevancia para describir la presencia de enmiendas orgánicas en los suelos agrícolas.

## 3.2 Introducción

---

En agricultura, los residuos orgánicos procedentes de las zonas urbanas e industriales se suelen aplicar al suelo con la finalidad de restaurar su materia orgánica y así incrementar su fertilidad (Diacono y Montemurro, 2010). No obstante, las enmiendas orgánicas provocan cambios en la estructura de las poblaciones del suelo y, por tanto, su funcionalidad metabólica y su papel ecológico pueden verse modificados. El análisis de la estructura de las poblaciones microbianas constituye una manera efectiva para estudiar los efectos de las perturbaciones naturales o de origen humano en el suelo (Griffiths y Philippot, 2013) pero, entre los distintos enfoques que se pueden adoptar para describir la microbiota del suelo, las determinaciones metabólicas informan acerca de las funciones del suelo como, por ejemplo, los ciclos biogeoquímicos (Singh *et al.*, 2014; Kandeler, 2015). Este aspecto cobra importancia ya que en los suelos enmendados, normalmente, se produce un incremento general de la actividad microbiana relacionado con el aumento de la materia orgánica (Singh y Agrawal, 2008; Bran Nogueira Cardoso *et al.*, 2013). Este resultado se repite en diversos trabajos en los que se restauran suelos degradados mediante el uso de enmiendas orgánicas (Ros *et al.*, 2003b; Bastida *et al.*, 2007).

Dentro de las técnicas que evalúan el metabolismo de las poblaciones del suelo, el análisis de los perfiles de metabólicos de consumo de las comunidades microbianas (CLPPs) constituye un método óptimo para describir los cambios metabólicos causados por las perturbaciones en el suelo *natural* o en suelos contaminados con distintos compuestos (Pérez-Piqueres *et al.*, 2006; Garland *et al.*, 2010; Fraç *et al.*, 2012; Bastida *et al.*, 2013; Poulsen *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014). Con esta técnica, se describe cómo es el perfil de consumo de distintos compuestos, el cual es un reflejo de gran parte de la funcionalidad y de la estructura de las poblaciones microbianas del suelo. Entre las metodologías empleadas en la determinación de CLPPs, se encuentra el sistema MicroResp<sup>TM</sup> (Campbell *et al.*, 2003) que se basa en la medición de la respiración inducida en el suelo cuando se añade un sustrato (*substrate induced respiration*, SIR) (Anderson y Domsch, 1978) y permite ensayar muestras de suelo íntegras de una forma eficaz, rápida y económica (Chapman *et al.*, 2007). Ejemplos de ello se encuentran en el análisis del efecto en el suelo de condiciones ambientales como la sequía y climas desérticos (Saul-Tcherkas y Steinberger, 2009; Berard *et al.*, 2012), de los incendios (Campbell *et al.*, 2008; Banning *et al.*, 2012), de la contaminación con diferentes agentes químicos o con metales pesados (Schmidt *et al.*, 2013; Wakelin *et al.*, 2013; Berard *et al.*, 2014), o simplemente tras la aplicación de enmiendas minerales (Currey *et al.*, 2010). En el trabajo original del sistema MicroResp<sup>TM</sup>, donde se ensayan suelos tratados con lodos enriquecidos con diferentes metales pesados, se hallaron perfiles de consumo característicos, lo que demuestra la utilidad de la técnica en suelos enmendados con estos residuos orgánicos (Campbell *et al.*, 2003). Sin embargo, no hay demasiados trabajos que utilicen la metodología de MicroResp<sup>TM</sup> tras la aplicación de enmiendas orgánicas (Berard *et al.*, 2014).

Los compuestos empleados en estas determinaciones se encuentran en la rizosfera (Campbell *et al.*, 1997), y sus tasas de consumo por parte de los microorganismos del suelo, medidas a través de SIR, pueden ser diferentes en función de su naturaleza química (ácido orgánico, azúcar, aminoácido) (van Hees *et al.*, 2005;

Banning *et al.*, 2012), de su complejidad (El Azhari *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2015), o de su concentración en el suelo (Chowdhury *et al.*, 2014). Por lo tanto, el conjunto de alteraciones en el consumo de los diferentes sustratos podría servir como rasgo de identificación de las poblaciones presentes en el suelo (Chen *et al.*, 2008). Por ejemplo, el incremento del consumo de compuestos más fáciles de degradar indicaría la presencia de microorganismos con un metabolismo más oportunista o quizá menos especializado (Fierer *et al.*, 2012a). En cambio, en suelos cuyas poblaciones tengan un metabolismo más especializado, esperaríamos registrar un consumo mayor de los compuestos más recalcitrantes (Pailler *et al.*, 2014). Basándonos en esta hipótesis, en nuestro trabajo hemos pretendido describir el estado metabólico de las poblaciones de suelos tratados con distintas enmiendas orgánicas (químicamente diferentes) a concentraciones elevadas, para ello hemos analizado su perfil de consumo (CLPP) utilizando 14 sustratos diferentes de origen natural, a lo largo de al menos 2 años.

### 3.3 Objetivos específicos

---

- **Determinar los cambios que se producen en los perfiles metabólicos de los suelos tratados con diferentes enmiendas respecto del suelo control y su evolución a lo largo del tiempo.**
- **Indicar la existencia de sustratos o grupos de sustratos cuyo uso pudiera servir para detectar la adición de enmiendas en el suelo.**

## 3.4 Materiales y métodos

En este apartado se repasan detalles generales relativos al diseño experimental (explicados en el Capítulo II) y se explican las particularidades metodológicas de la medición de los perfiles metabólicos.

### 3.4.1 Metodología para la determinación de los perfiles metabólicos

La determinación de los perfiles metabólicos (CLPPs) de las muestras de suelo se realizó mediante el uso del sistema MicroResp™ (Campbell *et al.*, 2003). En este método se determinan las tasas de consumo de un conjunto de sustratos de carbono presentes habitualmente en el suelo (Campbell *et al.*, 1997). La ventaja que aporta esta técnica reside en su eficacia, sencillez, rapidez y bajo coste. Se fundamenta en la respiración, medida en forma de CO<sub>2</sub> emitido, de una parte mayoritaria de los microorganismos del suelo tras la estimulación por medio de sustratos de fácil degradación añadidos en exceso (SIR) (Anderson y Domsch, 1978).

Los suelos analizados se trataron con enmiendas orgánicas, basura compostada (BC), lodo de depuradora obtenido por digestión aerobia (LAE) y lodo de depuradora obtenido por digestión anaerobia (LANAE). También se evaluó un suelo control (S). Las enmiendas fueron aplicadas según se indica en el calendario de la **Tabla 4**. Para mayor información sobre el diseño experimental consultar los apartados 2.4.1 y 2.4.2 correspondientes al diseño experimental (Capítulo II).

Resumen de los muestreos											
Número de muestreo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Suelo S (control)	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Suelos B	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Suelos A			A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Suelos N			N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8
Estación	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P
Año	2009		2010			2011			2012		

**Tabla 4. Resumen de los muestreos para la determinación de los perfiles metabólicos de las poblaciones de cada suelo.**

Las lodos de depuradora (LAE y LANAE) se aplicaron al suelo 6 meses después que la basura compostada (BC). Las letras indican las estaciones del año: otoño (O); invierno (I); primavera (P) y verano (V). Para consultar los datos climatológicos completos véase **ANEXO 1**.

#### 3.4.1.1 Tratamiento de las muestras

Las muestras de suelo fueron procesadas según las recomendaciones del manual de MicroResp™. El procedimiento se describe en el apartado 2.4.3.1

Tratamiento de las muestras para análisis metabólicos (Capítulo II), puesto que este sistema también fue utilizado para la determinación de la respiración basal y la biomasa microbiana.

### 3.4.1.2 Fundamento del sistema MicroResp™

El fundamento del sistema MicroResp™ se explica en el apartado 2.4.3.2 (Capítulo II). En el caso de la determinación de CLPPs se midió la respiración inducida tras el metabolismo de diferentes sustratos de carbono añadidos en exceso a lo largo de 6 horas de incubación (Campbell *et al.*, 2003).

### 3.4.1.3 Preparación de las placas de detección de CO<sub>2</sub>

La solución indicadora, compuesta por rojo de cresol, cloruro de potasio y bicarbonato sódico, se dispensó en caliente a lo largo de una placa multipocillo. Cuando se solidificó, se revisó y se procesó como se explica en el apartado 2.4.3.3 Preparación de las placas de detección de CO<sub>2</sub> (Capítulo II).

### 3.4.1.4 Preparación de las placas de sustratos y distribución

Los 14 sustratos utilizados (**Tabla 5**) se disolvieron en agua ultrapura, a una concentración del 20 %, excepto el ácido protocatéquico que se disolvió en etanol al 50 %, debido a su baja solubilidad (Campbell *et al.*, 1997). Una vez elaboradas, las disoluciones de los sustratos empleados en el ensayo fueron esterilizadas por filtración (0,22 µm, filtros Millipore). Para cada uno de los ensayos, las disoluciones (al 20 %) se diluyeron nuevamente hasta alcanzar una concentración de 30 mg de sustrato por cada gramo de agua que contuviera el suelo a ensayar en un volumen final de 25 µL (el contenido de humedad para cada suelo fue calculado previamente).

Ácidos carboxílicos	Ácidos fenólicos	Azúcares	Aminoácidos
<p>Ácido cítrico Ácido málico Ácido oxálico</p>	<p>Ácido protocatéquico (ácido-3,4-dihidroxibenzoico)</p>	<p>L(+)-arabinosa D(+)-glucosa D(+)-galactosa D(-)-fructosa D(+)-trehalosa N-acetilglucosamina (NAG)</p>	<p>L-alanina L-arginina L-lisina GABA</p>

**Tabla 5. Sustratos utilizados en las determinaciones de CLPPs con Microresp™.**  
En amarillo los ácidos orgánicos, en azul los azúcares y en verde los aminoácidos.

El juego de 16 sustratos (14, más 2 controles de agua y agua/etanol) se dispensó cada dos columnas de 8 pocillos en volúmenes de 25  $\mu$ L (**Tabla 6**), por lo que se realizaron un total de 6 réplicas del conjunto de sustratos por cada placa de 96 pocillos. Las placas multipocillo contenían un volumen de 2 mL por pocillo (Nunc™ U96 PP 2 mL; *Deepwell Natural*) y fueron esterilizadas por autoclave antes de su utilización.

Lisina	Agua
NAG	Ácido cítrico
Trehalosa	Arginina
Ácido málico	Ácido oxálico
Galactosa	Alanina
Arabinosa	GABA
Fructosa	Ácido protocatéuico
Glucosa	Agua/etanol 50%

**Tabla 6. Distribución de los sustratos en la placa de ensayo.**

El juego de 16 sustratos se replicó hasta completarse la placa de incubación completa de 96, es decir, 6 veces.

### 3.4.2 Medición de los CLPPs del suelo

En primer lugar, la placa de sustratos se rellenó con las muestras de suelo con ayuda del dispensador de carga (incluido en el kit) como se indica en el manual de instrucciones del dispositivo (Campbell *et al.*, 2006). La masa de suelo cargado se estimó por diferencia y se calculó la masa media por pocillo (96). Una vez medida la absorbancia de la placa indicadora al inicio del experimento ( $A_{t(0h)}$ ), se procedió al cierre del sistema MicroResp™ con la junta de goma y los pestillos de seguridad (**Figura 9**). El sistema completo se incubó en una estufa con temperatura constante de 24 °C durante 6 horas. Posteriormente, se midió la absorbancia final ( $A_{t(6h)}$ ). La variación de la densidad óptica medida a 595 nm tras 6 horas de incubación fue proporcional a la cantidad de CO<sub>2</sub> emitida tras el consumo de cada sustrato.

### 3.4.3 Terminología utilizada para el análisis CLPPs

**Alteración, cambio o diferencia:** cuando la tasa de consumo de algún sustrato, por parte de las poblaciones del suelo tratado (B, A o N), muestra un valor que difiere de forma estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) con respecto al valor de la tasa del mismo sustrato en el suelo control (S). Las alteraciones pueden tener dos **tendencias**: **Incrementada**, cuando el valor de la tasa en el suelo tratado supera a la del suelo control, e **inhibida** cuando se encuentra por debajo. En referencia al momento en el que se manifiesta dicha alteración, ésta puede ser **temprana** si lo hace dentro de los primeros 4 muestreos (primer año) y **tardía** si se manifiesta posteriormente. Esta clasificación temporal se basó en el análisis realizado a distintos niveles taxonómicos (Capítulo IV), donde se observó que los cambios registrados en los primeros 4 muestreos (muestreos del 0 al 3) son los más importantes, dado que a partir del cuarto muestreo se produce una inflexión en el número de cambios totales en las clases bacterianas (las cuales constituyen un nivel taxonómico suficientemente sensible a los cambios, como se comprueba en gran parte de los estudios taxonómicos publicados).

Una razón adicional es que con estos 4 muestreos se cumple un año desde la aplicación de la enmienda (un ciclo hidrológico con sus 4 estaciones climáticas).

### 3.4.4 Tratamiento de los datos del sistema MicroResp™

Los datos de las absorbancias de la placa indicadora obtenidas al inicio (0 horas) y al finalizar el tiempo de incubación (6 horas) fueron procesados como se indica el manual de Microresp™ (Campbell *et al.*, 2006) (**Expresión 3**).

#### 1. Estandarización.

$$A_{t(6h) \text{ estand.}} = (A_{t(6h)} / A_{t(0h)}) \times (\text{promedio } A_{t(0h)})$$

$$A_{t(0h) \text{ estand.}} = (A_{t(0h)} / A_{t(0h)}) \times (\text{promedio } A_{t(0h)})$$

$A_{t(0h) \text{ estand.}}$ : Lectura de la absorbancia del pocillo a  $t=0$  h.

$A_{t(6h) \text{ estand.}}$ : Lectura de la absorbancia del pocillo al finalizar la incubación  $t=6$ h.

#### 2. Transformación de la absorbancia en %CO<sub>2</sub> emitido

$$\%CO_{2(i)} = 0,0992 + (25,49 \times (4,24 \times 10^{-6})^{A_i})$$

Donde  $A_i$  puede ser:  $A_{t(0h) \text{ estand.}}$  o  $A_{t(6h) \text{ estand.}}$

#### 3. Transformación de % CO<sub>2</sub> en tasa de producción de CO<sub>2</sub>

$$\left( \frac{(\% CO_2 \text{ 6 h} - \% CO_2 \text{ 0 h})}{100} \times 950 \times \left(\frac{44}{22,4}\right) \times \left(\frac{12}{44}\right) \right) / 6h$$

( peso suelo por pocillo x (% peso seco/100) ) / 6h

---

**Expresión 3. Estandarización (1), transformación de las medidas de absorbancia (2). Transformación del % CO<sub>2</sub> en tasa de producción de CO<sub>2</sub> (µg CO<sub>2</sub>-C g suelo<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (3).**

---

### 3.4.5 Tratamientos estadísticos

Los procedimientos estadísticos del análisis se detallan en el apartado 2.4.7 Tratamientos estadísticos (Capítulo II). Las matrices de correlación se encuentran en el **ANEXO 4 (Tabla 59)**.



## 3.5 Resultados

---

En primer lugar, se presenta la variación general de los consumos en los suelos tratados con respecto al suelo control. A continuación, se muestran los perfiles metabólicos de forma cualitativa. Para la consulta de los resultados cuantitativos véanse las tablas del **ANEXO 2**.

### 3.5.1 ¿Cuál fue la variación general de los perfiles metabólicos?

Siguiendo el protocolo de la técnica MicroResp<sup>TM</sup> para medir CLPPs, se procedió a la determinación de las tasas de respiración de los distintos sustratos en los muestreos del suelo control (S) y en los de los suelos tratados (suelos B, A y N). A partir de las tasas de consumo de los diferentes sustratos se calculó qué porcentaje del total representó el consumo de cada sustrato en cada suelo a lo largo de todos los muestreos realizados obteniéndose, de esta manera, los perfiles porcentuales.

En la **Tabla 50**, **Tabla 51** y **Tabla 52** del **ANEXO 2** se presentan de forma detallada las tasas porcentuales de consumo de cada parcela tratada comparadas con el consumo en el suelo control a lo largo de todo el análisis. A partir de esas tasas porcentuales de consumo de cada uno de los muestreos (**ANEXO 2**), se calcularon las tasas porcentuales medias de los suelos tratados (B, A y N) y las del suelo control (S). A continuación, se obtuvo la variación porcentual (ratio %) de los valores de las tasas de consumos de los suelos tratados respecto del suelo control, con el fin de estimar cuál fue la variación global del consumo de cada sustrato en cada suelo enmendado. Con estos resultados se obtuvo una valoración general de la variación de las tasas de consumo en los distintos suelos (**Tabla 7**).

Como se puede observar en la **Tabla 7**, el consumo relativo medio de los ácidos orgánicos sufrió un descenso generalizado en los tres suelos enmendados con los distintos residuos orgánicos (diferencias negativas en color azul). Por el contrario, los consumos de los azúcares y de los aminoácidos se incrementaron en general en los suelos tratados (diferencias positivas en color rojo). Se puede destacar que el consumo del ácido málico disminuyó de forma más notable que el de los otros ácidos en los tres tipos de suelos enmendados. En el otro extremo, dentro del grupo de los azúcares, el consumo de la glucosa fue el que mayor incremento sufrió y, dentro de los aminoácidos, correspondió al consumo de la arginina.

Con estos resultados también se obtiene un dato importante en términos de diversidad funcional ya que se observa la compensación de la participación de los sustratos a lo largo del perfil de consumo, es decir, que los sustratos cuyo consumo aportaba un menor porcentaje de participación, como los azúcares y aminoácidos, ahora lo hace de forma más intensa, y viceversa. Por tanto, se podría decir que la diversidad funcional de los suelos tratados se incrementó, ya que el reparto de los consumos fue más equitativo.

Suelo tratado con BC				Suelo tratado con LAE				Suelo tratado con LANAE			
sustrato	S	B	ratio %	sustrato	S	A	ratio %	sustrato	S	N	ratio %
Á.Cít	14,06	9,00	-36,0	Á.Cít	15,12	10,80	-28,6	Á.Cít	15,12	10,97	-27,5
Á.Mál	19,77	10,05	-49,1	Á.Mál	20,43	12,93	-36,7	Á.Mál	20,43	10,30	-49,6
Á.Oxá	13,19	9,36	-29,1	Á.Oxá	12,85	8,78	-31,7	Á.Oxá	12,85	8,26	-35,7
Á.Pro	11,40	6,32	-44,5	Á.Pro	9,40	7,61	-19,0	Á.Pro	9,40	6,86	-27,0
Ala	5,63	7,41	31,6	Ala	5,61	6,71	19,6	Ala	5,61	7,62	36,0
Arg	2,92	5,94	103,2	Arg	3,02	3,79	25,5	Arg	3,02	6,27	107,4
GABA	3,59	4,83	34,5	GABA	3,87	5,78	49,4	GABA	3,87	3,55	-8,3
Lys	1,93	2,95	53,1	Lys	2,09	2,86	36,8	Lys	2,09	2,72	30,0
Ara	4,05	6,72	65,9	Ara	4,31	5,88	36,4	Ara	4,31	4,68	8,5
Fru	4,88	6,14	25,8	Fru	4,93	6,31	27,9	Fru	4,93	6,57	33,2
Gal	6,69	7,70	15,2	Gal	7,05	7,59	7,7	Gal	7,05	7,84	11,2
Glu	4,16	8,03	93,0	Glu	4,11	7,68	86,8	Glu	4,11	7,83	90,3
NAG	5,41	6,48	19,7	NAG	5,49	5,48	-0,3	NAG	5,49	7,49	36,3
Treh	7,02	9,06	29,1	Treh	7,42	7,80	5,1	Treh	7,42	9,05	21,9

**Tabla 7. Variación de las tasas de consumo relativas de los suelos enmendados.**

Tasas porcentuales del consumo medio de los muestreos de suelo control (S) y de los suelos tratados (S-B, n=11; S-A, n=9; S-N, n=9). La columna "ratio %" muestra la variación porcentual del suelo enmendado respecto del suelo control. Las variaciones negativas se muestran en azul, las variaciones cercanas a cero en blanco y las variaciones positivas en rojo.

Por otra parte, algunos sustratos sufrieron variaciones más moderadas, por debajo del 10 %, como, por ejemplo, el consumo promedio de NAG (-0,3 %), trehalosa (5,1 %) y galactosa (7,7 %), tras la aplicación de LAE en el suelo, y para los sustratos GABA (-8,3 %) y arabinosa (8,5 %) en el caso del suelo N.

### 3.5.2 Análisis del perfil metabólico del suelo B

Los perfiles metabólicos de las poblaciones del suelo sufrieron alteraciones cuando se añadió la basura compostada (BC). En la **Tabla 8** se observa de forma resumida que las tasas de consumo de todos los sustratos mostraron diferencias significativas con las del suelo control en algún muestreo. Como ya se ha indicado previamente, de forma general se aprecia que las tasas de los ácidos orgánicos disminuyeron, mientras que las de los azúcares y aminoácidos se incrementaron, a excepción del descenso detectado para los consumos de NAG y de lisina. También se puede observar que la alteración de los perfiles metabólicos persistió hasta los últimos muestreos, dos años después.

Atendiendo al número de muestreos en los que se observó la alteración de la tasa de consumo de algún sustrato, con respecto de la del suelo control, los sustratos que sufrieron más variaciones significativas fueron la glucosa (con alteraciones en 10 de 11 muestreos), el ácido málico (8), seguido de los ácidos cítrico (7) y protocatéquico (7). Por el contrario, los consumos de GABA (3) y galactosa (3) fueron los que menos cambios mostraron a lo largo de todo el análisis (**Tabla 8**).

Sustrato	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	
Á. cítrico			↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓		7
Á. málico	↓	↓	↓		↓	↓	↓		↓	↓		8
Á. oxálico	↓					↓	↓			↓		4
Á. protocatéquico	↓	↓	↓		↓	↓				↓	↓	7
Alanina	↑			↑		↑				↑		4
Arginina	↑					↑	↑			↑		4
GABA		↑				↑		↓				3
Lisina		↓	↓	↓	↓				↑	↑		6
Arabinosa	↑	↑	↑			↑			↑	↑		6
Fructosa	↑		↑	↑	↑		↑				↓	6
Galactosa		↑			↑					↑		3
Glucosa	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑		↓	10
NAG					↓	↓	↑		↑		↑	5
Trehalosa	↑	↑					↑			↑	↑	5
	9	8	7	5	8	10	8	3	5	10	5	
	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 8. Alteraciones de las tasas metabólicas en el suelo B a lo largo de los muestreos.**

Las flechas indican las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las tasas porcentuales de consumo de los distintos sustratos del suelo tratado (B) respecto del suelo control, para cada uno de los muestreos (de B0 a B10). La diferencia positiva se indica con una flecha hacia arriba y la negativa se indica con una flecha hacia abajo (en función de si se incrementa o se inhibe el consumo con respecto al control). En la columna con valores numéricos y en la fila inferior se indica el número total de alteraciones detectadas en cada sustrato o muestreo, respectivamente. Estaciones del año: otoño (O); invierno (I); primavera (P); verano (V).

Desde el punto de vista de los muestreos que presentaron un mayor o menor número de sustratos con alteraciones, los muestreos B5 y B9 (con 10 alteraciones, ambos en invierno) y el muestreo B0 (con 9, en otoño), fueron los muestreos que exhibieron un mayor número de cambios en sus perfiles de consumo. En cambio, en los muestreos correspondientes a los meses de verano B3 y B7 se detectaron el menor número de alteraciones (5 y 3, respectivamente). Por tanto, se aprecia que en los primeros muestreos existe un elevado número de alteraciones, posiblemente debido al efecto de las enmiendas recién aplicadas, y que a partir del primer verano (B3) se puede comprobar que, por lo general, en los meses más fríos se observa un incremento del número de alteraciones, mientras que en los meses más calurosos se aprecia un descenso.

Excepto para el consumo de NAG, cuya alteración se detectó después de un año desde la aplicación de BC (**Tabla 9**), todas las tasas de consumo mostraron alteraciones que se detectaron dentro de los primeros cuatro muestreos (primer año) y por tanto se consideraron alteraciones *tempranas* (concepto explicado en el apartado 3.4.3).

Para estimar la influencia de los factores sobre las tasas de consumo se realizó un ANOVA de dos factores, *tratamiento* y *muestreo*. El factor *tratamiento* se estudió a lo largo de 2 niveles, suelo sin tratar (S) y suelo enmendado (B), y el factor *muestreo* con un total de 11 niveles (desde el muestreo 0 hasta el 10). Los resultados del ANOVA (integrados en la **Tabla 9**) indican que las diferencias de las tasas relativas de consumo se podrían explicar por la combinación de ambos factores debido a que en la mayor parte de los análisis existía una interacción significativa entre ellos. No obstante, a pesar de la interacción significativa existente entre los factores (*tratamiento* y *muestreo*), y con el objetivo de conocer cuál de los dos factores tuvo más peso, se utilizó la proporción de la varianza que explicó cada uno de ellos por separado, señalándose cuando ésta fue mayor por parte del factor *tratamiento*.

De esta manera, como se puede observar en la **Tabla 9**, las tasas de la mitad de los sustratos (un total de 7) debieron principalmente su comportamiento a una mayor influencia del factor *tratamiento*, al menos en los dos primeros muestreos. Se podría destacar que el incremento del consumo de arginina se pudo explicar por la influencia *exclusiva* del factor *tratamiento*, ya que no existió interacción entre los factores analizados. Por otro lado, los consumos de algunos sustratos, como los de la alanina y la trehalosa, tuvieron una influencia marcada principalmente por el factor *tratamiento* durante un mayor periodo de tiempo (hasta el cuarto muestreo) y los valores de consumo del ácido málico tuvieron una influencia del factor *tratamiento* a lo largo de todo el análisis (11 muestreos). Sin embargo, las tasas metabólicas de la otra mitad de los sustratos tuvieron una influencia marcada principalmente por parte del factor *muestreo*, es decir, marcada fundamentalmente por la influencia de otros aspectos, como los climáticos y edáficos, entre otros.

Sustrato	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	
Á. málico	↓	↓	↓		↓	↓	↓		↓	↓		8
Á. oxálico	↓					↓	↓			↓		4
Á. protocatéquico	↓	↓	↓		↓	↓				↓	↓	7
Alanina	↑			↑		↑				↑		4
Arginina	↑					↑	↑			↑		4
Arabinosa	↑	↑	↑			↑			↑	↑		6
Fructosa	↑		↑	↑	↑		↑				↓	6
Glucosa	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑		↓	10
Trehalosa	↑	↑					↑			↑	↑	5
Lisina		↓	↓	↓	↓				↑	↑		6
GABA		↑				↑		↓				3
Galactosa		↑			↑					↑		3
Á. cítrico			↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓		7
	9	8	7	5	7	9	7	3	4	10	4	
	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 9. Influencia de los factores sobre las alteraciones tempranas de las tasas metabólicas a lo largo de los muestreos en el suelo B.**

Se muestran las alteraciones que fueron *tempranas*. Los muestreos sombreados indican que el factor *tratamiento* explicó una parte mayor de la varianza. Las celdas bordeadas de forma más intensa indican los muestreos en donde no hubo interacción significativa entre los factores. Las flechas indican las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las tasas porcentuales de consumo de los distintos sustratos del suelo tratado (B) respecto del control, para cada uno de los muestreos (de B0 a B10). La diferencia positiva se indica con una flecha hacia arriba y la negativa se indica con una flecha hacia abajo (en función de si se incrementa o se inhibe el consumo con respecto al control). En la columna con valores numéricos y en la fila inferior se indican el número total de alteraciones detectadas en cada sustrato o muestreo, respectivamente. Estaciones del año: otoño (O); invierno (I); primavera (P) y verano (V).

### 3.5.3 Análisis del perfil metabólico del suelo A

En el suelo A, al igual que en el suelo B, se observó un resultado similar para algunos sustratos. Así, en general, se aprecia un descenso del consumo de los ácidos orgánicos y un incremento del consumo de los azúcares y de los aminoácidos excepto para la arginina y la lisina, que disminuyeron. El resultado de la lisina también coincidió con el detectado en el suelo B (**Tabla 10**).

Sustrato	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	
Á. málico	↓			↓	↓		↓	↓	↓	6
Á. oxálico	↓				↓	↓				3
Á. protocatéquico	↓	↑		↓	↑		↓		↓	6
Á. cítrico	↓			↑		↓		↓		4
Alanina	↑		↓	↑				↑		4
GABA	↑					↓		↑	↑	4
Lisina		↓	↓	↑					↑	4
Arginina		↓		↑		↑				3
Glucosa	↑		↑				↑	↑		4
Fructosa	↑				↑				↓	3
Trehalosa	↑					↑		↓		3
Arabinosa	↑									1
NAG					↑					1
Galactosa									↑	1
	10	3	3	6	5	5	3	6	6	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 10. Alteraciones de las tasas metabólicas a lo largo de los muestreos en el suelo A.**  
La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 8**.

En el suelo A el consumo de los ácidos orgánicos fue diferente al del suelo control en un mayor número de muestreos, en comparación con otro tipo de sustratos. En concreto, los consumos de los ácidos málico y protocatéquico mostraron diferencias en un mayor número de muestreos (ambos con 6 muestreos con alteraciones), mientras que los azúcares arabinosa, NAG y galactosa, fueron los que menos (únicamente un solo muestreo) (**Tabla 10**).

En el primer muestreo, una semana después de aplicarse LAE (muestreo A0), se describieron un total de 10 alteraciones en el perfil de consumo del suelo A. En el resto de los muestreos se apreció un número menor de sustratos cuyo consumo se encontró alterado, disminuyendo de forma general especialmente en los muestreos de verano-otoño (**Tabla 10**).

Al igual que en el suelo B, se detectó que la alteración del consumo de NAG también mostró un carácter *tardío* ya que se detectó en el quinto muestreo (A4). Algo parecido sucedió con el consumo de la galactosa. De esta manera, a excepción de los consumos de NAG y galactosa, la totalidad de los consumos de los sustratos mostraron alteraciones *tempranas*, como se indica en la **Tabla 11**.

Desde el punto de vista de la influencia de los factores (*tratamiento* y *muestreo*), se observó que las tasas de consumo del ácido cítrico, glucosa, fructosa y lisina estuvieron influenciadas principalmente por el factor *tratamiento*, que explica una mayor parte de la varianza, y solamente durante los dos primeros muestreos del análisis. Aunque se puede matizar que la influencia del factor *tratamiento* sobre el del consumo de fructosa y lisina no mostró interacción significativa con el factor *muestreo*, el consumo del resto de los sustratos estuvo influido de forma más predominante por el factor *muestreo* (Tabla 11).

Sustrato	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	
Á. málico	↓			↓	↓		↓	↓	↓	6
Á. oxálico	↓				↓	↓				3
Á. protocatéquico	↓	↑		↓	↑		↓		↓	6
Á. cítrico	↓			↑			↓		↓	4
Glucosa	↑		↑				↑	↑		4
Fructosa	↑				↑				↓	3
Trehalosa	↑					↑		↓		3
Arabinosa	↑									1
Alanina	↑		↓	↑				↑		4
GABA	↑					↓		↑	↑	4
Lisina		↓	↓	↑					↑	4
Arginina		↓		↑		↑				3
	10	3	3	6	4	5	3	6	5	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 11.** Influencia de los factores sobre las alteraciones tempranas de las tasas metabólicas a lo largo de los muestreos en el suelo A. La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la Tabla 9.

Bajo este análisis no se observó una gran influencia por parte de la enmienda en el suelo, ya que el factor *tratamiento* solo influyó de manera significativa en el consumo de unos pocos sustratos, y solamente en los muestreos iniciales. En este sentido, un total de 10 sustratos mostraron alteraciones en el primer muestreo (A0), lo que indica que al comienzo el número de cambios fue muy sobresaliente.

### 3.5.4 Análisis del perfil metabólico del suelo N

La aplicación de LANAE en el suelo también causó un efecto similar al de las otras enmiendas, apreciándose un descenso generalizado de las tasas relativas de consumo de los ácidos orgánicos. Por otra parte, el consumo de todos los aminoácidos y azúcares, excepto la galactosa y la trehalosa, sufrió un incremento significativo en el primero de los muestreos (**Tabla 12**). Por lo que se puede comprobar, como en el suelo A, que en el primer muestreo el número de alteraciones fue elevado, posiblemente por el efecto reciente de la presencia de las enmiendas aplicadas.

Sustrato	N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	
Á. cítrico	↓	↓			↓			↓		4
Á. málico	↓		↓		↓	↓		↓	↓	6
Á. oxálico	↓				↓	↓			↓	4
Á. protocatéquico	↓			↓					↓	3
Alanina	↑	↑		↑	↑	↑		↑		6
Arginina	↑		↓	↑		↑	↓		↑	6
GABA	↑			↑						2
Lisina	↑	↑		↑					↑	4
Arabinosa	↑		↓							2
Fructosa	↑				↑					2
Galactosa					↑			↑		2
Glucosa	↑	↓	↑	↑		↑	↑			6
NAG	↑	↑	↓					↑	↑	5
Trehalosa		↑						↑		2
	12	6	5	6	6	5	2	6	6	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 12.** Alteraciones de las tasas metabólicas a lo largo de los muestreos en el suelo N.

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 8**.

Las tasas de consumo del ácido málico, la alanina, la arginina y la glucosa fueron las que se detectaron alteradas en un mayor número de muestreos (en 6 muestreos). Por el contrario, las alteraciones de las tasas de consumo del GABA, la alanina, la fructosa, la galactosa y la trehalosa, fueron las que se registraron en un menor número de muestreos (2).

Por otro lado, el primero de los muestreos N0 (con 12 sustratos con alteraciones, en primavera) y N6 (con 2 alteraciones, en otoño) fueron los muestreos que mayor y menor número de tasas con alteración mostraron, respectivamente. Al final del análisis (N8) el número de sustratos con alteraciones se mantuvo con 6.

A excepción del consumo de la galactosa, cuya alteración significativa se registró en el muestreo N4 (un año después de la adición de LANAE), el resto de las alteraciones se consideraron *tempranas* en el tiempo (**Tabla 13**). De hecho, los consumos de 12 de los 14 sustratos utilizados tuvieron alteraciones significativas en el primero de los muestreos (N0), lo que vuelve a evidenciar la influencia de la enmienda en los primeros muestreos.

Sustrato	N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	
Á. oxálico	↓				↓	↓			↓	4
Á. protocatéquico	↓			↓					↓	3
Á. cítrico	↓	↓			↓			↓		4
Á. málico	↓		↓		↓	↓		↓	↓	6
Glucosa	↑	↓	↑	↑		↑	↑			6
Fructosa	↑				↑					2
Arabinosa	↑		↓							2
NAG	↑	↑	↓					↑	↑	5
Arginina	↑		↓	↑		↑	↓		↑	6
Lisina	↑	↑		↑					↑	4
Alanina	↑	↑		↑	↑	↑		↑		6
GABA	↑			↑						2
Trehalosa		↑						↑		2
	12	6	5	6	5	5	2	5	6	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 13.** Influencia de los factores sobre las alteraciones tempranas de las tasas metabólicas a lo largo de los muestreos en el suelo N.

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 9**.

En la **Tabla 13** se puede observar que 6 de los 13 sustratos que mostraron alteraciones *tempranas*, debieron sus variaciones principalmente al factor *tratamiento*. A pesar de ello, la influencia del factor *tratamiento* parece tener una implicación relativamente corta en el tiempo, ya que su influencia no predominó después de los primeros dos muestreos. El incremento *temprano* de la tasa de consumo de NAG estuvo influido predominantemente por el factor *tratamiento* ya que no se hallaron interacciones significativas.

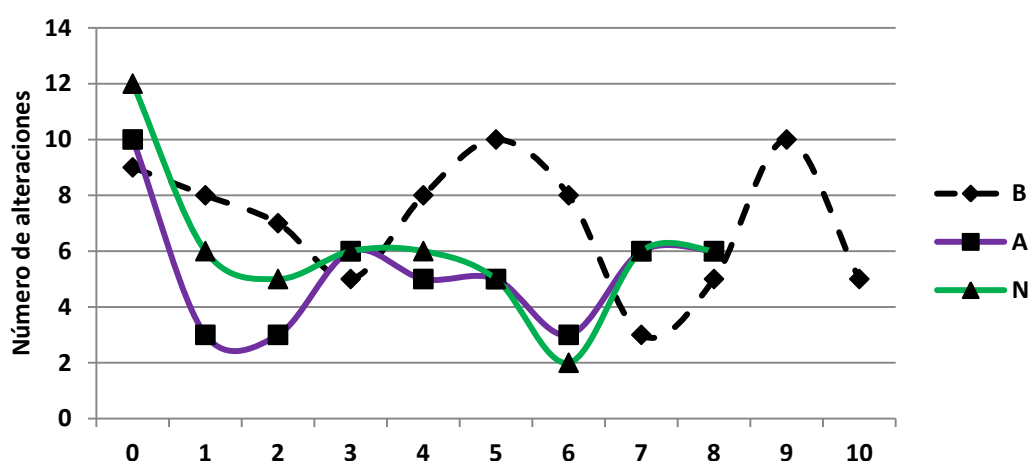
Tras el análisis de los perfiles metabólicos de los tres suelos enmendados se puede destacar que las tendencias de los sustratos se correspondieron en general con las extraídas en el primer apartado de los resultados (**Tabla 7**). No obstante, existieron excepciones a esta norma especialmente en el comportamiento de los aminoácidos en los suelos B y A, donde se observaron algunos resultados que mostraron que la participación del consumo de algunos aminoácidos disminuyó con respecto al suelo control. También se pudo destacar que la influencia del factor *muestreo* fue menos duradera en los suelos A y N (enmendados en primavera) que en los suelos B (enmendados en invierno). Este resultado podría relacionarse con la influencia de la temperatura, la cual es superior de media en los muestreos de primavera, por lo que podría tener sentido que la influencia del *tratamiento* se viese eclipsada por una creciente influencia del factor *muestreo*.

### 3.5.5 Evolución de los perfiles metabólicos de los suelos enmendados

#### 3.5.5.1 ¿Disminuyó el efecto de las enmiendas a lo largo del análisis?

En el primer muestreo tras la aplicación de cada una de las enmiendas, los suelos A y N registraron el mayor número de alteraciones significativas en el perfil metabólico (**Figura 19**). Por el contrario, las alteraciones del suelo B alcanzaron su mayor valor en los muestreos 5-I y 10-P. Los lodos ejercieron un efecto más marcado durante el primer año, oscilando entre 10 y 12 alteraciones, disminuyendo en el segundo año mostrando entre 2 y 6 alteraciones.

Además, los suelos A y N mostraron una evolución de las alteraciones muy similar entre sí. En cambio, en los suelos B se registró un número de alteraciones moderado en los primeros muestreos (del 0-O al 3-V), entre 5 y 9 alteraciones, manifestándose cambios más bruscos durante el segundo año, entre 3 y 10 alteraciones.



**Figura 19. Evolución del número de alteraciones significativas de los CLPPs con respecto al suelo control independientemente del momento de la aplicación de las enmiendas.**

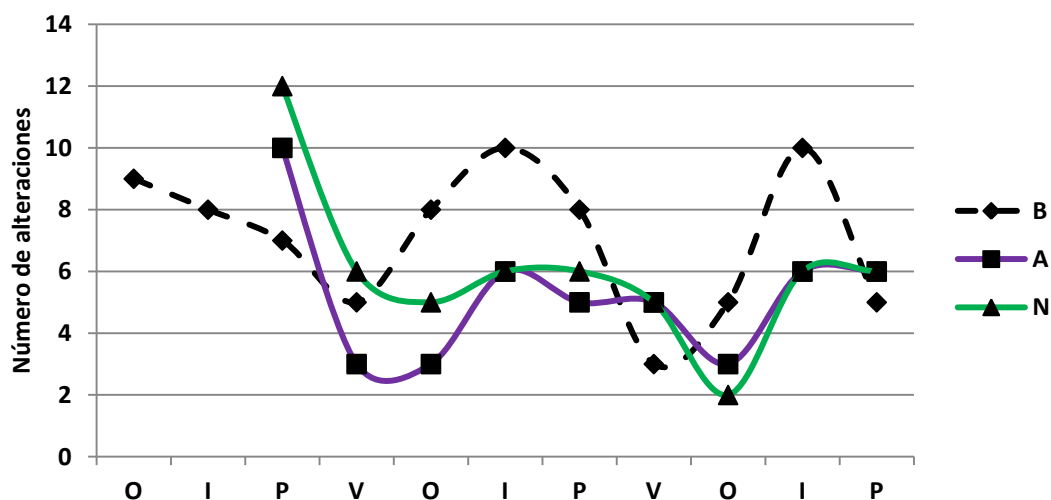
Número de alteraciones registradas en los perfiles metabólicos. En el eje de abscisas se representa el número de muestreo tomando como inicio la aplicación de BC.

Dos años después del comienzo del ensayo (muestreo 8, **Figura 19**) se puede comprobar que el número de alteraciones en los perfiles de suelos tratados fue entre 5 y 6, lo que indica que todavía existieron diferencias significativas en todos los tratamientos respecto del suelo control. Por lo tanto, con estos resultados no se puede decir de forma clara que el efecto de las alteraciones verdaderamente disminuyó.

### 3.5.5.2 ¿Existe un componente estacional en el número de alteraciones por muestreo?

En la **Figura 20** se puede apreciar un efecto estacional ya que durante los meses más fríos (muestreos de invierno) se observó un incremento generalizado del número de alteraciones, mientras que en los meses más calurosos (verano-otoño) sucedió el efecto contrario. De forma más detallada, se puede matizar que los muestreos correspondientes a los meses otoñales en los suelos A y N fueron los que menor número de alteraciones presentaron, mientras que en el suelo B correspondieron a los meses de verano. Por regla general, el mayor número de alteraciones se observó en los muestreos correspondientes a los meses de invierno.

La correlación positiva entre el número de alteraciones, por una parte, con la humedad del suelo ( $r=0,65$ ;  $P<0,001$ ) y, por otra parte, con los eventos de precipitación ( $r=0,49$ ;  $P<0,01$ ) permitirían explicar que la presencia de agua en el suelo contribuye a las variaciones de los perfiles metabólicos. Por el contrario, la ausencia de agua, junto con el incremento de la temperatura que se registra en algunos muestreos (veranos), propiciaría un menor número de alteraciones significativas entre los perfiles metabólicos de los suelos tratados y el control. Apoyando esta idea, la correlación entre el número de alteraciones y la temperatura fue también significativa, pero obviamente inversa ( $r=-0,44$ ;  $P<0,05$ ).



**Figura 20.** Evolución del número de alteraciones significativas de los CLPPs con respecto al suelo control considerando el momento de la aplicación de las enmiendas.

Número de alteraciones registradas en los perfiles metabólicos a lo largo del tiempo de análisis. Estaciones del año: Otoño (O); invierno (I); primavera (P) y verano (V).

### ***3.5.5.3 ¿Qué influencia mostró la biomasa microbiana sobre las alteraciones de los perfiles metabólicos?***

El incremento de la biomasa microbiana que se produce por la adición de las enmiendas (evaluado en el capítulo II) podría ser la razón que explicara el incremento del consumo de determinados sustratos. Por esa razón, estandarizamos su consumo respecto de la biomasa calculada en cada uno de los muestreos para cada suelo tratado ( $qCO_2 \text{ sustrato} = \text{tasa}_{\text{sustrato}} / \text{biomasa}_{\text{muestra}}$ ). Posteriormente, este valor se relativizó con respecto al del suelo control. Así, el análisis de las ratios del consumo de los distintos sustratos por unidad de biomasa entre el suelo tratado y el suelo control ( $qCO_2 \text{ suelo tratado} / qCO_2 \text{ suelo control}$ ) nos permitió determinar qué sustratos o conjunto de sustratos se metabolizaron de forma más eficiente por unidad de biomasa en cada suelo tratado (**Figura 21**). En la mayor parte de los muestreos los  $qCO_2$  del suelo control fueron superiores a los de los suelos tratados (en las gráficas se representan con valores menores de 1), excepto para los primeros muestreos del suelo B (0, 1 y 2). Este resultado se podría explicar debido a los valores tan elevados de biomasa microbiana promovidos por la adición de las enmiendas que, por regla general, dieron lugar a que sus cocientes metabólicos fueran mucho menores que los del suelo control. Sin embargo, este punto de vista (**Figura 21**) es una herramienta útil para estudiar los perfiles ya que a partir de él se puede decir que la relativización de la biomasa hace despuntar las tasas de consumo que fueron especialmente elevadas en los suelos tratados, independientemente del crecimiento de la biomasa.

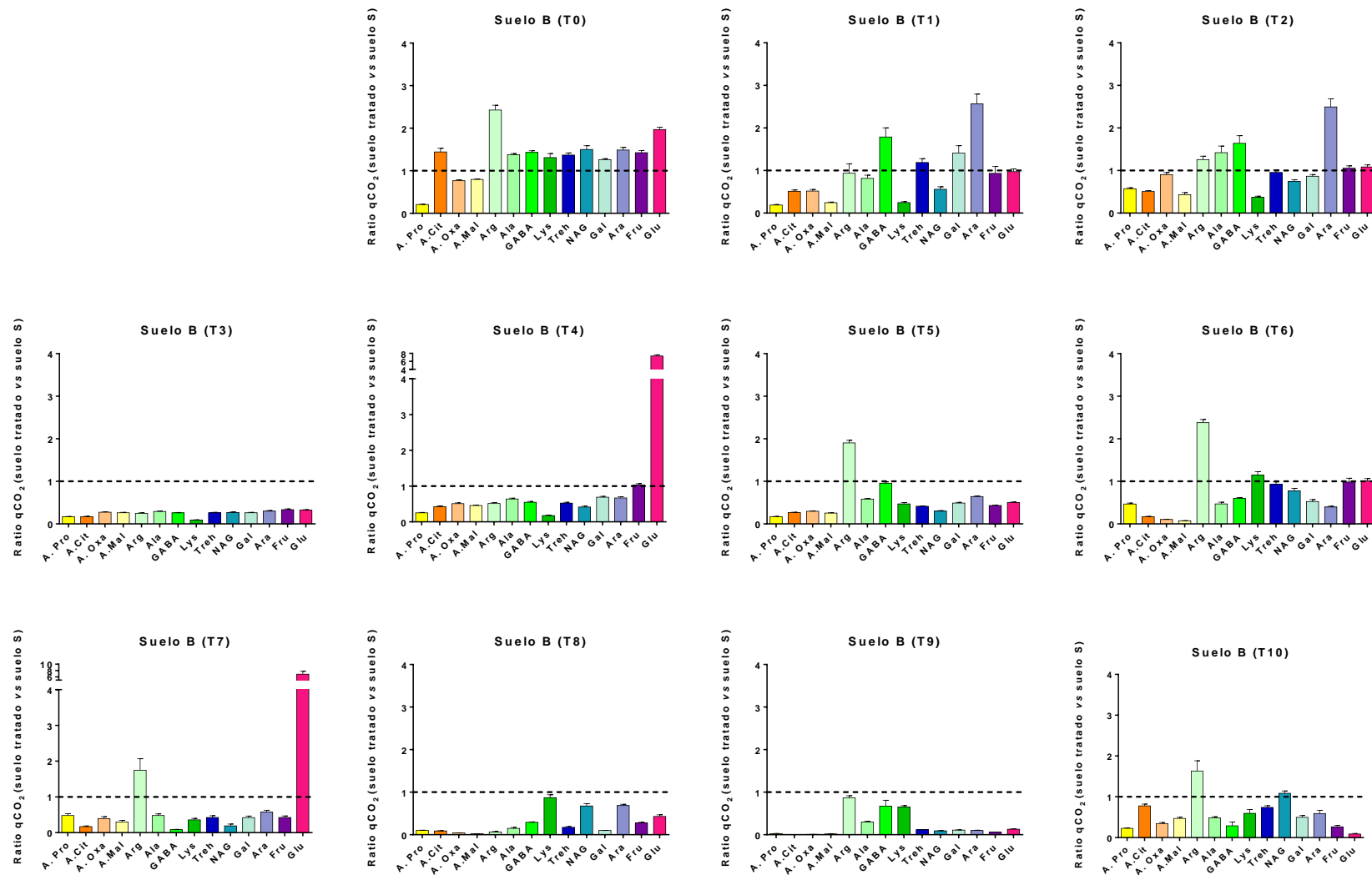
De esta forma se pudo observar que, durante los primeros muestreos, los perfiles metabólicos de los suelos A y N fueron mucho menos diversos que los del suelo control y el suelo B, puesto que en los primeros suelos se observó una disminución notable del número de sustratos que fueron metabolizados al menos en igual cuantía que en el suelo control. Dicho de otra manera, solamente el suelo B exhibió un mayor número de sustratos con un  $qCO_2$  superior al del suelo control durante los primeros muestreos (0, 1 y 2), en comparación con el resto de suelos tratados (**Figura 21**). Este resultado significa que los cambios funcionales del suelo B condujeron hacia un patrón de consumo más eficiente que en el suelo control y más diverso en comparación con los otros suelos enmendados, al menos en los primeros muestreos del suelo B.

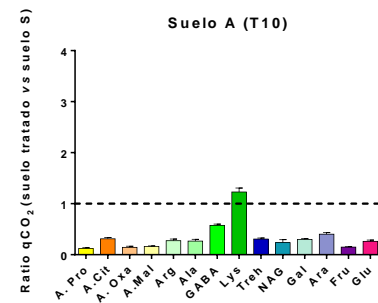
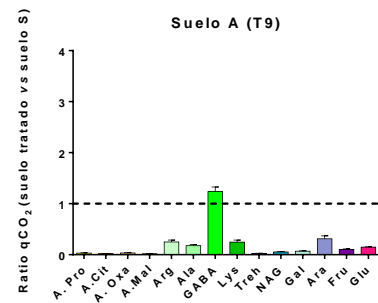
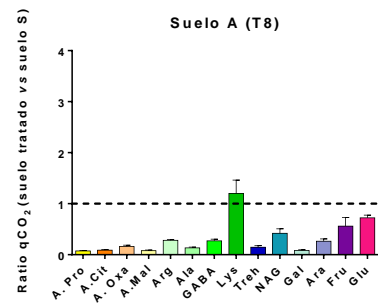
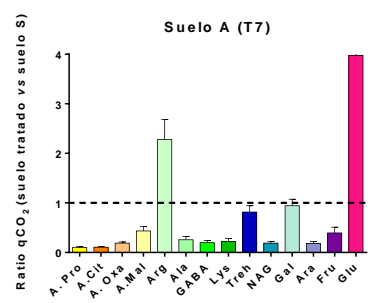
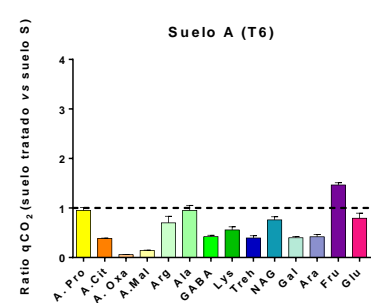
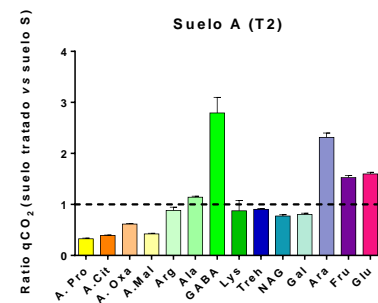
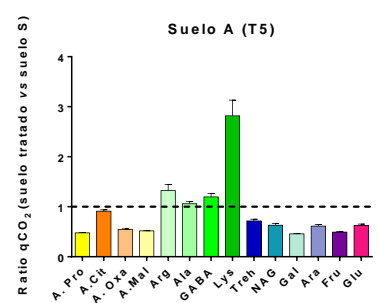
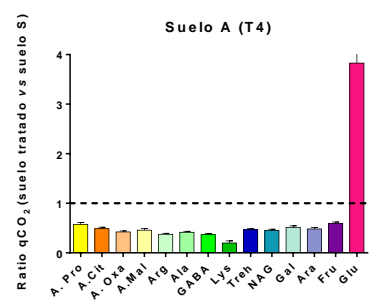
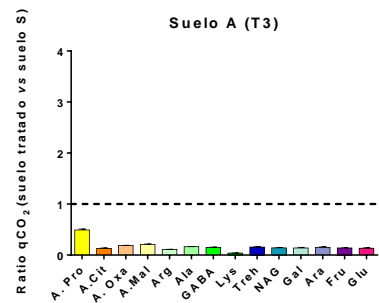
También se pudieron observar algunos comportamientos destacables. Por ejemplo, el consumo de la glucosa y, especialmente, de la arginina estuvo incrementado en varios de los perfiles de los distintos muestreos. El incremento del consumo de este tipo de sustratos se encontraría en la línea del aumento generalizado del consumo de los azúcares y de los aminoácidos en los suelos tratados. Por el contrario, la eficiencia de consumo de los ácidos orgánicos siempre fue superior en el suelo control, salvo para el caso del ácido cítrico en el muestreo B0.

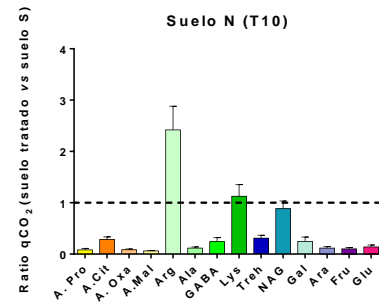
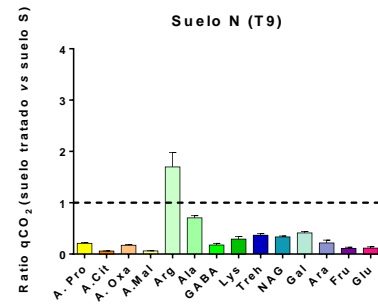
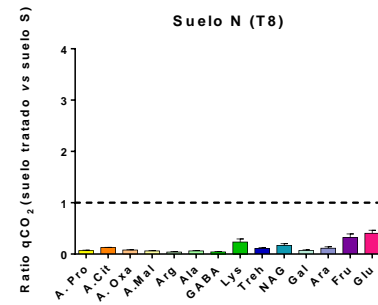
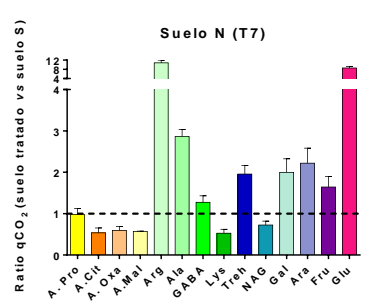
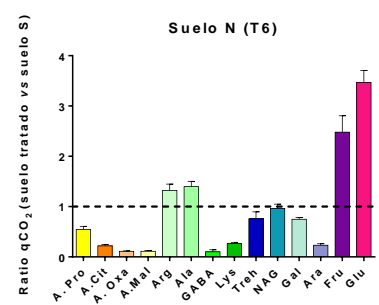
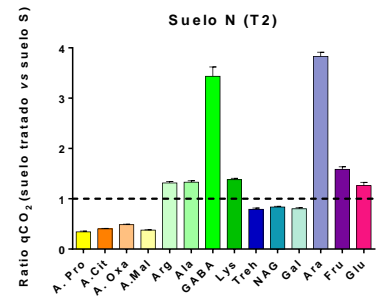
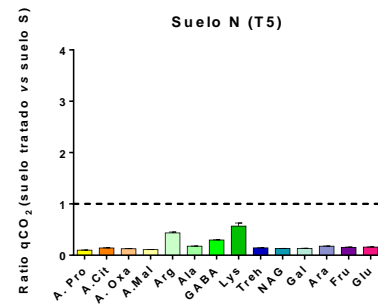
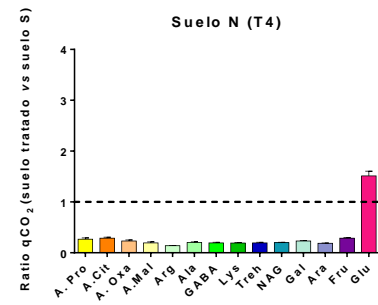
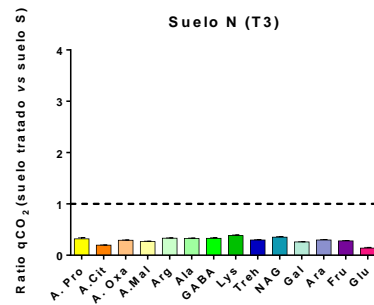
---

**Figura 21. Ratio de los cocientes metabólicos de cada sustrato de los suelos tratados (B, A y N) respecto del suelo control (S).**

---







## 3.6 Discusión

---

La actividad metabólica del suelo enmendado, observada a través de los perfiles de consumo de distintas fuentes de carbono (CLPP), presentó diversas alteraciones tras la adición de enmiendas orgánicas. En la literatura científica también se hallan diferentes ejemplos de suelos enmendados que presentan alteraciones en su perfil metabólico, evaluado a través de diferentes metodologías (Bastida *et al.*, 2008b; Bastida *et al.*, 2009; Chaudhry *et al.*, 2012). Sin embargo, no se han hallado un gran número de experimentos que evalúen la aplicación de enmiendas orgánicas mediante el sistema MicroResp<sup>TM</sup>. Con esta metodología detectamos que, en términos absolutos, la aplicación de enmiendas orgánicas produjo un incremento generalizado de la actividad metabólica, y por lo tanto del consumo de los distintos sustratos (Campbell *et al.*, 2003). Por el contrario, en términos relativos, se observó que el reparto del consumo de los sustratos fue diferente según su naturaleza química. Por un lado, se observó un incremento generalizado del consumo relativo de los azúcares y de los aminoácidos mientras que, por otro lado, se produjo un descenso del consumo relativo de los ácidos orgánicos, de manera similar a lo ocurrido en otros suelos enmendados con residuos orgánicos en los que se evalúan los CLPPs (Chakraborty *et al.*, 2011; Fraç *et al.*, 2012; Chaudhry *et al.*, 2012; Sradnick *et al.*, 2013).

En los suelos tratados las diferencias de los perfiles metabólicos (CLPPs) indican que las poblaciones metabolizan a distinta velocidad los sustratos de carbono proporcionados, hecho que no es más que un reflejo de la variedad, concentración o biodisponibilidad de los sustratos de distinta naturaleza química añadidos con la materia orgánica de las enmiendas. Así, los sustratos disponibles en el suelo podrían “moldear” las poblaciones que pueden vivir en esas circunstancias por una especialización nutricional (consumidores de tipo *r* o *K*) (Bradley y Fyles, 1995; Fanin *et al.*, 2015). En este sentido, si existe una presencia masiva de nutrientes deberían proliferar determinadas poblaciones oportunistas o de tipo *r* (Fierer *et al.*, 2012a), reflejándose posteriormente variaciones en el consumo de algunos sustratos del ensayo. Consideramos también que, aparte de la composición diferentes de las poblaciones, estas diferencias de consumos pueden deberse bien a un estímulo derivado de un efecto *priming* (Hamer y Marschner, 2005), o quizás a la demanda de algunos sustratos como, por ejemplo, aquellos que contienen nitrógeno (Orwin *et al.*, 2006; Banning *et al.*, 2012).

### 3.6.1 ¿A qué puede deberse el incremento del consumo relativo de los azúcares y aminoácidos?

La adición de los residuos orgánicos supuso un incremento del carbono orgánico total y, concretamente, del carbono soluble del suelo. En esta última fracción del carbono se concentran gran parte de los compuestos de fácil degradación por parte de las poblaciones microbianas, entre los que se encuentran los azúcares (Cook y Allan, 1992; Ros *et al.*, 2003b; van Hees *et al.*, 2005). En nuestros análisis también se ha comprobado que la adición de enmiendas orgánicas promueve el incremento de la biomasa microbiana (Capítulo II), cuyos valores también se correlacionan positivamente con el incremento del consumo de determinados azúcares como la

glucosa ( $r=0,41$ ;  $P<0,01$ ) y la fructosa ( $r=0,47$ ;  $P<0,01$ ), y de algunos aminoácidos como la alanina ( $r=0,34$ ;  $P<0,05$ ), como también se ha indicado previamente en otros estudios (Lin y Brookes, 1999; Carpenter-Boggs *et al.*, 2000). De esta forma, tanto el incremento del consumo de compuestos lábiles, como el incremento de la biomasa, coincidirían con un efecto *priming* en las poblaciones del suelo (Kuzyakov y Bol, 2006), y se relacionarían con la proliferación de microorganismos de estrategia ecológica de tipo *r* (oportunistas), los cuales son los responsables del metabolismo principal de las sustancias más lábiles, como son los azúcares (Fontaine *et al.*, 2003; Wakelin *et al.*, 2008; Fraç *et al.*, 2012; Sradnick *et al.*, 2013).

Por otra parte, el incremento del consumo relativo de compuestos nitrogenados como NAG, GABA y otros aminoácidos podría deberse a un aumento de la demanda del consumo de compuestos con nitrógeno, como se sugiere en algunos trabajos (Orwin *et al.*, 2006; Lagomarsino *et al.*, 2012). Así, en estudios de suelos enmendados con residuos orgánicos, se ha publicado que un incremento de la disponibilidad de fuentes de carbono puede conducir a una escasez relativa de compuestos de nitrógeno, provocando la activación de enzimas que mineralizan los compuestos orgánicos con nitrógeno (Bowles *et al.*, 2014). De hecho, en nuestro trabajo la ratio C/N se incrementó en varios muestreos tras la adición de enmiendas, lo que podría suponer también un incremento de la demanda relativa de nitrógeno por parte de los microorganismos. En esta línea, Orwin sugirió que la adición de compuestos de carbono más o menos complejos producía una mayor demanda de nitrógeno de las poblaciones, favoreciendo la expresión de enzimas capaces de degradar compuestos como los aminoácidos (Orwin *et al.*, 2006). En cambio, en otro trabajo también se sugiere que la adición de compuestos de nitrógeno puede activar el consumo relativo de distintos compuestos de carbono (Currey *et al.*, 2010), puesto que se observó una presencia elevada de amonio y un incremento del consumo de azúcares (glucosa, galactosa y NAG), así como de determinados aminoácidos como la arginina, de manera similar a nuestro análisis. Sin embargo, ni en ese artículo (Currey *et al.*, 2010) ni en nuestro trabajo hemos podido encontrar valores de correlación significativos para estos resultados. Por todo ello, la discrepancia existente entre estas conclusiones nos hizo pensar que realmente el incremento de la degradación potencial de estas sustancias lábiles (como los azúcares y los aminoácidos) podría justificarse mejor por la necesidad de degradar nutrientes sencillos para la síntesis de biomasa, que para cubrir la escasez de algunos nutrientes. De esta forma, la degradación de azúcares aportaría gran cantidad de energía y los aminoácidos serían componentes esenciales para la síntesis de las estructuras microbianas.

### 3.6.2 ¿Por qué disminuye el consumo relativo de los ácidos orgánicos?

En el caso de los ácidos orgánicos se produjo un descenso generalizado de sus tasas de consumo en relación al perfil metabólico. En términos relativos, un incremento notable del consumo de los azúcares y de los aminoácidos conlleva un descenso de la participación del consumo de los ácidos orgánicos a lo largo del perfil metabólico total. Este resultado indica un incremento de la diversidad funcional, ya que las tasas relativas de consumo de los azúcares y aminoácidos tendieron a igualarse con las de los ácidos orgánicos, mostrando por tanto, perfiles metabólicos cuyas tasas relativas fueron proporcionalmente similares entre sí (**Tabla 7**). De forma similar a nuestras observaciones, Sradnick publicó que la adición de enmiendas orgánicas al suelo produce un incremento de la diversidad funcional de su microbiota. En concreto, describió una correlación negativa entre la diversidad funcional y un incremento en el consumo absoluto de los ácidos orgánicos y, por el contrario, positiva con el incremento del consumo absoluto de los azúcares y aminoácidos (Sradnick *et al.*, 2013), de manera parecida a nuestras observaciones. Por tanto, la disminución del consumo de los ácidos orgánicos en suelos enmendados podría ser un rasgo característico de este tipo de prácticas.

Sin embargo, puesto que los ácidos orgánicos, como los usados en nuestro experimento, también se degradan de forma rápida por las poblaciones del suelo (van Hees *et al.*, 2005), ¿cuál sería entonces el motivo de que los ácidos orgánicos no se consumieran a tasas relativas tan elevadas? Una posible razón podría relacionarse con la integración de los ácidos en las células microbianas. Al parecer estos compuestos precisan de un gasto de ATP elevado para su integración (van Hees *et al.*, 2005), lo que dificultaría su mineralización, en comparación con otras sustancias fáciles de degradar. También, otros factores como el pH podrían influir sobre los perfiles de consumo, como revela un ensayo de los perfiles metabólicos de suelos agrícolas (Wakelin *et al.*, 2008). En el trabajo de Wakelin se relacionó un descenso del pH en el suelo con un menor metabolismo del ácido aspártico (sustrato no empleado en nuestro trabajo) y, por el contrario, con un incremento en el consumo de sustratos como la lisina y la arginina, como también ocurre en nuestro análisis. De esta manera, se podría pensar que el estrés que produce la variación del pH, junto con el incremento masivo de los nutrientes, podría seleccionar microorganismos que crecieran más rápidamente merced a poder consumir mejor ese tipo de sustratos (azúcares y aminoácidos). En la misma línea, aunque desde el punto de vista contrario, Pailler observó que la naturaleza química de los compuestos de los suelos de bosques de coníferas, cuyos desechos vegetales son más recalcitrantes, seleccionaron un tipo de microorganismos que degradaban los compuestos más complejos de forma preferente (Pailler *et al.*, 2014). Al igual que este caso, los suelos que han sufrido un incendio y han perdido hasta un 80 % de su biomasa microbiana (en concreto de ectomicorrizas) disminuyen la cantidad de ácidos carboxílicos presentes en ellos, disminuyendo su biodisponibilidad para las bacterias y, por tanto, pudiendo seleccionar microorganismos entre las cuales no se encuentra un consumo preferente de esos ácidos (Banning *et al.*, 2012).

Si trasladamos estos razonamientos a nuestro ensayo, se podría decir que la presión que ejercen las enmiendas, debida a cambios químicos principalmente, permitiría seleccionar aquellas poblaciones cuyo metabolismo se basó en el consumo preferente de azúcares, reduciendo, por tanto, la parte correspondiente al consumo de los ácidos orgánicos.

### 3.6.3 ¿A qué puede deberse la duración de las alteraciones del perfil metabólico de los suelos tratados y las oscilaciones en el número de alteraciones?

Las alteraciones registradas en los perfiles metabólicos de los suelos tratados perduraron hasta el final de los análisis. Los datos edáficos, después de dos años de análisis, siguieron mostrando cantidades ligeramente elevadas de compuestos de carbono orgánico, como  $Lp_1$ ,  $Lp_2$  y carbono soluble en las parcelas enmendadas. Esto indica que las dosis que se aplicaron fueron elevadas, haciendo que su efecto perdurase en el tiempo y mantuvieran la selección de poblaciones cuyo metabolismo se basó principalmente en el consumo de compuestos lábiles. El transcurso del tiempo debería dar lugar a un estado metabólico similar al del suelo control, porque la proporción de nutrientes añadidos se va reduciendo. Sin embargo, en otros trabajos analizados durante un tiempo considerablemente más largo (superior a los veinte años), el perfil de los consumos se mantuvo alterado en función de otros factores como el desarrollo vegetal que se derivó de la aplicación de las enmiendas (Bastida *et al.*, 2013).

También hemos comprobado que los suelos tratados poseen un perfil de consumo muy diferente al del suelo control especialmente en las estaciones más frías, donde se contabiliza un número de diferencias significativas comparativamente mayor que las observadas durante los perfiles de los muestreos más calurosos (**Figura 20**). En un principio, esta disminución de las diferencias entre los suelos tratados y el control podría deberse al efecto que provocaría una elevación de la temperatura ambiental. Esta elevación incrementaría la actividad metabólica general de los microorganismos del suelo (Qiu *et al.*, 2005; Fierer *et al.*, 2006; Poulsen *et al.*, 2012), sin distinción de si fue tratado o no con enmiendas, que produciría un consumo incrementado e inespecífico de los sustratos, mostrando un perfil metabólico similar entre todas las muestras, lo que se traduciría en un número menor de diferencias entre los suelos tratados y el control. En cambio, en los muestreos de invierno, el frío podría disminuir la actividad metabólica general de los suelos tratados y del suelo control, pero de una forma más notable en este último ya que carece del efecto protector de los lodos los cuales incrementan el número de agregados, el contenido de humedad (Singh y Agrawal, 2008), y la cantidad de nutrientes incrementándose, por tanto, el número de diferencias significativas en el perfil metabólico de los suelos tratados con enmiendas (B, A y N) con respecto al control (S).

### 3.6.4 ¿Existe algún rasgo característico capaz de discriminar el uso de las diferentes enmiendas en el suelo?

La utilización del consumo de los ácidos orgánicos como indicador del estado funcional del suelo se ha comprobado en suelos rehabilitados, destacándose especialmente el poder discriminatorio de las poblaciones presentes de aquellos ácidos químicamente más complejos (Banning *et al.*, 2012). La excreción de ácidos orgánicos por parte de las raíces de las plantas está considerada como un mecanismo de obtención de micronutrientes como el hierro y el manganeso en suelos con deficiencias nutricionales (Chishaki y Horiguchi, 1997; Jones, 1998) que, al mismo tiempo, promueve el desarrollo de poblaciones microbianas predispuestas a metabolizarlos (Banning *et al.*, 2012). Dentro de los ácidos orgánicos, el ácido protocatéutico (ácido fenólico) está considerado como un compuesto difícil de metabolizar, y por esta razón se usa como marcador de la capacidad de degradación de compuestos recalcitrantes como la lignina (Campbell *et al.*, 1997; Iwagami *et al.*, 2000). Aunque las tasas relativas de consumo de los ácidos orgánicos disminuyeron en los suelos tratados en general, de forma particular el consumo relativo del ácido protocatéutico disminuyó notablemente. Posiblemente las altas dosis de enmiendas orgánicas aplicadas, las cuales aumentaron la proporción de sustratos fácilmente degradables, podrían disminuir la proporción de microorganismos genéticamente preparados para la degradación de estos compuestos más complejos de dos maneras. Por un lado, favoreciendo la selección de poblaciones bacterianas oportunistas con un comportamiento nutricional copiotrófico que tengan un consumo preferente por los sustratos más sencillos (Fierer *et al.*, 2012a; Sradnick *et al.*, 2013). Y por otro lado, disminuyendo la capacidad de las poblaciones de degradar compuestos más recalcitrantes como, por ejemplo, el ácido protocatéutico. De hecho, hemos podido detectar una correlación negativa y significativa entre el consumo del ácido protocatéutico y la cantidad de carbono orgánico ( $r=-0,40$ ;  $P<0,05$ ), la de Lp1 ( $r=-0,38$ ;  $P<0,05$ ) y la de Lp2 ( $r=-0,40$ ;  $P<0,05$ ). En el trabajo de Banning, la ausencia de contacto entre los microorganismos y algunas sustancias químicamente complejas, sumado a la presencia de fertilizantes añadidos, contribuyó a la disminución del metabolismo de estas sustancias complejas por parte de las poblaciones microbianas (Banning *et al.*, 2012). Así, un hecho similar podría estar sucediendo en nuestros suelos tratados con enmiendas orgánicas.

En cambio, en varios estudios de suelos tratados con enmiendas orgánicas a dosis elevadas se ha detectado lo contrario, es decir, el desarrollo de bacterias capaces de metabolizar compuestos complejos como el ácido protocatéutico, además de compuestos lábiles (Marwati *et al.*, 2003; El Azhari *et al.*, 2012). Según El Azhari (2012) la adición repetida (19 años) de enmiendas orgánicas a altas dosis favorecería la adaptación de las poblaciones del suelo a la degradación de los compuestos aromáticos como el ácido protocatéutico (El Azhari *et al.*, 2012). Sin embargo, con nuestra metodología no se ha observado que se haya alcanzado dicho estado en la microbiota del suelo, ya que las tasas de consumo del ácido protocatéutico permanecieron bajas por regla general, sugiriendo que las poblaciones del suelo en el plazo de dos años no fueron capaces de degradar ese tipo de sustancias más recalcitrantes, tal y como sugieren los estudios mencionados. A diferencia de aquellos trabajos, en el nuestro la enmienda se aplicó en un solo momento y no de forma

reiterada. Tras estas reflexiones se puede concluir que el ácido protocatéquico no fue discriminativo entre las enmiendas utilizadas, aunque sí nos fue válido para indicar la presencia de cualquier enmienda orgánica en el suelo.

Por otro lado, los resultados mostraron que el estudio detallado de algunos aminoácidos que se comportan de una forma fuera de la tendencia general (es decir, cuyas tasas de consumo disminuyeron) podría arrojar información acerca de la presencia de alguna enmienda en particular. Este fue el caso de la disminución del consumo de la lisina en algunos muestreos de los suelos B y A. Sin embargo, no se han encontrado trabajos en la literatura científica que aportaran más información acerca de este comportamiento, los cuales ayudarían a apoyar esta observación. En referencia al consumo de los azúcares, aunque algunos autores han documentado el incremento en el consumo de N-acetil-glucosamina (NAG) en los suelos enmendados con compost (Cordovil *et al.*, 2011), en nuestro ensayo solo hemos podido documentar ese incremento en los primeros muestreos de los suelos tratados con LANAE (suelos N) (**Tabla 13**) que, sin embargo, no se traducen en un incremento del consumo estandarizado por unidad de biomasa (**Figura 21**).

Frente a la dificultad de encontrar en nuestros análisis un sustrato concreto cuyo consumo permitiera identificar un suelo tratado con una enmienda en particular, mediante la relativización de la tasa de consumo con respecto a la biomasa se pudieron observar rasgos más generales de cómo se consumieron los sustratos en su conjunto (**Figura 21**). De esta manera, por ejemplo, en el suelo B se observó un mayor número de sustratos cuyo consumo por unidad de biomasa fue superior al del suelo sin tratar, durante los primeros muestreos. En cambio, en los suelos A y N, el número de sustratos que se consumieron con una mayor eficiencia con respecto al suelo control fue menor que en B. Este hecho podría considerarse como un rasgo discriminatorio del empleo de este tipo de enmiendas compostadas, las cuales tienen una mayor proporción de compuestos complejos (Pascual *et al.*, 1997). De esta manera, las poblaciones del suelo B parecen tener un perfil de consumo más amplio y diverso ya que son capaces de degradar un mayor número de sustancias, mientras que en los suelos A y N el espectro de consumo parece menos diverso, centrado en un menor número de sustratos. Una de las razones que podrían explicar esta diferencia se encontraría en la elevada cantidad de compuestos lábiles en las enmiendas LAE y LANAE, la cual pudo haber seleccionado poblaciones con un metabolismo más oportunista que las del suelo B y, por tanto, con una diversidad funcional más restringida (aunque siempre mayor que la del suelo sin enmendar) (Yang *et al.*, 2000);(Chaudhry *et al.*, 2012). Cabe recordar que en los procesos de elaboración de los lodos utilizados (LAE y LANAE) no se utilizó el tratamiento térmico típico de las enmiendas compostadas, haciendo que éstos contuvieran una mayor proporción de compuestos de fácil degradación (Thuy *et al.*, 2014). En cambio, en las enmiendas compostadas, la variedad de compuestos de diferente complejidad pudo promover que el perfil de consumos en el suelo B fuera más diverso, al menos a corto plazo desde el momento de la adición de las enmiendas. Consideramos, por tanto, que esta forma de analizar los perfiles de consumo podría ser útil para mostrar o definir a corto plazo, no solo la diversidad funcional, sino la capacidad de consumo de los sustratos de diferentes tipos de suelos. Pero, ¿existiría algún sustrato capaz de aportar una información más concreta?

Aunque los sustratos elegidos para la determinación de los perfiles metabólicos tienen un origen natural y por esta razón su estudio debería aportar un gran significado ecológico (Campbell *et al.*, 1997), el uso de la técnica en varios experimentos no ha reportado un gran número de sustratos o conjunto de sustratos discriminatorios asociados a un estado metabólico concreto, debido a la dificultad de realizar esta asociación (Chen *et al.*, 2008). En nuestro análisis hemos podido detectar el consumo preferente de la arginina, tanto a nivel relativo como a nivel absoluto, por lo que se podría proponer como un indicador del uso de las enmiendas en el suelo. El incremento del consumo de arginina también fue reseñado por Wakelin aunque, en este caso, en suelos naturales, observándose una fuerte asociación con valores bajos de pH del suelo (4,3-5,9) (Wakelin *et al.*, 2008). En nuestro trabajo el descenso del pH fue debido a la degradación de la materia orgánica presente tras la adición de las enmiendas (Franco-Otero *et al.*, 2012) y, quizá, esta acidificación motivó el incremento del consumo de este sustrato, aunque no hemos encontrado correlación estadística entre ambos fenómenos. De igual manera, también pudimos observar que el consumo de la glucosa se encontró incrementado tanto a nivel absoluto como relativo en muchos de los muestreos. Sin embargo, el incremento de la eficiencia del consumo de este sustrato fue solamente destacable en los suelos tratados un año después de aplicarse las enmiendas, por lo que podría tratarse de un indicador tardío de su presencia en el suelo. Por último, el incremento del consumo del ácido cítrico en el primero de los muestreos del suelo B mostró un patrón diferente al del resto de los ácidos orgánicos, cuyo consumo relativo disminuye por regla general en los suelos tratados (**Figura 21**). El consumo que destacamos de esta tríada de sustratos (**ácido cítrico, glucosa y arginina**) ha sido propuesta anteriormente, por su supuesto poder discriminatorio entre poblaciones muy similares entre sí en suelos adyacentes a explotaciones mineras (Chen *et al.*, 2008). Además, esta selección escoge un representante de cada uno de los grupos químicos estudiados con el sistema MicroResp<sup>TM</sup> (ácidos, azúcares y aminoácidos), como también se ha hecho anteriormente intentando relacionar el comportamiento del consumo de algunos sustratos con las poblaciones presentes en el suelo (Eilers *et al.*, 2010). Por lo tanto, consideramos que el análisis en profundidad de un número más limitado de sustratos podría ser suficiente para obtener resultados concluyentes en estudios similares en el futuro.

### 3.7 Conclusiones

---

1. La adición de enmiendas al suelo produce un cambio en el perfil de consumo de una serie de sustratos que es distinto en función del tipo de enmienda utilizada.
2. Por regla general, el consumo de azúcares y aminoácidos se incrementó, mientras que el de ácidos orgánicos disminuyó, probablemente por el desarrollo de poblaciones oportunistas en el suelo que presentan un consumo preferente por los primeros.
3. El consumo del ácido protocatéquico disminuyó en las parcelas enmendadas posiblemente debido al incremento de la cantidad de compuestos lábiles de carbono fáciles de metabolizar.
4. El análisis del número de alteraciones significativas totales del consumo y de los valores de  $qCO_2$  de los sustratos permitió comprobar que los efectos de la aplicación de enmiendas perduraron más de dos años, lo que indica que la repercusión metabólica de las dosis aplicadas ha de medirse en plazos de tiempo superiores a los dos años.
5. Los consumos de arginina, glucosa, ácido cítrico y ácido protocatéquico fueron característicos de la presencia en los suelos de enmiendas orgánicas por lo que podrían ser utilizados como marcadores para determinar la existencia de alteraciones en el suelo.



## Capítulo IV

---

### **4 Análisis de la composición bacteriana de suelos agrícolas tras la aplicación de enmiendas orgánicas**



## 4.1 Resumen

---

La generación de residuos procedentes de los desechos urbanos y de la depuración de aguas es una consecuencia directa del desarrollo demográfico e industrial. Una de las formas de reutilizar estos residuos consiste en su aplicación como enmienda en suelos degradados o en suelos agrícolas. No obstante, el uso de enmiendas orgánicas en el suelo altera sus propiedades químicas, físicas o biológicas, entre las que se encuentra la estructura de las poblaciones microbianas.

En este trabajo hemos analizado durante un periodo de 30 meses los cambios que se producen en las poblaciones bacterianas de un suelo agrícola en el que se aplicaron distintas enmiendas orgánicas, compostadas (basura compostada) y no compostadas (lodos de depuradora aerobio y anaerobio), a una elevada concentración ( $160 \text{ Mg ha}^{-1}$ ). El análisis de las poblaciones en las muestras de suelo y en las enmiendas orgánicas se ha llevado a cabo mediante técnicas moleculares de secuenciación masiva (pirosecuenciación) del gen 16S bacteriano. Para un mejor manejo, las secuencias también fueron agrupadas en clústeres dando lugar a OTUs (*operational taxonomic units*), con los que se describieron los cambios más relevantes que sufrieron las poblaciones de los suelos tratados.

Los resultados revelaron modificaciones de carácter general en los suelos enmendados, como el incremento de la abundancia de algunos filos de bacterias habituales en el suelo (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes* y *Verrucomicrobia*), el incremento de otros menos frecuentes (*Nitrospira* y *Deinococcus-Thermus*) y la disminución de otros (*Acidobacteria*, *Cyanobacteria* y *Planctomycetes*). El incremento del contenido de materia orgánica y su naturaleza química contribuyó de forma significativa a las modificaciones que se registraron en las poblaciones bacterianas de los suelos. Por otra parte, la distinta composición bacteriana de las enmiendas orgánicas aplicadas produjo variaciones en la abundancia de algunos grupos bacterianos que señalaron un comportamiento característico de la enmienda aplicada. En este sentido, el lodo anaerobio fue la enmienda que produjo los cambios más relevantes en el suelo (en el filo *Synergistetes* y las clases *Clostridia*, *Erysipelotrichi*, *Bacteroidia* y *Anaerolineae*). Por último, los OTUs analizados en este estudio ayudaron a proponer nuevos marcadores del uso de enmiendas orgánicas y, en concreto, de la aplicación de lodos de depuradora.

## 4.2 Introducción

---

El desarrollo urbano genera una gran cantidad de desechos que han de ser tratados para evitar la contaminación del medio ambiente. A partir de ellos se pueden elaborar una serie de productos que tras ser procesados y acondicionados pueden ser usados como enmiendas orgánicas en suelos degradados o agrícolas. Sin embargo, la adición de estas enmiendas orgánicas en el suelo puede alterar las características físicas, químicas y biológicas del mismo, entre las que se encuentra la estructura de sus poblaciones microbianas. Así, la modificación de la microbiota del suelo podría provocar efectos adversos a nivel ambiental y/o sanitario. Diversos estudios describen el conjunto de cambios que se producen en suelos tratados con enmiendas orgánicas (Marschner *et al.*, 2003; Enwall *et al.*, 2007; Allison y Martiny, 2008; Poulsen *et al.*, 2012).

Dentro de los factores que pueden relacionarse con la enmienda orgánica, la naturaleza química de éstas constituye un factor clave para determinar cómo cambian las poblaciones del suelo (Pérez-Piqueres *et al.*, 2006). En principio, el contenido elevado de materia orgánica de las enmiendas constituye el motivo principal por el que se producen modificaciones de la estructura de la microbiota del suelo (Bastida *et al.*, 2008a; García-Orenes *et al.*, 2013). Concretamente, la cantidad y la complejidad química de los compuestos orgánicos de carbono (García *et al.*, 1992), junto con el tipo de compuestos de nitrógeno que forman estos desechos (Fierer *et al.*, 2012a), son aspectos que hay que considerar cuando se realiza su aplicación.

Diversas investigaciones señalan que el contenido de nutrientes en el suelo es fundamental para describir la composición de su microbiota, y este contenido se incrementa normalmente cuando se añaden al suelo enmiendas orgánicas, como son los lodos de depuradora o residuos sólidos urbanos. Por tanto, desde un punto de vista basado en la estrategia ecológica y nutricional de los microorganismos, parece ser que principalmente los cambios producidos en la estructura de las poblaciones tras la aplicación de enmiendas son debidos a la proliferación de poblaciones bacterianas oportunistas relacionadas con el incremento de la cantidad de nutrientes, especialmente los que se degradan más fácilmente (Fierer *et al.*, 2007; Bastida *et al.*, 2013). Estos grupos microbianos oportunistas poseen un tipo nutricional copiotrofo con una estrategia ecológica de tipo *r*, es decir, que se caracterizan por consumir principalmente formas lábiles de carbono, requerir concentraciones nutricionales elevadas y exhibir tasas de crecimiento y actividad también elevadas. Este sería el caso, por ejemplo, de bacterias de la clase *Betaproteobacteria* o del filo *Bacteroidetes* (Fierer *et al.*, 2007; Bastida *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2013). Por el contrario, otros grupos bacterianos, como el filo *Acidobacteria* entre otros, se han relacionado con una baja concentración de nutrientes en el suelo, debido a su metabolismo oligotrófico (Fierer *et al.*, 2012a). Aparte de los factores relacionados con la modificación química producida por las enmiendas orgánicas, existen otros factores físico-químicos, que se modifican en el suelo por la aplicación de las enmiendas, como son el pH, la conductividad eléctrica (CE), la estabilidad física del suelo o la humedad, los cuales pueden afectar a la abundancia y a la distribución de la microbiota del suelo (Girvan *et al.*, 2003; Fierer y Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2008; Turbé *et al.*, 2010).

Por otra parte, la composición microbiana de las enmiendas orgánicas, las cuales poseen un alto contenido de microorganismos procedentes de los propios residuos fecales, así como de los procesos tecnológicos llevados a cabo para su obtención (Bitton, 2010), podría influir sobre las poblaciones autóctonas del suelo, debido a su posible transmisión desde los residuos (Ros *et al.*, 2006a). De esta manera, la adición de estos microorganismos podría desequilibrar, al menos temporalmente, la distribución de las poblaciones del suelo tratado, introduciendo, incluso, posibles microorganismos patógenos para la salud humana y/o vegetal (Zhang *et al.*, 2009).

Por lo tanto, la aplicación de enmiendas orgánicas modifica las poblaciones microbianas del suelo, pudiendo provocar alteraciones de su papel ecológico en los ciclos biogeoquímicos o introduciendo microorganismos potencialmente patógenos que podrían transmitirse a los cultivos vegetales de los suelos agrícolas o provocar la contaminación de aguas. Estas consideraciones constituyen razones suficientes para el estudio de la composición de la microbiota de los suelos tratados con enmiendas orgánicas. De esta manera, en este trabajo nos planteamos la hipótesis de que, dentro de la complejidad del análisis, han de existir marcadores concretos que delaten la aplicación de enmiendas orgánicas en agricultura. Sin embargo, no hemos detectado en la literatura científica consultada estudios que identifiquen algún marcador bacteriano concreto para la determinación de la presencia o del uso de enmiendas orgánicas en suelos agrícolas. Solamente conocemos datos previos de nuestro grupo de trabajo en los que se propusieron algunos marcadores tras la aplicación de lodos de depuradora (Gondim-Porto, 2012). Por esta razón, hemos realizado un estudio durante 30 meses utilizando una cantidad elevada de lodos de depuradora o residuos sólidos urbanos compostados para determinar la evolución de las poblaciones microbianas de un suelo agrícola y proponer marcadores de la aplicación de estas enmiendas orgánicas.

### 4.3 Objetivos específicos

---

- **Describir de forma detallada los cambios producidos en la composición bacteriana del suelo tras la adición de distintas enmiendas orgánicas comparativamente con un suelo control durante un periodo de 30 meses.**
- **Identificar marcadores bacterianos que permitan detectar el uso de enmiendas orgánicas en el suelo.**

## 4.4 Materiales y métodos

En este apartado se recuerdan detalles generales relativos al diseño experimental (explicados en el Capítulo II) y se explican las particularidades metodológicas del análisis de las poblaciones bacterianas.

### 4.4.1 Obtención de secuencias a partir de DNA del suelo

Las poblaciones bacterianas fueron analizadas en las muestras de suelo mediante la secuenciación masiva (pirosecuenciación) de los fragmentos amplificados del gen 16S bacteriano. Se analizaron las poblaciones de las muestras de suelo tratado con distintas enmiendas (suelos B, A y N), las cuales fueron contrastadas con las analizadas en el suelo control (suelo S).

La localización de las parcelas, la distribución de las enmiendas, la descripción de las muestras y del muestreo se detalla en los apartados 2.4.1 y 2.4.2 correspondientes al diseño experimental (Capítulo II). En la **Tabla 14** se recuerda el calendario de muestreo.

Resumen de los muestreos											
Número de muestreo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Suelo S (control)	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Suelos B	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Suelos A			A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Suelos N			N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8
Estación	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P
Año	2009		2010			2011			2012		

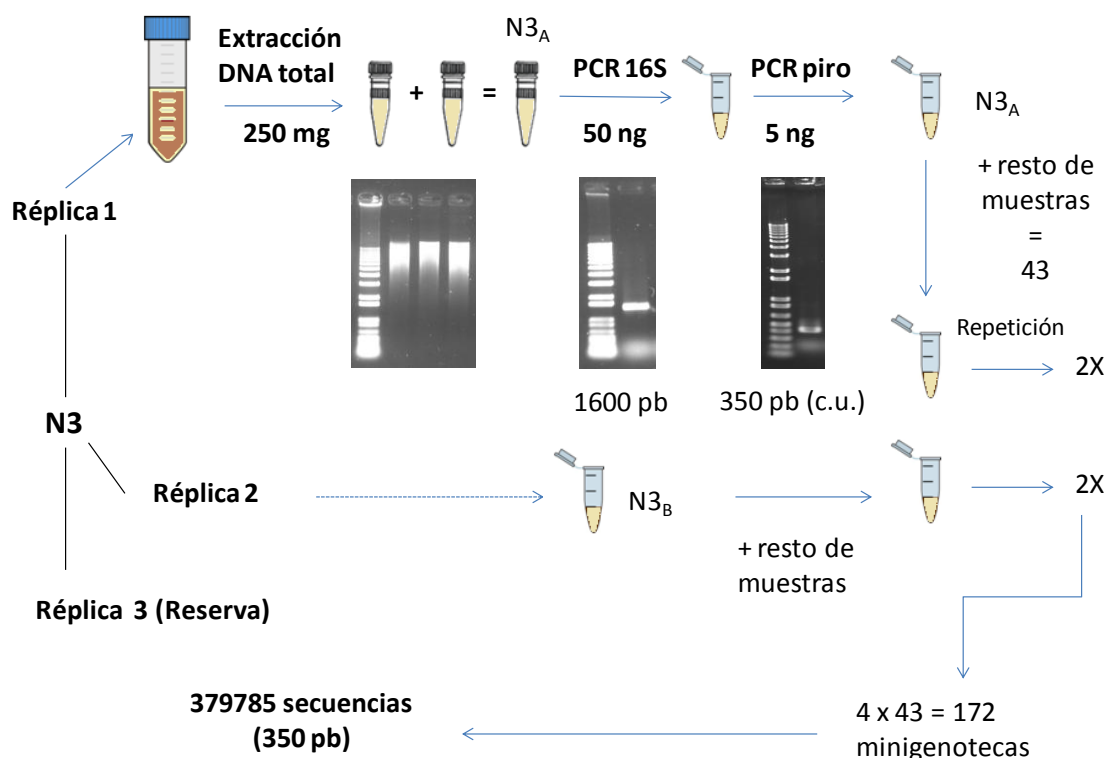
**Tabla 14. Resumen de los muestreos de suelo para la determinación de los perfiles de las poblaciones bacterianas.**

Las lodos de depuradora LAE y LANAE se aplicaron al suelo 6 meses después que la BC. Las letras indican las estaciones del año: otoño (O); invierno (I); primavera (P) y verano (V). Para consultar los datos climatológicos completos véase **ANEXO 1**.

#### 4.4.1.1 Extracción del DNA del suelo y elaboración de las minigenotecas del gen *rRNA 16S*

Las muestras de suelo para los análisis moleculares fueron recogidas en tubos de tipo *Falcon* y almacenadas a -80 °C hasta el momento de su análisis. Para cada tipo de suelo tratado (S, B, A y N), en cada uno de los muestreos (del 0 al 10 para S y B; y del 0 al 8 para A y N), se recogieron 3 tubos (réplicas). En total 40 muestras de suelo que junto con las 3 muestras de enmiendas (BC, LAE y LANAE) sumaron 43, a partir de las cuales se generaron 43 colecciones (minigenotecas) de un fragmento del gen que codifica el rRNA de la subunidad 16S del ribosoma procariota.

La elaboración de las minigenotecas se realizó de la siguiente manera: partiendo de las tres réplicas de cada muestra de suelo, almacenadas en tubos *Falcon*, se extrajo el DNA total a partir de 250 mg de muestra homogeneizada (por duplicado) mediante un kit comercial de extracción de DNA de suelo de acuerdo con las especificaciones del fabricante (*PowerSoil® DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc.*). De esta manera, se obtuvieron un total de 6 extracciones de cada muestra (véase el ejemplo para el muestreo N3 en la **Figura 22**). La integridad del DNA total obtenido se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa (0,9 %). Una vez comprobado, las extracciones de DNA se mezclaron de dos en dos en tubos *Eppendorf*, por lo que finalmente de cada tipo de suelo se obtuvieron 3 extractos de DNA total, uno por cada una de las 3 réplicas de cada suelo (Ejemplo: N3<sub>A</sub>, N3<sub>B</sub> y N3<sub>C</sub>). La determinación de la concentración del DNA extraído de los suelos de cada muestra se realizó mediante un kit comercial de cuantificación de DNA por fluorescencia (*Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Life Technologies*). De los 3 tubos de DNA de cada muestra, se utilizaron 2 para la elaboración de las minigenotecas del gen 16S bacteriano (rRNA). El tubo restante se guardó para futuros experimentos (reserva).



**Figura 22. Obtención de las minigenotecas de los distintos muestreos.**

La muestra N3 se utiliza como ejemplo del procesamiento del DNA extraído del suelo.

El proceso de obtención de las minigenotecas para su posterior pirosecuenciación consistió en 2 amplificaciones consecutivas mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (**Figura 22**). La primera de las amplificaciones (PCR 16S; **Figura 22**) se llevó a cabo para obtener el fragmento 16S completo a partir del DNA extraído de cada una de las muestras de suelo. El producto

de PCR así obtenido fue utilizado como molde en la subsiguiente amplificación (PCR piro; **Figura 22**) con los cebadores específicos diseñados para la generación de las secuencias que serían pirosecuenciadas (**Tabla 15** y **ANEXO 5: Tabla 63**). La utilización de dos etapas de amplificación fue necesaria debido a la dificultad de amplificar el DNA extraído de suelo mediante los cebadores específicos de pirosecuenciación, como otros autores también han tenido ocasión de comprobar (Acosta-Martínez *et al.*, 2008). A continuación se explican de forma detallada ambas amplificaciones.

La amplificación del gen que codifica el rRNA 16S (PCR 16S) se llevó a cabo usando 50 ng de DNA total extraído de cada suelo como molde de la reacción en un volumen total de 20  $\mu$ L utilizando los cebadores **E8F** (5'-AGA-GTT-TGA-TCT-GGC-TCA-G-3') (*forward*) y **U1510Ri** (5'-CGG-TTA-CCT-TGTTAC-GAC-T-3') (*reverse*) (0,3  $\mu$ M), desoxinucleótidos trifosforilados (dNTP) (0,3  $\mu$ M), 1,4 unidades de polimerasa *Expand* (*Expand High Fidelity Enzyme, Roche*), y 1  $\mu$ L de BSA (0,5 mg/mL) (Sigma) como coadyuvante de la reacción. Estos cebadores son oligonucleótidos estándar descritos en la bibliografía (Baker *et al.*, 2003). Los parámetros de amplificación consistieron en una primera etapa de desnaturalización de 5 minutos a 95 °C, seguido de 20 ciclos (de 30 segundos a 95 °C, 60 segundos a 50 °C y 3 minutos a 72 °C), con una etapa final de elongación de 10 minutos a 72 °C. Posteriormente, se comprobó la existencia de un amplicón de aproximadamente 1600 pb en un gel de agarosa al 0,9 % mediante electroforesis (**Figura 22**). Los productos de esta primera amplificación fueron purificados mediante un kit comercial (*GeneClean Turbo kit, MP Biomedicals*), concentrados hasta el volumen original de la reacción (20  $\mu$ L) y cuantificados mediante un kit comercial (*Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Life Technologies*) por fluorescencia en un fluorímetro multipocillo (*Tecan Infinite F200*, por cortesía del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia, UCM).

En la segunda reacción (PCR piro) se amplificó un fragmento de aproximadamente 350 pb que se encuentra entre las regiones variables V4-V5 del gen 16S. Optamos por amplificar esta región del gen debido a su elevada precisión de clasificación bacteriana (Claesson *et al.*, 2010). Se siguieron las indicaciones del fabricante del aparato de secuenciación *Genome sequencer FLX system* (Roche Diagnostics GmbH y Roche Applied Science, 2009). Como DNA molde para esta segunda reacción de amplificación se utilizaron 5 ng de la solución de fragmentos 16S procedentes de la reacción anterior (PCR 16S), en donde se emplearon los cebadores *forward* V4f-XX (variables para cada muestra) (0,4  $\mu$ M) y el cebador común *reverse* V5R-454 (0,4  $\mu$ M) (**Tabla 15** y **Figura 23**). Estos cebadores de amplificación (**ANEXO 5: Tabla 63**) para la obtención de las minigenotecas que fueron pirosecuenciadas fueron diseñados de acuerdo a las especificaciones de esta técnica (Roche Diagnostics GmbH y Roche Applied Science, 2009). Este tipo de cebadores presentan secuencias identificativas (*Multiplex identifier, MID*) para cada una de las muestra. De esta manera, se diseñaron 43 cebadores *forward*, uno por cada MID, que corresponden a cada una de las muestras (V4f-XX) y un solo *reverse* común a todas las amplificaciones (V5R-454) (**Tabla 15** y **Figura 23**). Los parámetros de amplificación fueron: una primera etapa de desnaturalización de 5 minutos a 95 °C, seguido de 20 ciclos (de 50 segundos a 95 °C, 60 segundos a 52 °C y 45 segundos a 72 °C), con una etapa final de elongación de 10 minutos a 72 °C. Posteriormente se verificó la presencia de un amplicón de aproximadamente 350 pb en un gel de agarosa al 1,2 % mediante electroforesis. Los

productos de esta amplificación fueron purificados y su concentración fue medida por fluorescencia como se indica previamente. La concentración final de DNA fue ajustada a  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

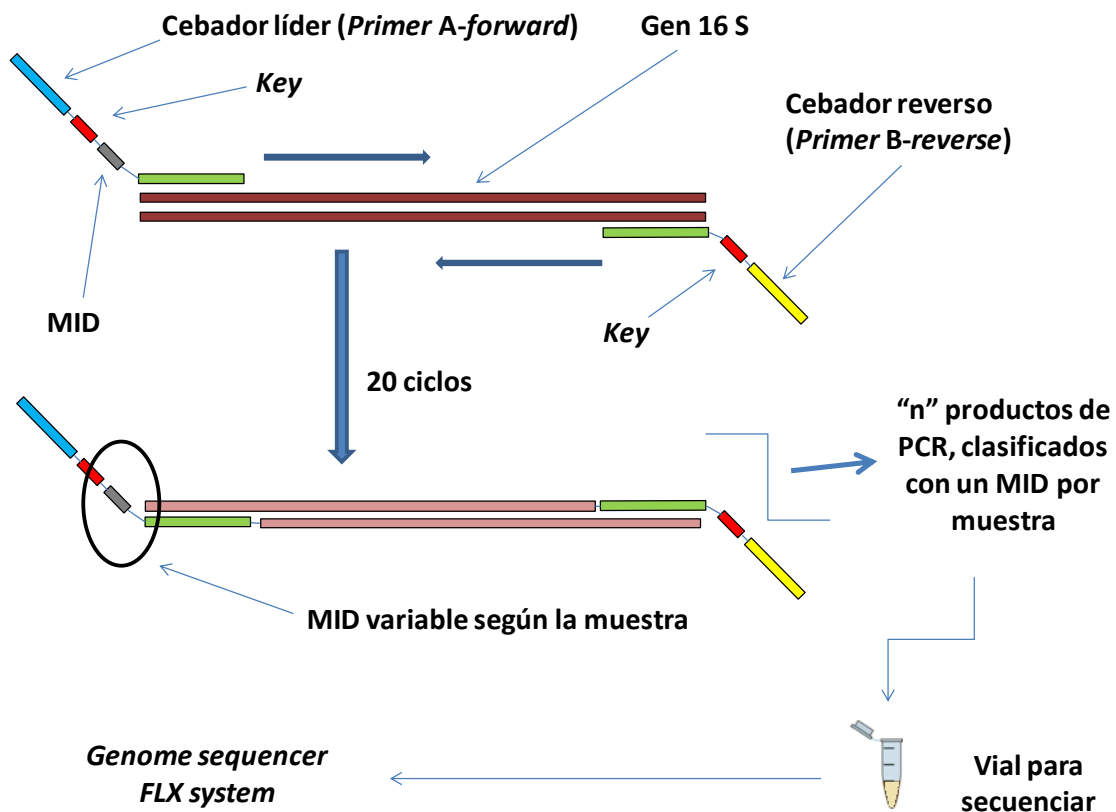
Resumiendo: de las 43 muestras (40 suelos y 3 residuos orgánicos) se obtuvieron 43 minigenotecas. De cada una de las 43 minigenotecas se mezclaron  $5 \mu\text{L}$  en 1 único vial (**Figura 22**). Cada juego de minigenotecas se obtuvo a partir de 2 (de las 3) réplicas de cada muestra (por ejemplo, N3<sub>A</sub> y N3<sub>B</sub>) y este procedimiento se realizó 2 veces (es decir, 2 repeticiones), por lo que finalmente se obtuvieron un total de 4 viales (2 réplicas x 2 repeticiones). Por lo tanto, en definitiva se confeccionaron un total de 172 minigenotecas (43 muestras x 2 réplicas x 2 repeticiones). Los 4 viales se enviaron a secuenciar de forma independiente.

5' Cebador variable identificativo de cada minigenoteca 3'					
Nombre	Cebador líder pirosecuenciación (Primer-A forward) Universal	key	MID (identificador) variable	Unión al 16S (hebra líder) Universal	MID
V4f-S0	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ACGAGTGCGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID1
V4f-N3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TCGATCACGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID42
V4f-XX	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	...	AYTGGGYDTAAAGNG	MIDX

5' Cebador universal para todas las minigenotecas 3'					
Nombre	Cebador reverso pirosecuenciación (Primer-B reverse) Universal	key		Unión al 16S (hebra rezagada) Universal	
V5r-454	CCTATCCCCTGTGTGCCTGGCAGTC	TCAG		CCGTCAATYYTTTRAGTTT	

**Tabla 15. Cebadores utilizados para la generación de las minigenotecas para la secuenciación.**

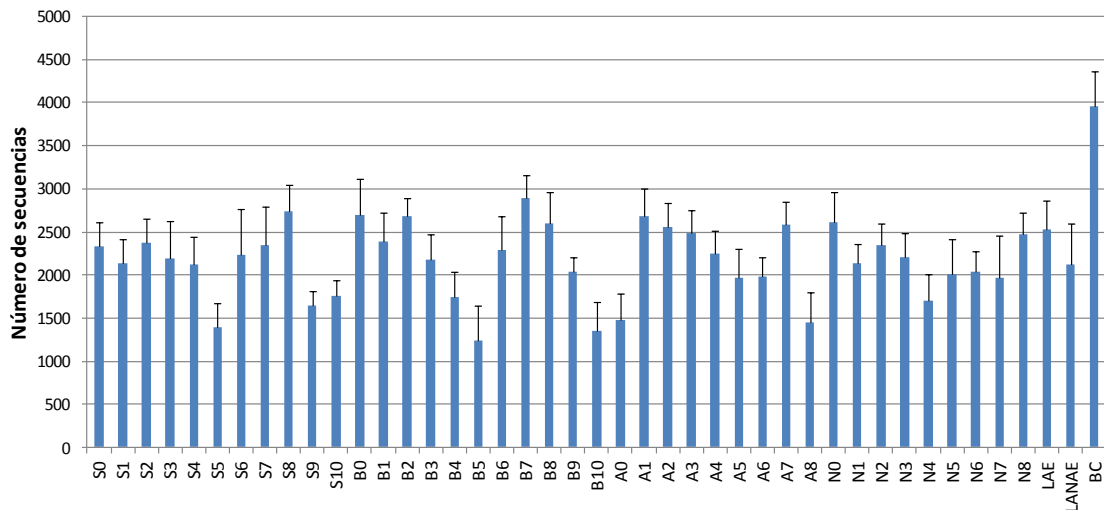
Secuencia constante de los cebadores líder de pirosecuenciación (en azul), del único cebador reverso utilizado (en amarillo), la secuencia *key* específica de la metodología (en rojo), las secuencias de hibridación con el gen 16S (en verde) y los identificadores MID de cada muestra (en varios colores). "V4f-XX" indica un cebador cualquiera y "MIDX" un MID cualquiera de cada uno de los 43 utilizados (**Tabla 63**).



**Figura 23. Esquema de la amplificación PCR piro para *Genome sequencer FLX system*.** Secuencias *forward* o *reverse* que hibridan con el gen 16S (en verde). El MID es el identificador de la muestra (en gris). *Key* es una secuencia de nucleótidos requerida por el sistema antes del cebador específico (en rojo). Cebador líder (en azul) y cebador reverso (en amarillo). Para más información consultar en: <http://www.454.com/glossary/>.

#### 4.4.2 Procesamiento de las secuencias

Las secuencias de las 172 minigenotecas se obtuvieron por pirosecuenciación mediante 454 GS-FLX (Macrogen, Korea, 10F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-gu. Seúl, República de Korea). En la Figura 24 se muestra el promedio de secuencias obtenidas por muestra, en el que se destaca el número tan elevado de secuencias para la muestra de enmienda BC. En cualquier caso, en todas las muestras se superaron las 1000 secuencias. Para el procesamiento de las secuencias que se recibieron en formato *fasta*, se utilizó el programa *Mothur* (Schloss *et al.*, 2009). *Mothur* es un programa bioinformático de libre acceso compatible con Windows que agrupa un gran número de acciones o comandos para la manipulación de secuencias de ácidos nucleicos.



**Figura 24. Número de secuencias por minigenoteca.**

Promedio (n=4) del número de secuencias por cada una de las 43 minigenotecas.

#### 4.4.2.1 Detección y eliminación de secuencias quimera

Las quimeras son secuencias de DNA formadas por fragmentos procedentes de organismos diferentes. Se trata de un artefacto producido por la PCR y, aunque es poco habitual en técnicas de secuenciación masiva, puede producirse especialmente cuando los moldes de DNA que se amplifican poseen una gran similitud entre sí.

Para eliminarlas del archivo de secuencias, utilizamos la aplicación *Uchime* que es un programa informático que usa un algoritmo para la detección de secuencias quiméricas (Edgar *et al.*, 2011). En nuestro caso, se usó la herramienta que tiene *Mothur* para *Uchime* designada con el comando *chimera.uchime* (**Comando 1**):

```
mothur> chimera.uchime(fasta=MMA2.S(0).fasta-MMA2.S(1).fasta-
MMA2.S(2).fasta-MMA2.S(3).fasta-(...), reference=silva.gold.align,
processors=2)
```

#### Comando 1. Detección de secuencias quimeras.

*fasta*=minigenoteca; *reference*=colección de secuencias quimera; *processors*=número de procesadores utilizados.

Este comando cumplió la función de resaltar las posibles secuencias quiméricas. Se usó como referencia una colección de secuencias quiméricas del *Broad institute* (<http://www.broadinstitute.org/>; Massachusetts, EEUU), adaptada para *Mothur* según el alineamiento de la base de datos de SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) denominada *silva.gold.align*. El archivo de salida de esta operación generó dos archivos para cada una de las minigenotecas: uno con la extensión *accnos*, donde se recogen las secuencias marcadas como posibles quimeras y otro con la extensión *chimera*, que es un archivo con todas las secuencias en el que se resaltaron las quimeras. A partir del

archivo *accnos* y ejecutando otro comando se procedió a la retirada de estas secuencias, marcadas como quimeras, del archivo que contenía todas las secuencias.

Para acelerar el proceso de depuración de secuencias quimera, dado el elevado número de minigenotecas (172), se escribió un *script* en lenguaje *Perl* para ejecutar desde la consola de Windows a través de un programa llamado *Strawberry* (<http://strawberryperl.com/>). Este *script* cumplía con la orden de eliminar las secuencias marcadas como quimeras (presentes en el archivo *accnos* de esa misma minigenoteca) de los archivos con todas las secuencias de las minigenotecas (*chimera*). El archivo resultante se encontró limpio de secuencias quimera. Este proceso se aplicó a todos los archivos de secuencias de todas las minigenotecas, obteniéndose 172 archivos en formato *fasta* sin quimeras, listos para poder realizar la clasificación taxonómica.

Para comprobar la eficacia de la depuración de secuencias, de forma paralela al uso de *Uchime*, se procedió a la predicción de quimeras utilizando el programa *Decipher* (<http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimerasOutputs.html>) para obtener otro resultado con el cual contrastar el obtenido con *Uchime*. Los resultados obtenidos con una serie de genotecas fueron muy similares, por lo que optamos por usar el algoritmo proporcionado por *Uchime* a través de *Mothur*, ya que es el método recomendado por *Mothur* y por *Ribosomal Database Project* (RDP; <https://rdp.cme.msu.edu/>) por su mayor sensibilidad.

Como última comprobación, las secuencias marcadas como quimeras fueron también chequeadas aleatoriamente de forma manual con la herramienta de alineamiento local *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), donde se comprobó que aquella secuencia que había sido detectada como quimérica podía ser asignada secuencias pertenecientes a dos organismos incluso de filos distintos.

#### 4.4.3 Clasificación taxonómica de las secuencias

Uno de los procedimientos que se aplicaron a las secuencias obtenidas (libres de quimeras) fue la asignación taxonómica directa de las secuencias (**Figura 25**). Para la asignación taxonómica de las secuencias se utilizó la herramienta web *VAMPS* (*Visualization and Analysis of Microbial Population Structures*; <https://vamps.mbl.edu/>) (*The Josephine Bay Paul Center, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, EEUU*) (Huse *et al.*, 2014). Los archivos de secuencias sin quimeras, en formato *fasta*, se enviaron a *VAMPS* a través de la opción de *Community visualization* para su clasificación mediante el uso de la base de datos RDP con una identidad del 80 % (valores por defecto de *VAMPS*). Los resultados se procesaron con Excel (*Microsoft*). Todos los análisis se relativizaron al 100 % calculándose así la abundancia relativa de cada uno de las asignaciones de la muestra sobre el total de las secuencias con asignación (que fue un 80 % aproximadamente). Esto fue necesario para establecer comparaciones entre las muestras, debido a la heterogeneidad existente en el número de secuencias obtenidas para cada una de las muestras.

#### 4.4.4 Obtención de OTUs

El otro procedimiento aplicado sobre las secuencias fue el de agruparlas en torno a secuencias de referencia (Figura 25). Para ello, en el presente trabajo utilizaremos el término **OTU** (*Operational taxonomic unit*) de la taxonomía numérica tradicional (Sneath y Sokal, 1973) para referirnos a un taxón bacteriano concreto, desde género hasta filo, indistintamente. Estos OTUs fueron utilizados como secuencias de referencia para cada uno de los grupos formados o clústeres de secuencias.

La aplicación *VAMPS* ofrece la opción de clasificar nuestras secuencias en OTUs mediante el método *CROP* (*Clustering 16S rRNA for OTU Prediction*) (Hao *et al.*, 2011), basado en una clasificación *Bayesiana* de las secuencias. Esta opción generó un archivo en formato *fasta* con una serie de secuencias de referencia (OTUs) a partir de las cuales se habían agrupado el resto de secuencias formando clústeres. Posteriormente, estas secuencias de referencia fueron alineadas e identificadas por medio de la opción *Classify* de la página web del servidor *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>), utilizando la taxonomía de *RDP*. Pero, para que *Greengenes* realizara la clasificación de las secuencias hubo que formatear las secuencias para que fueran compatibles con la aplicación web. Para ello, se alinearon en *Mothur*, utilizando el comando *align.seqs*, con la base de secuencias “*core\_set\_aligned.fasta.imputed*” proporcionada por *Greengenes* para que tuvieran el formato *NAST* (*Nearest Alignment Space Termination*) (DeSantis *et al.*, 2006), necesario para el uso de la opción *Classify* en *Greengenes* (**Comando 2**).

---

```
mothur>align.seqs(candidate=CROP750_1050.txt,template=core_set_aligned  
.imputed.fasta,processors=3)
```

---

**Comando 2. Conversión de las secuencias referencia en formato NAST para la clasificación en *Classify* de *Greengenes*.**

*candidate*=secuencia de referencia objetivo; *template*=secuencia modelo en formato *NAST*; *processors*=número de procesadores utilizados.

---

*Greengenes* asignó a cada secuencia de referencia un OTU (organismo) concreto, por lo que finalmente se confirió una identidad a las secuencias obtenidas dentro de un mismo clúster (OTU). Tras la asignación de *Greengenes* se desecharon las secuencias de referencia que no fueron asignadas a ningún OTU (3,1 % de las secuencias) y aquellas que fueron asignadas al OTU *117 Unclassified* (7,1 %) (**Figura 25**). Posteriormente, mediante un proceso de criba se realizó una selección de aquellos OTUs más relevantes en nuestro estudio.

##### 4.4.4.1 Procedimientos para la selección de OTUs: criba

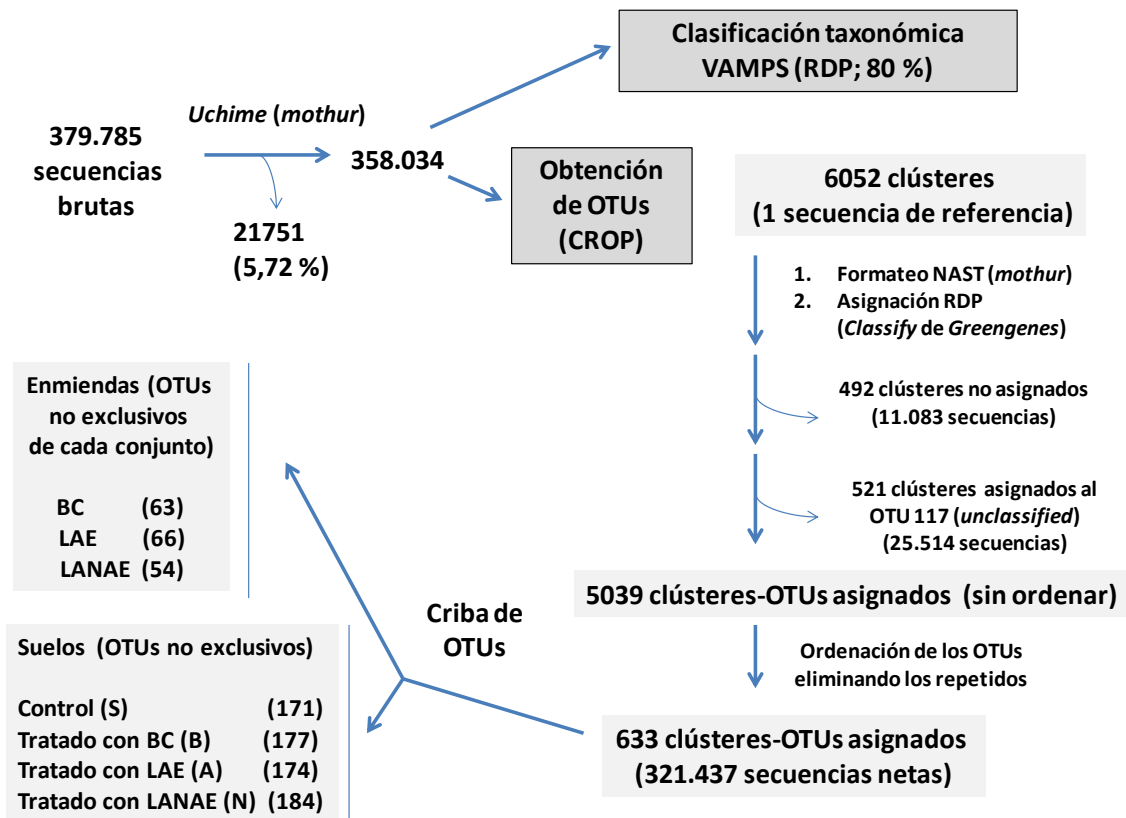
Con el fin de seleccionar aquellos OTUs que mostraron una mayor representación en número y un mayor reparto entre minigenotecas, se aplicaron los siguientes criterios en un proceso que hemos denominado como **criba**.

Criterios aplicados en la criba:

**-Criterio de cantidad absoluta:** El OTU que pasó esta selección estuvo respaldado por un mínimo de 10 secuencias en el conjunto de todos los muestreos de ese tipo de enmienda o suelo.

**-Criterio de representatividad:** las secuencias de ese OTU estuvieron presentes en al menos 3 de las 4 minigenotecas de la misma muestra en un muestreo concreto.

De esta manera, al pasar esta criba, se seleccionó cualquier OTU que tuviese importancia en términos de representación y que ostentara en términos de abundancia un número de secuencias suficiente en algún muestreo del experimento.



**Figura 25. Esquema del procesamiento de las secuencias.**

Las secuencias siguieron dos procedimientos en función del tipo de análisis: Clasificación taxonómica o la obtención de OTUs.

Con este proceso de selección se logró una reducción considerable del número de OTUs, estimada en un 25-40 % de los OTUs de las enmiendas y cercana al 45 % de los OTUs de las muestras de suelo. El número de OTUs final que se manejó a partir de entonces fue de 63, 66 y 54 para BC, LAE y LANAE, respectivamente, y de 171, 177, 174 y 184 para los suelos S, B, A y N, respectivamente, todos ellos presentes en las muestras mencionadas, pero no de forma exclusiva, ya que pudieron formar parte de varias muestras al mismo tiempo (**Figura 25**).

#### 4.4.5 Terminología utilizada para el análisis de las secuencias y de los OTUs

**Alteración, cambio o diferencia:** aquella cualidad taxonómica del suelo tratado (B, A o N) (abundancia relativa, de una secuencia o de un OTU) cuyo valor difiere de forma estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) con respecto al valor de la misma cualidad del suelo control de referencia (S). Las alteraciones pueden tener dos **tendencias: Incrementada**, cuando el valor de la cualidad de la muestra tratada supera al del suelo control, e **inhibida** cuando se encuentra por debajo de éste. En referencia al momento en el que se manifiesta dicha alteración puede ser **temprana** si lo hace dentro de los primeros 4 muestreos (primer año) y **tardía** si se manifiesta posteriormente. Esta clasificación temporal se basó en el análisis realizado a distintos niveles taxonómicos, donde se observa que los cambios registrados en los primeros 4 muestreos (muestreos del 0 al 3) fueron los más importantes, porque a partir del cuarto muestreo se produce una inflexión en el número de cambios totales en las clases bacterianas (las cuales constituyen un nivel taxonómico suficientemente sensible a los cambios, como se comprueba en la mayor parte de los estudios taxonómicos publicados). Una razón adicional fue que con estos 4 muestreos se cumple un año desde la aplicación de la enmienda (un ciclo hidrológico con sus 4 estaciones climáticas).

Con respecto a su *grado de aparición* la alteración puede ser **exclusiva**, cuando aparece en un solo tratamiento o **común** cuando aparece en más de un suelo tratado.

<b>Acidobacteria</b>
<b>Actinobacteria</b>
<b>Bacteroidetes</b>
<b>Chloroflexi</b>
<b>Cyanobacteria</b>
<b>Deinococcus-Thermus</b>
<b>Firmicutes</b>
<b>Gemmatimonadetes</b>
<b>Nitrospira</b>
<b>Planctomycetes</b>
<b>Proteobacteria</b>
<b>Synergistetes</b>
<b>Verrucomicrobia</b>

**Tabla 16. Asignación de colores para los distintos filos bacterianos.**

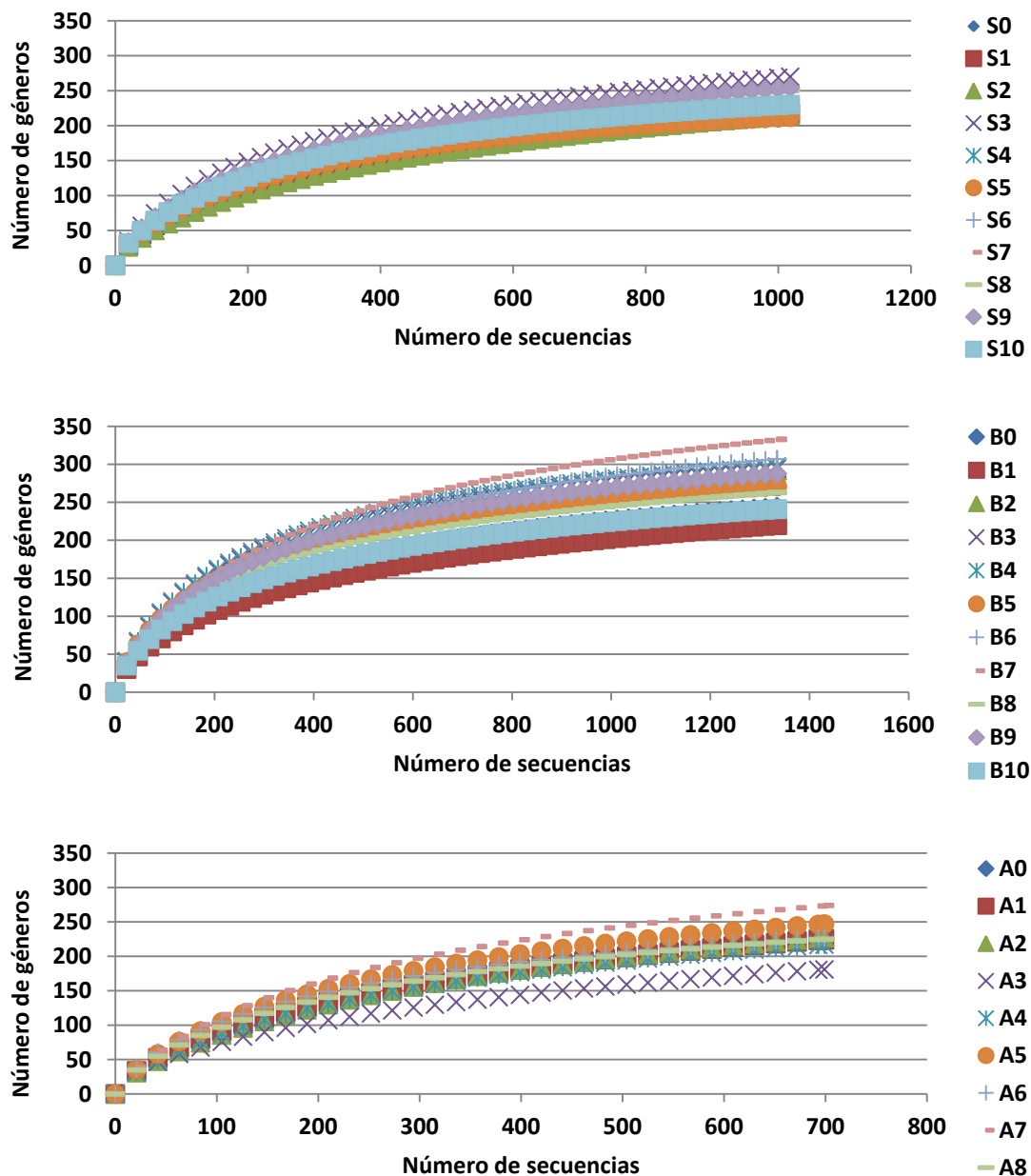
Esta asignación se utiliza durante todo el trabajo para referirnos a los distintos filos clases o taxones inferiores de bacterias que los integran, incluidos los OTUs.

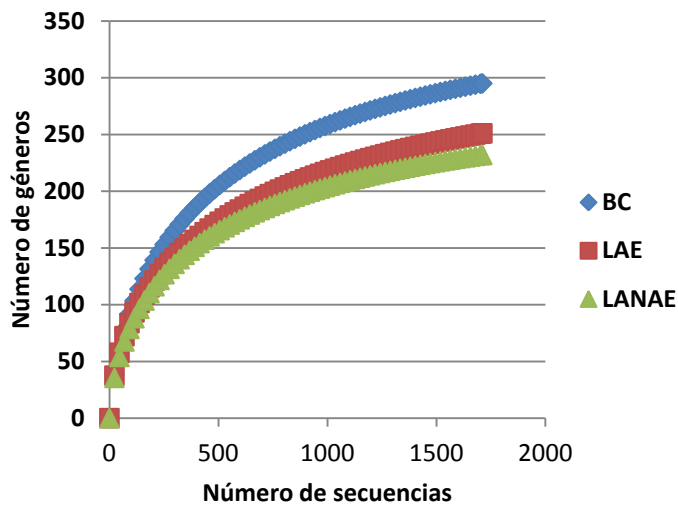
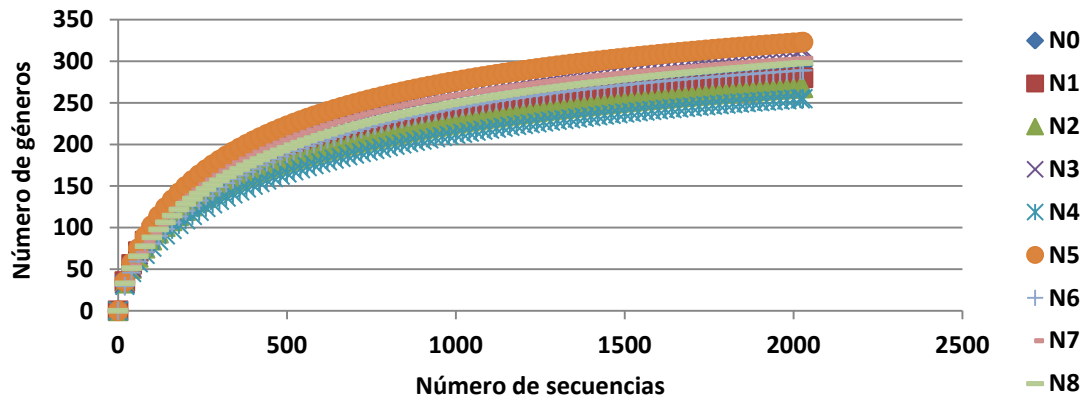
#### 4.4.6 Tratamientos estadísticos

Los procedimientos estadísticos del análisis se detallan en el apartado 2.4.7 Tratamientos estadísticos (Capítulo II). Las matrices de correlación se encuentran en el **ANEXO 4 (Tabla 60, Tabla 61 y Tabla 62)**

#### 4.4.7 Validación del esfuerzo de muestreo mediante curvas de rarefacción

En la **Figura 26** se muestran las curvas de rarefacción de los distintos tratamientos (suelos B, A y N), del suelo control (suelo S) y de las enmiendas orgánicas (BC, LAE y LANAE). En ellas se puede apreciar que se alcanzó prácticamente una asíntota en las curvas, ya que la identificación de géneros bacterianos nuevos no se incrementó de manera significativa al incrementarse el número de secuencias analizadas. Esto significa que el número de secuencias observadas fue suficiente para describir la diversidad de las muestras mediante el método empleado.





**Figura 26. Curvas de rarefacción del suelo control (S), suelos enmendados (B, A y N) y residuos orgánicos.** Se representan las curvas de rarefacción conjuntas de todos los muestreos de cada tipo de suelo. Suelo control (S), suelos tratados (B, A y N) y residuos orgánicos (BC, LAE y LANAE), respectivamente. Se muestra el número de *géneros* de bacterias distintos, descritos tras la comparación de las secuencias obtenidas con las bases de datos.

## 4.5 Resultados

En primer lugar, describimos las poblaciones bacterianas presentes en las enmiendas antes de ser aplicadas al suelo. Posteriormente, mostramos el análisis de la composición bacteriana del suelo control (S) y de los tratados con enmiendas (B, A y N). Esta descripción se realizó a nivel de filo y de clase bacteriana. A partir de los resultados más generales, se representaron aquellos cuyos grupos bacterianos mostraron los comportamientos más destacables. Por último, se analizaron los OTUs más relevantes presentes en las enmiendas.

### 4.5.1 Análisis microbiológico de los residuos orgánicos

Los residuos orgánicos procedentes de la depuración de las aguas residuales urbanas o del compostaje de los residuos sólidos urbanos están compuestos por un elevado número de microorganismos. En este sentido, consideramos fundamental conocer la composición microbiana de las enmiendas añadidas al suelo control, dado que algunos de los microorganismos presentes en las mismas podrían indicar su uso en el suelo.

#### 4.5.1.1 Filos bacterianos presentes en las enmiendas

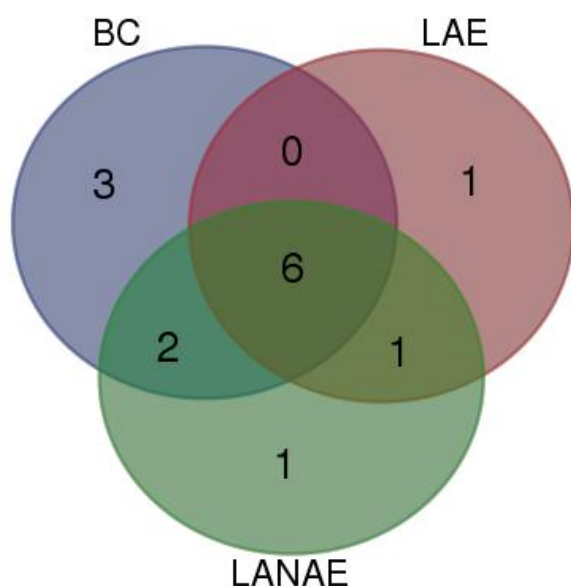
A partir de la identificación de las secuencias obtenidas de las enmiendas orgánicas, por comparación con las bases de datos se obtuvo la composición de los filos presentes en la basura compostada (BC), en el lodo aerobio (LAE) y en el lodo anaerobio (LANAE) (Tabla 17).

Filo	BC		Filo	LAE		Filo	LANAE	
<b>Acidobacteria</b>	4,49	2,52				<b>Acidobacteria</b>	0,27	0,06
<b>Actinobacteria</b>	3,71	0,29	<b>Actinobacteria</b>	11,59	0,62	<b>Actinobacteria</b>	1,57	0,18
<b>Bacteroidetes</b>	5,91	0,28	<b>Bacteroidetes</b>	0,74	0,05	<b>Bacteroidetes</b>	5,46	0,50
<b>Chloroflexi</b>	0,05	0,04	<b>Chloroflexi</b>	2,05	0,32	<b>Chloroflexi</b>	16,50	1,02
<b>Deinococcus-Thermus</b>	3,69	0,48						
<b>Firmicutes</b>	53,85	10,80	<b>Firmicutes</b>	53,94	0,89	<b>Firmicutes</b>	50,37	1,23
<b>Gemmatimonadetes</b>	1,27	0,74						
<b>Nitrospira</b>	0,08	0,05						
<b>Planctomycetes</b>	2,77	1,51	<b>Planctomycetes</b>	0,57	0,15	<b>Planctomycetes</b>	3,46	0,63
<b>Proteobacteria</b>	23,13	6,15	<b>Proteobacteria</b>	30,68	1,16	<b>Proteobacteria</b>	19,63	1,36
						<b>Spirochaetes</b>	0,05	0,05
			<b>Synergistetes</b>	0,17	0,06	<b>Synergistetes</b>	2,38	0,33
<b>Verrucomicrobia</b>	1,02	0,60				<b>Verrucomicrobia</b>	0,24	0,15
			<b>TM7</b>	0,26	0,05			

**Tabla 17. Composición de los filos bacterianos presentes en las enmiendas orgánicas.** Valores medios (n=4) de la abundancia relativa porcentual, representados con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar medio se representa en la columna adyacente. BC, basura compostada, LAE, lodo aerobio, LANAE, lodo anaerobio.

La abundancia relativa de los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria* supuso cerca de tres cuartas partes de la abundancia total de cada una de las enmiendas. En el lodo aerobio (LAE) no solo estos dos filos fueron los más importantes, sino que *Actinobacteria* también mostró una abundancia relativa elevada (11,59 %). Por otro lado, en la composición del lodo anaerobio (LANAE), los filos *Chloroflexi* (16,50 %), *Planctomycetes* (3,46 %) y *Synergistetes* (2,38 %) mostraron valores de abundancia más elevados que en el resto de los residuos. En cambio, en la basura compostada (BC) los filos bacterianos *Acidobacteria* (4,49 %), *Deinococcus-Thermus* (3,69 %), *Gemmatimonadetes* (1,27 %) y *Nitrospira* (0,08 %) mostraron una presencia exclusiva en este tipo de enmienda (**Tabla 17**).

En la **Figura 27** se agrupan los filos en varios conjuntos, en función de su detección en varias enmiendas al mismo tiempo (comunes) o no (exclusivos). Se aprecia que los filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Firmicutes* y *Chloroflexi* se detectaron en las tres enmiendas (intersección con valor 6), mientras que los filos *Acidobacteria* y *Verrucomicrobia* fueron observados solamente en BC y LANAE (intersección con valor 2). En cambio, el filo *Synergistetes* fue un filo bacteriano típico de lodos (LAE y LANAE) (intersección con valor 1). Pero además, se observaron filos específicos de algunas enmiendas, como los filos *Deinococcus-Thermus*, *Nitrospira* y *Gemmatimonadetes* en BC (3), el filo *TM7* en LAE (1) o el filo *Spirochaetes* en LANAE (1).



**Figura 27. Filos bacterianos comunes y exclusivos presentes en las distintas enmiendas utilizadas.**

El diagrama de Venn se realizó con los datos de la **Tabla 17** usando la aplicación disponible en la página web del instituto VIB (Gante, Bélgica) <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

#### 4.5.1.2 Clases bacterianas presentes en las enmiendas

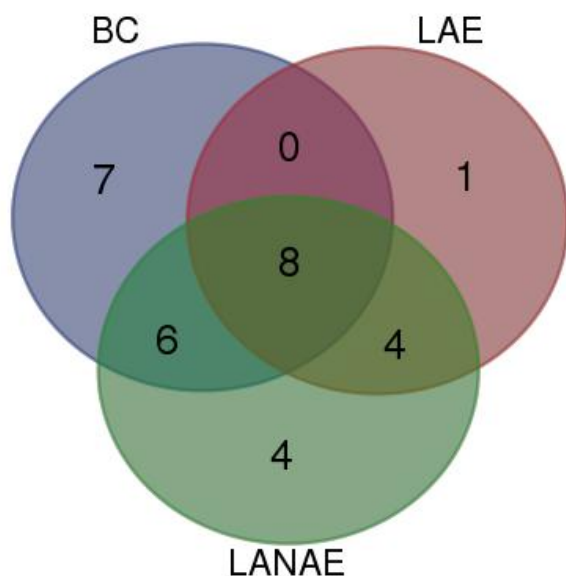
En la enmienda BC, la proporción de bacterias de la clase *Bacilli* (52,34 % del total de las clases) supuso casi la totalidad de la abundancia del filo *Firmicutes* (97,2 % del total del filo). Sin embargo, en los lodos LAE y LANAE al contrario que en BC, la clase *Clostridia* fue la que mostró una abundancia relativa predominante, especialmente en LANAE (48,13 %) donde apenas se detectó la clase *Bacilli* (0,12 %). Otro aspecto destacable fue la ausencia de secuencias correspondientes a las bacterias de las clases del filo *Acidobacteria* y *Verrucomicrobia* en LAE y casi indetectables en LANAE, abundantes, sin embargo, en la enmienda BC. En el lodo LAE, la abundancia relativa de las clases *Actinobacteria* (11,59 %) y *Alphaproteobacteria* (24,16 %) fue especialmente superior. Mientras que en el caso del lodo LANAE, la presencia de las clases *Anaerolineae* (18,01 %) y *Deltaproteobacteria* (12,76 %) fue característica en su composición (**Tabla 18**).

Clase	BC		Clase	LAE		Clase	LANAE	
						<b>Gp18</b>	0,01	0,01
<b>Gp3</b>	0,39	0,20				<b>Gp3</b>	0,02	0,02
<b>Gp4</b>	0,95	0,55						
<b>Gp6</b>	2,72	1,54				<b>Gp6</b>	0,09	0,04
<b>Gp7</b>	0,20	0,15				<b>Gp7</b>	0,17	0,07
<b>Actinobacteria</b>	3,71	0,29	<b>Actinobacteria</b>	11,59	0,62	<b>Actinobacteria</b>	1,72	0,18
<b>Flavobacteria</b>	4,22	0,95						
			<b>Bacteroidia</b>	0,63	0,09	<b>Bacteroidia</b>	2,67	0,38
<b>Sphingobacteria</b>	1,27	0,60	<b>Sphingobacteria</b>	0,01	0,01	<b>Sphingobacteria</b>	0,28	0,06
<b>Deinococci</b>	3,69	0,48						
			<b>Anaerolineae</b>	1,99	0,31	<b>Anaerolineae</b>	18,01	1,02
			<b>Thermomicrobia</b>	0,02	0,02			
						<b>Cyanobacteria</b>	0,02	0,02
<b>Bacilli</b>	52,34	10,39	<b>Bacilli</b>	14,53	0,81	<b>Bacilli</b>	0,12	0,06
<b>Clostridia</b>	0,99	0,44	<b>Clostridia</b>	38,19	0,99	<b>Clostridia</b>	48,73	1,49
			<b>Erysipelotrichi</b>	0,54	0,15	<b>Erysipelotrichi</b>	0,87	0,15
<b>Gemmatimonadetes</b>	1,27	0,74						
<b>Nitrospira</b>	0,08	0,05						
<b>Planctomycetacia</b>	2,77	1,51	<b>Planctomycetacia</b>	0,57	0,15	<b>Planctomycetacia</b>	3,79	0,63
<b>Alphaproteobacteria</b>	7,72	3,22	<b>Alphaproteobacteria</b>	24,16	1,59	<b>Alphaproteobacteria</b>	4,67	0,64
<b>Betaproteobacteria</b>	7,06	0,97	<b>Betaproteobacteria</b>	2,61	0,31	<b>Betaproteobacteria</b>	2,61	0,23
<b>Deltaproteobacteria</b>	0,88	0,46				<b>Deltaproteobacteria</b>	12,76	0,73
<b>Gammaproteobacteria</b>	6,50	1,09	<b>Gammaproteobacteria</b>	3,76	0,32	<b>Gammaproteobacteria</b>	0,53	0,07
						<b>Spirochaetes</b>	0,06	0,05
			<b>Synergistia</b>	0,17	0,06	<b>Synergistia</b>	2,60	0,33
<b>Opitutae</b>	0,14	0,08						
<b>Spartobacteria</b>	0,19	0,13						
<b>Subdivision3</b>	0,35	0,21				<b>Subdivision3</b>	0,18	0,10
						<b>Subdivision5</b>	0,06	0,03
<b>Verrucomicrobiae</b>	0,17	0,14				<b>Verrucomicrobiae</b>	0,03	0,03

**Tabla 18. Composición de las clases bacterianas presentes en las enmiendas orgánicas.**

Valores medios (n=4) de la abundancia relativa porcentual, representados con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar medio se representa en la columna adyacente. Basura compostada (BC), lodo aerobio (LAE) y lodo anaerobio (LANAE).

Aunque sus proporciones fueron distintas, en cada tipo de enmienda se detectaron ocho clases bacterianas comunes a todas las enmiendas (intersección central con 8 clases en la **Figura 28**): *Alphaproteobacteria*, *Planctomycetacia*, *Sphingobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Clostridia*, *Bacilli* y *Gammaproteobacteria*.



**Figura 28. Clases bacterianas comunes o exclusivas presentes en las distintas enmiendas utilizadas.**

El diagrama de Venn se realizó con los datos de la **Tabla 18** usando la aplicación disponible en la página web del instituto VIB (Gante, Bélgica) <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

Entre las enmiendas BC y LANAE se detectaron 6 clases bacterianas en común: *Gp7*, *Verrucomicrobiae*, *Deltaproteobacteria*, *Subdivision3*, *Gp3* y *Gp6*, varias de ellas de los filos *Acidobacteria* y *Verrucomicrobia*. Y entre los dos tipos de lodos (LAE y LANAE) se detectaron cuatro: *Synergistia*, *Erysipelotrichi*, *Bacteroidia* y *Anaerolineae*. Por otro lado, existen clases bacterianas detectadas de forma exclusiva en cada enmienda, siendo BC la que mayor número mostró (7): *Gp4*, *Deinococci*, *Flavobacteria*, *Spartobacteria*, *Nitrospira*, *Gemmatimonadetes* y *Opitutae*. Por su parte, de manera exclusiva, en los lodos se detectó la presencia de una clase en LAE: *Thermomicrobia* y 4 clases en LANAE: *Subdivision5* (*Verrucomicrobia*), *Cyanobacteria*, *Spirochaetes* y *Gp18*.

### 4.5.1.3 Descripción de los OTUs bacterianos presentes en las enmiendas

Las secuencias fueron agrupadas en OTUs (*Operational Taxonomic Units*), los cuales mostraron los organismos más relevantes presentes en los residuos orgánicos. Como se puede observar en el listado de la **Tabla 19**, la abundancia relativa de los dos primeros OTUs de cada enmienda representó entre un 25 % y un 40 % de la abundancia relativa total. El resto de los OTUs mostrados, aproximadamente a partir del tercer OTU más abundante de cada enmienda, mostraron una abundancia por debajo del 10 %, siendo éste el principal motivo por el cual se decidió presentar solamente los nueve OTUs más abundantes.

OTU	BC	OTU	LAE	OTU	LANAE			
805	<i>Planococcaceae (Bacilli)</i>	32,17	805	<i>Planococcaceae (Bacilli)</i>	13,80	658	<i>Anaerolineaceae (Chlor.)</i>	17,10
758	<i>Bacillus</i>	9,93	1122	<i>Rhodoplanes (Alphaprot.)</i>	13,42	1017	<i>Clostridia</i>	17,04
1058	<i>Planctomycetaceae</i>	4,71	876	<i>Peptostreptococcus (Clostri.)</i>	7,16	969	<i>Clostridiales</i>	9,70
1334	<i>Alcaligenaceae (Betap.)</i>	4,68	154	<i>Actinomyces</i>	6,17	1548	<i>Syntrophaceae (Deltapr.)</i>	7,33
763	<i>Geobacillus (Bacilli)</i>	4,51	898	<i>Clostridium</i>	6,14	877	<i>Sporacetigenium (Clostri.)</i>	6,29
675	<i>Truepera (D-Therm.)</i>	4,46	969	<i>Clostridiales</i>	5,75	934	<i>Anaerovorax (Clostri.)</i>	5,85
611	<i>Salinimicrobium (Bactero.)</i>	4,28	1205	<i>Rhodobacter (Alphapr.)</i>	3,98	846	<i>Eubacteriaceae (Clostri.)</i>	4,06
773	<i>Oceanobacillus (Bacilli)</i>	3,86	934	<i>Anaerovorax (Clostridia)</i>	3,64	898	<i>Clostridium</i>	3,25
136	<i>Gp6</i>	3,67	1157	<i>Rhizobiales (Alphapr.)</i>	3,64	1058	<i>Planctomycetaceae</i>	2,70
<b>Total abundancia relativa</b>		72,25	<b>Total abundancia relativa</b>		63,70	<b>Total abundancia relativa</b>		73,32

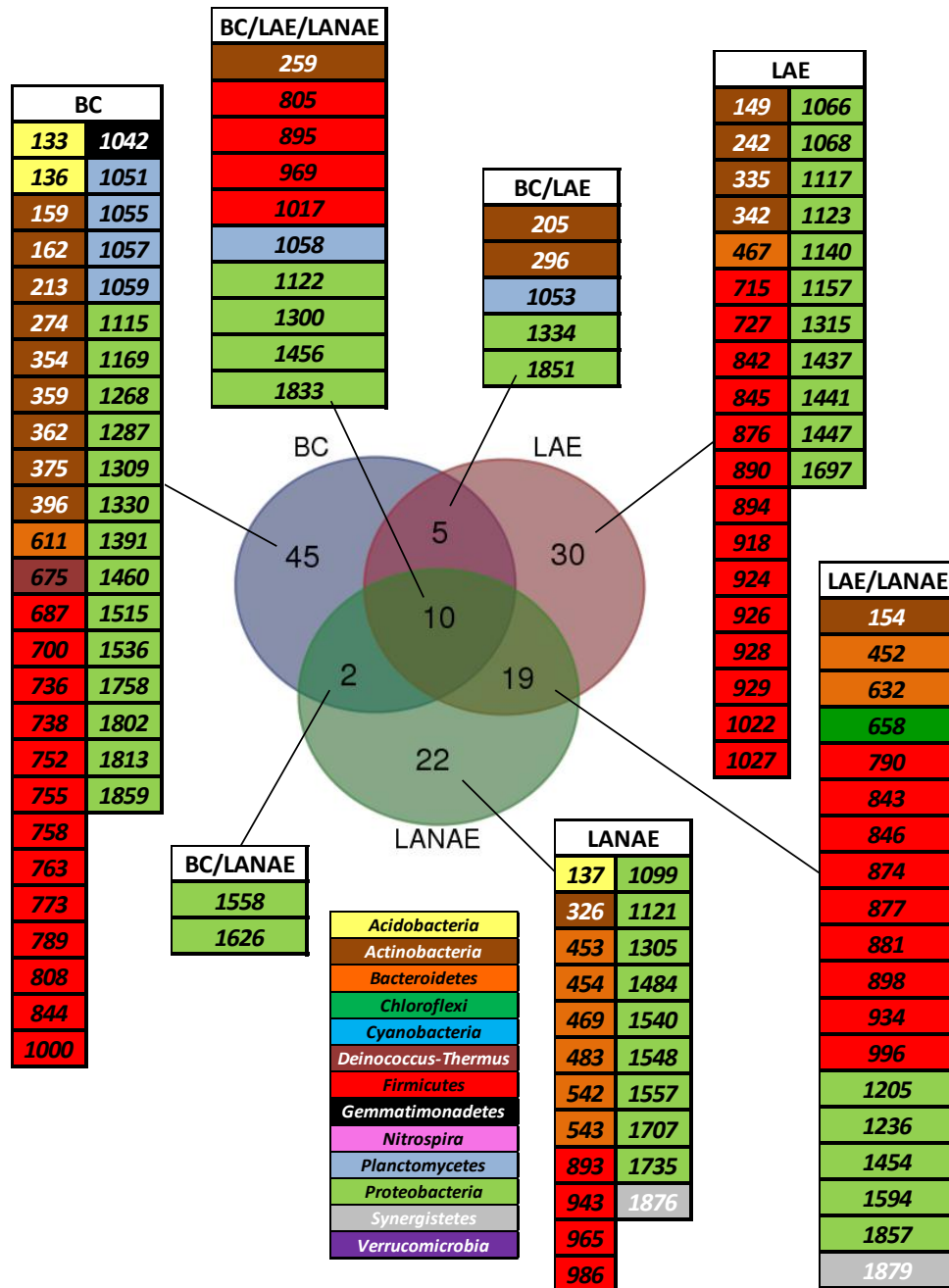
**Tabla 19. OTUs con mayor abundancia relativa en las enmiendas.**

Valores medios (n=4) de la abundancia relativa porcentual de los OTUs más abundantes de las tres enmiendas, ordenados de mayor a menor.

Aunque los OTUs predominantes correspondieron al filo *Firmicutes*, la distribución de los mismos fue diferente en cada enmienda. Así, los OTUs de la clase *Bacilli* (805 y 758) destacaron en BC. En cambio en LAE los OTUs fueron tanto de las clases *Bacilli* como de *Clostridia* (805 y 876). Los OTUs de la clase *Clostridia* fueron predominantes en LANAE (1017 y 969). Este resultado coincidió con el del análisis de las clases bacterianas (**Tabla 18**). Por otra parte, los OTUs de las clases del filo *Proteobacteria* también son abundantes pero con una distribución diferente. Así, en BC se observó un OTU de la clase *Betaproteobacteria* (1334), en LAE varios de la clase *Alphaproteobacteria* (1122, 1205 y 1157) y en LANAE de la clase *Deltaproteobacteria* (1548). Además de estos dos grupos más predominantes, el OTU 658 (familia *Anaerolineaceae*; filo *Chloroflexi*) fue detectado en ambos lodos (LAE y LANAE), pero con una mayor abundancia en el LANAE (17,10 %).

Además del análisis de los OTUs más abundantes de cada una de las enmiendas, se han determinado los OTUs comunes y exclusivos de los diferentes residuos independientemente de su abundancia relativa (**Figura 29**). Mediante este enfoque, de combinaciones de OTUs exclusivos y comunes, se observó la composición general de los OTUs en las diferentes enmiendas orgánicas. Se pudo destacar que los OTUs de *Proteobacteria* estuvieron presentes en todas las combinaciones. Aparte de *Proteobacteria*, en la combinación de las tres enmiendas se observaron OTUs de los filos *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*. Como se observó en el análisis de los filos y las clases, los OTUs de *Acidobacteria* se detectaron en las enmiendas BC y

LANAE. En los grupos de lodos (LAE/LANAE) se observaron OTUs del filo *Synergistetes* (1879) y la presencia del OTU 658 *Chloroflexi*. También destacaron los OTUs 675 de *Deinococcus-Thermus* y 1042 *Gemmatimonadetes* en BC. El rigor de los criterios de selección de los OTUs contribuyó a que no aparecieran OTUs del filo *Verrucomicrobia*, a pesar de haberse observado secuencias de este grupo de bacterias en el análisis de los fillos.



**Figura 29. OTUs comunes o exclusivos en las enmiendas utilizadas.**  
 Distribución de los OTUs en función de su presencia en una o en varias enmiendas. El diagrama de Venn se realizó con la aplicación disponible en la web del instituto VIB (Gante, Bélgica) <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

## 4.5.2 ¿Cuál fue la variación general de los grupos bacterianos?

Las secuencias obtenidas mediante pirosecuenciación permitieron describir molecularmente la estructura de las poblaciones bacterianas de los suelos tratados con residuos orgánicos y, por tanto, cuantificar los cambios de abundancia relativa de los distintos grupos taxonómicos a lo largo del tiempo. A partir de la abundancia relativa porcentual, se determinaron las diferencias estadísticamente significativas de cada uno de los filos y clases bacterianas entre los suelos enmendados (B, A y N) y el suelo control (S), a lo largo de 11 muestreos en el caso del suelo tratado con basura compostada BC (**Tabla 53 y Tabla 54**) y de 9 muestreos en los suelos tratados con lodos LAE (**Tabla 55 y Tabla 56**) y LANAE (**Tabla 57 y Tabla 58**). Los resultados detallados se incluyen en el **ANEXO 3**.

Frente a la variabilidad encontrada en este análisis, hemos preferido realizar un análisis global promedio de la diferencia de la abundancia relativa de filos y clases con el fin de hallar resultados más relevantes que nos permitieran definir mejor los cambios de las poblaciones a nivel general. Hay que tener en cuenta que al realizar el análisis de esta manera se pierde el componente temporal y los grandes cambios ocurridos en algún periodo específico del año pudieron enmascarar algunas alteraciones pequeñas.

### 4.5.2.1 Variación general de los filos bacterianos

Las diferencias porcentuales de las abundancias relativas en los suelos tratados con respecto al suelo control (ratio %) indican que las poblaciones bacterianas variaron en términos generales en los suelos tratados (Tabla 20). La abundancia relativa media de algunos filos bacterianos como *Acidobacteria*, *Actinobacteria* y *Planctomycetes* disminuyó en todos los suelos tratados. Por el contrario, la abundancia relativa media de las bacterias del filo *Deinococcus-Thermus*, *Nitrospira* y *Proteobacteria* se incrementó de forma general. El resto de los filos mostraron diferentes comportamientos en función de la enmienda que se adicionó al suelo. Por ejemplo, la abundancia del filo *Bacteroidetes* sufrió un incremento en el suelo B, mientras que disminuyó en los suelos A y N. En cambio, la abundancia del filo *Firmicutes* descendió en el suelo B y se incrementó cuando se añadieron los lodos (suelos A y N). Por otro lado, la abundancia media del filo *Chloroflexi* se redujo muy levemente en los suelos B y A, mientras que en el suelo N se observó lo contrario, un aumento notable (128,9 %). La abundancia media porcentual del filo *Cyanobacteria* disminuyó de forma muy marcada en los suelos B (-87,6 %) y N (-79,8 %), mientras que se incrementó en el suelo A. Las diferencias de los valores de abundancia relativa correspondientes al filo *Gemmatimonadetes* fueron variables dependiendo del tipo de tratamiento, pero sin mostrar variaciones muy destacables. La abundancia media del filo *Verrucomicrobia* se incrementó especialmente en los suelos B, mientras que en el suelo A se produjo un descenso moderado y en los suelos N apenas cambió. Se puede destacar la presencia exclusiva de las bacterias del filo *Synergistetes* en los muestreos de suelo N.

Suelo tratado con BC			
Filo	S	B	ratio %
<i>Acidobacteria</i>	26,69	23,32	-12,6
<i>Actinobacteria</i>	3,82	3,23	-15,3
<i>Bacteroidetes</i>	2,12	2,99	41,2
<i>Chloroflexi</i>	0,25	0,25	-0,7
<i>Cyanobacteria</i>	0,72	0,09	-87,6
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,13	0,18	43,9
<i>Firmicutes</i>	6,74	5,06	-24,9
<i>Gemmatimonadetes</i>	4,25	4,63	9,0
<i>Nitrospira</i>	0,21	0,31	47,0
<i>Planctomycetes</i>	8,85	6,52	-26,3
<i>Proteobacteria</i>	44,45	50,23	13,0
<i>Synergistetes</i>	0	0	0,0
<i>Verrucomicrobia</i>	1,68	3,09	84,6

Suelo tratado con LAE			
	S	A	ratio %
<b>A</b>	24,42	20,21	-17,2
<b>A</b>	4,17	3,16	-24,2
<b>B</b>	2,14	1,79	-16,4
<b>C</b>	0,28	0,27	-6,7
<b>C</b>	0,85	1,52	78,5
<b>D</b>	0,14	0,20	46,5
<b>F</b>	6,61	7,43	12,4
<b>G</b>	3,53	3,65	3,5
<b>N</b>	0,17	0,38	122,0
<b>P</b>	9,32	8,71	-6,6
<b>P</b>	46,66	51,15	9,6
<b>S</b>	0	0	0,0
<b>V</b>	1,63	1,41	-13,3

Suelo tratado con LANAE			
	S	N	ratio %
<b>A</b>	24,42	17,97	-26,4
<b>A</b>	4,17	3,30	-20,9
<b>B</b>	2,14	1,55	-27,5
<b>C</b>	0,28	0,65	128,9
<b>C</b>	0,85	0,17	-79,8
<b>D</b>	0,12	0,29	134,4
<b>F</b>	6,61	13,18	99,4
<b>G</b>	3,53	3,15	-10,6
<b>N</b>	0,17	0,41	140,5
<b>P</b>	9,32	6,85	-26,6
<b>P</b>	46,66	50,63	8,5
<b>S</b>	0	0,40	100,0
<b>V</b>	1,63	1,68	3,3

**Tabla 20. Abundancia media de los filos de los suelos enmendados en todos los muestreos.**

Abundancia relativa porcentual media de los filos bacterianos de los muestreos de suelo control (S) y los suelos tratados (S-B, n=11; S-A, n=9; S-N, n=9) coloreadas en función de si hubo un incremento o una disminución. La columna "ratio %" contiene la variación porcentual del suelo tratado respecto del suelo control. Las variaciones negativas se muestran en azul, las variaciones cercanas a cero en blanco y las variaciones positivas en rojo. Las letras representan la inicial de cada filo bacteriano.

#### 4.5.2.2 Variación general de las *clases bacterianas*

Aunque la abundancia media de todas las clases bacterianas sufrió alguna modificación en términos generales, solamente la abundancia relativa media de las clases *Alphaproteobacteria*, *Deinococci*, *Nitrospira* y *Verrucomicrobiae* se incrementó en más de un 10 % en los tres suelos enmendados. También se pueden destacar otros cambios relevantes no tan generales. Por ejemplo, en los suelos tratados B y A, se detectó un incremento superior al 10 % de la abundancia media de las clases bacterianas *Gp7* y *Spartobacteria*. Por otra parte, la presencia relativa de las clases bacterianas *Subdivision3* (del filo *Verrucomicrobia*) y *Gp10* se incrementó en los suelos B y N. En los suelos tratados con lodos, suelos A y N, se observó el incremento de las clases bacterianas *Erysipelotrichi*, *Clostridia*, *Gammaproteobacteria* y *Thermomicrobia*. La abundancia media de las clases *Flavobacteria*, *Sphingobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Opitutae* y *Chloroflexi* aumentó de forma exclusiva en los suelos B, mientras que la abundancia de la clase *Cyanobacteria* lo hizo solamente en los suelos A. En el caso de los suelos N, las clases cuya abundancia se incrementó de forma más destacada fueron *Synergistia*, *Epsiloproteobacteria* y *Anaerolineae* (**Tabla 21**).

Por el contrario, la abundancia relativa media de algunas clases bacterianas como *Caldilineae*, *Actinobacteria* y varias del filo *Acidobacteria* (*Gp1*, *Gp3*, *Gp5*, *Gp6*, *Gp9* y *Gp17*) disminuyó en más de un 10 % cuando se añadieron cualquiera de los tres residuos orgánicos. La presencia de bacterias de la clase *Anaerolineae* en los suelos B y A, *Planctomycetacia* y *Cyanobacteria* en los suelos B y N, y *Deltaproteobacteria*, *Flavobacteria*, *Sphingobacteria* y *Opitutae* en los suelos tratados con lodos (A y N) también disminuyó. De una manera exclusiva se observó un descenso superior al 10 % de la abundancia de las clases bacterianas *Clostridia* en los suelos B, *Subdivision3* (filo *Verrucomicrobia*) en los suelos A y *Gp4*, *Spartobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *Chloroflexi* en los suelos N (**Tabla 21**).

En resumen, se puede decir que la mayor parte de las clases del filo *Acidobacteria* sufrieron una disminución general de su abundancia media cuando se aplicaron las enmiendas en el suelo. La abundancia media de las clases *Actinobacteria* y *Planctomycetacia* también disminuyó al igual que la abundancia media de sus respectivos fillos. En el nivel taxonómico de clase bacteriana se puede observar que *Bacilli* y *Deltaproteobacteria* también sufrieron un descenso de su abundancia media en los tres suelos tratados, aunque la abundancia de sus fillos bacterianos no disminuyera, lo que indica que algunos fillos haya que estudiarlos en función de las clases que lo componían. Por otro lado, la abundancia relativa media de las clases *Deinococci*, *Nitrospira*, *Alphaproteobacteria* y *Verrucomicrobiae* se incrementó de forma general en los tres suelos enmendados. La abundancia media de algunas clases bacterianas a lo largo de todos los muestreos en los suelos tratados podría marcar el uso de un determinado tratamiento en el suelo, por ejemplo, la de la clase *Synergistia* en los suelos N o la clase *Erysipelotrichi* en los suelos tratados con lodos (suelos A y N). No obstante, para lograr una mayor precisión, su estudio ha de realizarse muestreo a muestreo.

Suelo tratado con BC				Suelo tratado con LAE				Suelo tratado con LANAE			
Clase	S	B	ratio %		S	A	ratio %		S	N	ratio %
Gp1	0,34	0,10	-70,8	G	0,33	0,19	-43,1	G	0,33	0,08	-77,2
Gp10	0,73	1,09	48,8	G	0,63	0,59	-5,8	G	0,63	1,14	82,3
Gp17	0,81	0,46	-43,2	G	0,59	0,47	-19,4	G	0,59	0,26	-55,0
Gp25	0,21	0,06	-69,6	G	0,19	0,17	-9,5	G	0,19	0,13	-30,6
Gp3	2,33	1,46	-37,5	G	2,64	1,61	-38,9	G	2,64	1,29	-51,3
Gp4	2,56	2,73	6,6	G	2,38	2,44	2,3	G	2,38	1,58	-33,5
Gp5	0,70	0,33	-52,8	G	0,60	0,31	-47,6	G	0,60	0,24	-60,3
Gp6	17,47	15,61	-10,6	G	15,78	13,15	-16,7	G	15,78	12,13	-23,1
Gp7	1,04	1,27	22,2	G	0,89	1,02	15,2	G	0,89	0,87	-1,7
Gp9	0,13	0,07	-45,3	G	0,10	0,07	-32,6	G	0,10	0,06	-37,5
Actinobacteria	3,85	3,20	-16,8	A	4,17	3,16	-24,2	A	4,17	3,30	-20,9
Flavobacteria	0,10	0,21	100,4	F	0,13	0,06	-49,7	F	0,13	0,03	-74,3
Sphingobacteria	1,75	2,31	32,1	S	1,82	1,47	-19,3	S	1,82	1,00	-45,2
Anaerolineae	0,05	0,03	-36,8	A	0,06	0,03	-42,8	A	0,06	0,40	567,0
Caldilineae	0,07	0,05	-16,6	C	0,08	0,06	-23,9	C	0,08	0,04	-43,0
Chloroflexi	0,02	0,03	88,1	C	0,02	0,02	-8,2	C	0,02	0,00	-76,4
Thermomicrobia	0,01	0,00	-57,0	T	0,01	0,02	117,8	T	0,01	0,03	319,7
Cyanobacteria	0,72	0,09	-87,2	C	0,85	1,52	78,5	C	0,85	0,17	-79,8
Deinococci	0,13	0,18	43,3	D	0,12	0,18	47,9	D	0,12	0,29	134,4
Bacilli	5,26	4,46	-15,2	B	5,42	5,12	-5,4	B	5,42	5,40	-0,4
Clostridia	0,99	0,40	-60,3	C	0,82	1,92	135,5	C	0,82	7,44	811,9
Erysipelotrichi	0,00	0,00		E	0,00	0,01	100,0	E	0,00	0,04	100,0
Gemmatimonadetes	4,32	4,56	5,7	G	3,53	3,65	3,5	G	3,53	3,15	-10,6
Nitrospira	0,22	0,31	38,3	N	0,17	0,38	122,0	N	0,17	0,41	140,5
Planctomycetacia	8,83	6,55	-25,9	P	9,32	8,71	-6,6	P	9,32	6,85	-26,6
Alphaproteobacteria	23,09	28,86	25,0	A	22,81	26,19	14,8	A	22,81	30,41	33,4
Betaproteobacteria	8,24	10,07	22,2	B	9,43	8,98	-4,8	B	9,43	8,33	-11,6
Deltaproteobacteria	4,19	3,82	-8,8	D	4,63	3,29	-29,1	D	4,63	2,16	-53,4
Epsilonproteobacteria	0,00	0,00		E	0,00	0,00		E	0,00	0,28	100,0
Gammaaproteobacteria	5,62	5,11	-9,0	G	6,32	10,86	71,9	G	6,32	7,81	23,7
Synergistia	0,00	0,00		S	0,00	0,00		S	0,00	0,09	100,0
Opitutae	0,42	0,69	63,9	O	0,41	0,36	-11,4	O	0,41	0,31	-23,5
Spartobacteria	0,14	0,46	229,3	S	0,12	0,15	25,2	S	0,12	0,10	-19,9
Subdivision3	0,82	1,22	48,9	S	0,79	0,70	-11,7	S	0,79	1,05	32,5
Verrucomicrobiae	0,05	0,37	648,8	V	0,05	0,06	11,0	V	0,05	0,09	59,8

**Tabla 21. Abundancia media de las clases de los suelos enmendados en todos los muestreos.**

Abundancia relativa porcentual media de las clases de los muestreos de suelo control (S) y los suelos tratados (S-B, n=11; S-A, n=9; S-N, n=9) coloreadas en función de si se incrementó o disminuyó. La columna "ratio %" contiene la variación porcentual del suelo tratado respecto del suelo control. Las variaciones negativas se muestran en azul, las variaciones cercanas a cero en blanco y las variaciones positivas en rojo. Las letras representan la inicial de cada clase bacteriana.

### 4.5.3 Análisis de las poblaciones bacterianas del suelo B

#### 4.5.3.1 Filos bacterianos del suelo B

Los filos bacterianos que mayor número de alteraciones mostraron tras la aplicación de BC fueron *Acidobacteria* (con 7 muestreos en los que mostraron diferencias significativas), *Bacteroidetes* (8) y *Proteobacteria* (7). Por el contrario, el filo *Deinococcus-Thermus* fue el que menos alteraciones mostró (1), y lo hizo un año después de la aplicación de BC en el suelo (muestreo B7) (**Tabla 22**).

Filo bacteriano	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	
<i>Acidobacteria</i>		↓	↓			↓	↑	↑	↓		↓	7
<i>Actinobacteria</i>						↑		↓		↓		3
<i>Bacteroidetes</i>	↓		↑	↑		↑	↑	↑	↓		↑	8
<i>Chloroflexi</i>	↓							↓	↑			3
<i>Cyanobacteria</i>		↓			↓		↓	↓				4
<i>Deinococcus-Thermus</i>								↑				1
<i>Firmicutes</i>	↓	↓		↓			↓		↑			5
<i>Gemmatimonadetes</i>	↑	↓					↑	↑	↓			5
<i>Planctomycetes</i>		↓			↓				↓	↓		4
<i>Proteobacteria</i>		↑	↑	↓	↑			↓	↑		↑	7
<i>Verrucomicrobia</i>		↑		↑	↑	↑	↑	↑				6
	4	7	3	4	4	4	6	9	7	2	3	
	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 22.** Alteraciones de los filos en el suelo tratado con BC a lo largo de los muestreos.

Las flechas indican las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de la abundancia porcentual de los distintos grupos entre el suelo tratado (B) y el control, para cada uno de los muestreos (de B0 a B10). La diferencia positiva se indica con una flecha hacia arriba y la negativa se indica con una flecha hacia abajo (en función de si incrementa o disminuye su presencia con respecto al control). En la columna con valores numéricos y en la fila inferior se indican el número total de alteraciones detectadas en cada grupo bacteriano o muestreo, respectivamente. Estaciones del año: otoño (O); invierno (I); primavera (P); verano (V).

Paradójicamente, el primero de los muestreos (B0) no fue el que registró el mayor número de alteraciones significativas (4 alteraciones), aspecto que sí se pudo contemplar en los siguientes muestreos B1 y B8 con 7 alteraciones cada uno. Los muestreos que presentaron un menor número de alteraciones fueron B2 (3, en primavera) y, por otro lado, los dos últimos muestreos B9 (2, invierno) y B10 (3, primavera), donde se aprecia un descenso significativo del número de alteraciones. La abundancia de la mayor parte de los filos (6 de 11) disminuyó cuando se añadieron las enmiendas. Solamente se incrementó la de los filos *Gemmatimonadetes*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* (**Tabla 22**).

Prácticamente todos los filos bacterianos mostraron alteraciones *tempranas* (dentro de los primeros 4 muestreos). Únicamente los filos *Actinobacteria* y *Deinococcus-Thermus* mostraron sus alteraciones de forma *tardía* ya que lo hicieron en

los muestreos del segundo año (B4 en adelante). En la **Tabla 23** solo se muestran aquellos que mostraron alteraciones *tempranas*.

Filo bacteriano	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	
<i>Acidobacteria</i>		↓	↓			↓	↑	↑	↓		↓	7
<i>Bacteroidetes</i>	↓		↑	↑		↑	↑	↑	↓		↑	8
<i>Chloroflexi</i>	↓							↓	↑			3
<i>Cyanobacteria</i>		↓			↓		↓	↓				4
<i>Firmicutes</i>	↓	↓		↓			↓		↑			5
<i>Gemmatimonadetes</i>	↑	↓					↑	↑	↓			5
<i>Planctomycetes</i>		↓			↓				↓	↓		4
<i>Proteobacteria</i>		↑	↑	↓	↑			↓	↑		↑	7
<i>Verrucomicrobia</i>		↑		↑	↑	↑	↑	↑				6
	4	7	3	4	4	3	6	7	7	1	3	
	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 23. Influencia de los factores *tratamiento* y *muestreo* sobre las alteraciones *tempranas* de los fillos en el suelo tratado con BC a lo largo de los muestreos.**

Se muestran los fillos cuyas alteraciones fueron *tempranas*. Los muestreos sombreados indican que el factor *tratamiento* explicó una mayor parte de la varianza. Las celdas bordeadas de forma más intensa indican que no hubo interacción significativa entre los factores. Las flechas indican las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre la presencia de los distintos grupos del suelo tratado (B) respecto del control, para cada uno de los muestreos (de B0 a B10). La diferencia positiva se indica con una flecha hacia arriba y la negativa se indica con una flecha hacia abajo (en función de si se incrementa o se inhibe su presencia con respecto al control). En la columna con valores numéricos y en la fila inferior se indican el número total de alteraciones detectadas en cada grupo bacteriano o muestreo, respectivamente. Estaciones del año: otoño (O); invierno (I); primavera (P) y verano (V).

Para estimar la influencia de los factores *tratamiento* y *muestreo* en las poblaciones bacterianas del suelo se realizó un ANOVA de dos factores de forma análoga a la realizada en el caso del análisis metabólico (3.5 Resultados del Capítulo III). El primero de los factores se estudió a lo largo de dos niveles, suelo sin tratar (S) y suelo tratado con basura compostada (B) y el segundo factor con un total de once niveles (desde el muestreo 0 hasta el 10). Los resultados del ANOVA (integrados en la **Tabla 23**) indicaron que, por regla general, las diferencias de la abundancia relativa se podían explicar por la combinación de ambos factores, debido a que en la mayor parte de los análisis existía una interacción significativa entre ellos. No obstante, a pesar de ello y con el objetivo de conocer cuál de los dos factores tenía más peso, se utilizó la proporción de la varianza que explica cada uno de ellos por separado. Como se muestra en la **Tabla 23**, los únicos fillos que mostraron una mayor influencia por parte del factor *tratamiento* fueron *Firmicutes* (hasta el quinto muestreo) y *Planctomycetes* (hasta el segundo). En estos casos, la abundancia relativa de ambos valores disminuyó con la aplicación de BC y este comportamiento se manifestó a lo largo de diversos muestreos.

#### 4.5.3.2 Clases bacterianas del suelo B

Las clases bacterianas que mostraron un mayor número de cambios a lo largo del análisis fueron *Sphingobacteria* (con 9 muestreos en los que aparecieron alteraciones) y la clase *Alphaproteobacteria* (7), cuya abundancia se incrementó significativamente de forma regular durante los ocho primeros muestreos (**Tabla 24**).

Al igual que en el estudio de los filos, en el primero de los muestreos (B0) no fue donde se registró el mayor número de alteraciones (10). Sin embargo, en el segundo muestreo (B1) y en el tercero (B2) se observó un mayor número de alteraciones (15, primavera). Posteriormente se detectó un descenso (7, invierno), observándose nuevamente un incremento en torno a los muestreos B6 y B7 (16, verano) y tras los cuales se observó de nuevo un descenso en el número de alteraciones en el último de los muestreos (1, primavera).

A pesar del descenso significativo de la abundancia del filo *Acidobacteria* con respecto al suelo control (como se comprobó en la **Tabla 22**), la composición de las clases de este filo presentó resultados diversos cuando se añadió BC, ya que algunas se incrementaron y otras disminuyeron con respecto al control (**Tabla 24**). En cambio, la abundancia de las clases que componían el filo *Firmicutes* (*Bacilli* y *Clostridia*) sí que sufrió un descenso generalizado al compararse con su abundancia en el suelo control, tal y como se observó en el análisis de los filos. La abundancia relativa de las clases de *Proteobacteria*, excepto la de la clase *Deltaproteobacteria*, se vio incrementada. Por otra parte, se pudo destacar que la abundancia de las clases del filo *Verrucomicrobia* se incrementó por regla general a lo largo de los muestreos del suelo B.

Desde el punto de vista de cuándo se manifestaron las alteraciones, 22 clases bacterianas, sobre un total de 28, mostraron alteraciones *tempranas*. Por el contrario, las alteraciones de las clases *Actinobacteria*, *Anaerolineae*, *Deinococci*, *Opitutae* y *Subdivision3* se manifestaron después del cuarto muestreo, por lo que sus alteraciones se consideraron como tardías (**Tabla 24**).

Clase bacteriana	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	
<b>Gp1</b>			↓			↓						2
<b>Gp3</b>	↓		↑	↓	↓		↓	↓				6
<b>Gp4</b>	↓						↑					2
<b>Gp5</b>	↓		↓			↓						3
<b>Gp6</b>	↑	↓	↓				↑	↑	↓			6
<b>Gp7</b>			↑	↑			↑	↑				4
<b>Gp9</b>			↓									1
<b>Gp10</b>		↓		↑	↑		↑	↑		↓		6
<b>Gp17</b>	↑	↓	↓			↓						4
<b>Actinobacteria</b>						↑		↓		↓		3
<b>Flavobacteria</b>		↑		↑			↑		↓			4
<b>Sphingobacteria</b>	↓	↓	↑	↑		↑	↑	↑	↓	↓		9
<b>Anaerolineae</b>								↓	↑			2
<b>Caldilineae</b>				↓								1
<b>Cyanobacteria</b>		↓			↓		↓	↓				4
<b>Deinococci</b>								↑				1
<b>Bacilli</b>	↓		↑	↓			↓		↑			5
<b>Clostridia</b>	↓	↓	↓	↓					↓			5
<b>Gemmatimonadetes</b>	↑	↓					↑	↑	↓			5
<b>Planctomycetacia</b>		↓			↓				↓	↓	↓	5
<b>Alphaproteobacteria</b>		↑	↑		↑	↑	↑	↑	↓			7
<b>Betaproteobacteria</b>		↑	↑				↓	↓	↑	↑		6
<b>Gammaproteobacteria</b>		↑	↑			↓	↓	↑				5
<b>Deltaproteobacteria</b>	↓	↓	↑				↓	↓	↑			6
<b>Opitutae</b>					↑			↑		↑		3
<b>Spartobacteria</b>		↑		↑	↑							3
<b>Subdivision3</b>								↑				1
<b>Verrucomicrobiae</b>		↑	↑	↑	↑							4
total	10	15	15	10	8	7	13	16	12	6	1	
	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 24. Alteraciones de las clases en el suelo tratado con BC a lo largo de los muestreos.**

Las flechas indican las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de la abundancia porcentual de los distintos grupos entre el suelo tratado (B) y el control, para cada uno de los muestreos (de B0 a B10). La diferencia positiva se indica con una flecha hacia arriba y la negativa se indica con una flecha hacia abajo (en función de si incrementa o disminuye su presencia con respecto al control). En la columna con valores numéricos y en la fila inferior se indican el número total de alteraciones detectadas en cada grupo bacteriano o muestreo, respectivamente. Estaciones del año: otoño (O); invierno (I); primavera (P); verano (V).

La influencia del factor *tratamiento* predominó sobre la evolución de algunos grupos bacterianos (por ejemplo *Bacilli* o *Deltaproteobacteria*) y, especialmente, a lo largo de un elevado número de muestreos para la clase *Spartobacteria*. Se pudo observar que para las clases *Gp5* y *Gp7* de *Acidobacteria*, la influencia del *tratamiento* fue más significativa ya que no interaccionó con el factor *muestreo* (Tabla 25).

Clase bacteriana	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	
<i>Gp3</i>	↓		↑	↓	↓		↓	↓				6
<i>Gp4</i>	↓						↑					2
<i>Gp5</i>	↓		↓			↓						3
<i>Sphingobacteria</i>	↓	↓	↑	↑		↑	↑	↑	↓	↓		9
<i>Bacilli</i>	↓		↑	↓			↓		↑			5
<i>Clostridia</i>	↓	↓	↓	↓					↓			5
<i>Deltaproteobacteria</i>	↓	↓	↑				↓	↓	↑			6
<i>Gp6</i>	↑	↓	↓				↑	↑	↓			6
<i>Gp17</i>	↑	↓	↓			↓						4
<i>Gemmatimonadetes</i>	↑	↓					↑	↑	↓			5
<i>Gp10</i>		↓		↑	↑		↑	↑		↓		6
<i>Cyanobacteria</i>		↓			↓		↓	↓				4
<i>Planctomycetacia</i>		↓			↓				↓	↓	↓	5
<i>Flavobacteria</i>		↑		↑			↑		↓			4
<i>Alphaproteobacteria</i>		↑	↑		↑	↑	↑	↑	↓			7
<i>Betaproteobacteria</i>		↑	↑				↓	↓	↑	↑		6
<i>Gammaproteobacteria</i>		↑	↑			↓		↓	↑			5
<i>Spartobacteria</i>		↑		↑	↑							3
<i>Verrucomicrobiae</i>		↑	↑	↑	↑							4
<i>Gp1</i>			↓			↓						2
<i>Gp9</i>			↓									1
<i>Gp7</i>			↑	↑			↑	↑				4
total	10	15	15	9	7	6	13	11	11	4	1	
	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 25. Influencia de los factores *tratamiento* y *muestreo* sobre las alteraciones tempranas de las clases en el suelo tratado con BC a lo largo de los muestreos.**

Se muestran las alteraciones que fueron *tempranas*. Los muestreos sombreados indican que el factor *tratamiento* explicó una mayor parte de la varianza. Las celdas bordeadas de forma más intensa indican que no hubo interacción significativa entre los factores. Las flechas indican las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre la presencia de los distintos grupos del suelo tratado (B) respecto del control, para cada uno de los muestreos (de B0 a B10). La diferencia positiva se indica con una flecha hacia arriba y la negativa se indica con una flecha hacia abajo (en función de si se incrementa o se inhibe su presencia con respecto al control). En la columna con valores numéricos y en la fila inferior se indican el número total de alteraciones detectadas en cada grupo bacteriano o muestreo, respectivamente. Estaciones del año: otoño (O); invierno (I); primavera (P) y verano (V).

## 4.5.4 Análisis de las poblaciones bacterianas del suelo A

### 4.5.4.1 Filos bacterianos del suelo A

Tras la adición del lodo aerobio (LAE) al suelo se pudo observar que los filos que mostraron un mayor número de alteraciones fueron *Acidobacteria* (con 7 muestreos en los que se detectaron alteraciones), *Bacteroidetes* (7) y *Planctomycetes* (7), mientras que los que menos alteraciones mostraron fueron *Chloroflexi* y *Nitrospira* (con 2 cada uno de ellos) (**Tabla 26**). Como ocurrió en los suelos B, el muestreo con más alteraciones no fue el primero, A0 (6), sino el segundo, A1 (10). El último de los muestreos, al cumplirse los dos años de análisis (A8), indica que los perfiles de composición se mantuvieron alterados incluso hasta el final del análisis puesto que el número de alteraciones continuó siendo elevado (7).

Filo bacteriano	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	
<i>Acidobacteria</i>	↓	↑	↑	↓	↓		↓		↓	7
<i>Actinobacteria</i>	↑	↓	↓	↑				↓	↑	6
<i>Bacteroidetes</i>	↑	↑	↓		↑		↓	↓	↓	7
<i>Chloroflexi</i>		↓						↑		2
<i>Cyanobacteria</i>		↑		↑		↑	↑		↓	5
<i>Deinococcus-Thermus</i>		↑	↑				↓			3
<i>Firmicutes</i>	↑			↑	↓		↑		↑	5
<i>Gemmatimonadetes</i>		↑	↑	↓		↑	↓			5
<i>Nitrospira</i>		↑	↑							2
<i>Planctomycetes</i>		↓	↓	↑	↑		↓	↓	↑	7
<i>Proteobacteria</i>	↑	↓		↑		↓	↑		↑	6
<i>Verrucomicrobia</i>	↓		↑	↓		↑				4
	6	10	8	8	4	4	8	4	7	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 26.** Alteraciones de los filos en el suelo tratado con LAE a lo largo de los muestreos.

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 22**.

Todos los filos bacterianos que fueron analizados mostraron alteraciones de carácter *temprano* (**Tabla 26**), lo que señala que el efecto de estos residuos generó un conjunto de alteraciones significativas muy relevante en un periodo de tiempo relativamente reducido (primeros cuatro muestreos). Entre ellos, los filos *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia* sufrieron un descenso de su abundancia relativa, mientras que la abundancia relativa del resto de los filos se incrementó.

El factor *tratamiento* influyó de forma predominante sobre los filos *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus* y *Nitrospira*. Entre ellos, estos tres últimos mostraron una influencia del factor *tratamiento* sin interacción con el *muestreo*. No obstante esta influencia predominante del factor *tratamiento* no duró más de un año en ninguno de los filos analizados (Tabla 27).

Filo bacteriano	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	
<i>Acidobacteria</i>	↓	↑	↑	↓	↓		↓		↓	7
<i>Verrucomicrobia</i>	↓		↑	↓		↑				4
<i>Actinobacteria</i>	↑	↓	↓	↑				↓	↑	6
<i>Proteobacteria</i>	↑	↓		↑		↓	↑		↑	6
<i>Firmicutes</i>	↑			↑	↓		↑		↑	5
<i>Bacteroidetes</i>	↑	↑	↓		↑		↓	↓	↓	7
<i>Chloroflexi</i>		↓						↑		2
<i>Planctomycetes</i>		↓	↓	↑	↑		↓	↓	↑	7
<i>Cyanobacteria</i>		↑		↑		↑	↑		↓	5
<i>Deinococcus-Thermus</i>		↑	↑				↓			3
<i>Nitrospira</i>		↑	↑							2
<i>Gemmatimonadetes</i>		↑	↑	↓		↑	↓			5
total	6	10	8	8	4	4	8	4	7	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 27. Influencia de los factores sobre las alteraciones tempranas de los filos en el suelo tratado con LAE a lo largo de los muestreos.**

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 23**.

#### 4.5.4.2 Clases bacterianas del suelo A

Las clases bacterianas cuya abundancia se alteró respecto del suelo control en un mayor número de muestreos fueron *Gp6*, *Sphingobacteria*, *Planctomycetacia*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* (con 7 a lo largo de los dos años de análisis). Al igual que en el análisis de los filos, en el de las clases, el primero de los muestreos no fue el que mayor número de alteraciones mostró. Sin embargo, en el segundo de los muestreos A1 se aprecia un número más elevado (19, verano), superado por el muestreo A2 (20, otoño). En los últimos muestreos, A7 y A8, se puede observar que hay 9 clases con alteraciones por muestreo, siendo de los muestreos con un menor número de alteraciones, lo que podría significar un descenso del efecto de la enmienda.

La abundancia relativa de las clases pertenecientes a los filos *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* mostró resultados muy diversos, sin que se pueda reseñar un comportamiento general de incremento o de disminución con respecto al suelo control. Sin embargo, los valores de abundancia de las clases *Deinococci*, *Nitrospira*, *Actinobacteria*, y *Firmicutes* (*Bacilli* y *Clostridia*) se incrementaron tras la aplicación de LAE (Tabla 28).

Prácticamente la totalidad de las clases bacterianas analizadas (28 de 29) mostraron alteraciones *tempranas* en el tiempo como se puede comprobar en la **Tabla 28**. La única clase que no mostró ese patrón fue la clase *Thermomicrobia* del filo *Chloroflexi*, debido a que la única diferencia significativa que mostró entre el tratamiento y el control fue en el muestreo A7.

Clase bacteriana	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	
Gp1	↓		↑	↓	↓					4
Gp10		↑	↑				↓	↓	↑	5
Gp11			↑							1
Gp17			↑	↓			↓			3
Gp25				↓						1
Gp3			↓		↓	↓	↑	↑		5
Gp4		↑	↑	↓					↓	4
Gp5	↓			↓						2
Gp6	↓	↑	↑	↓		↑	↓		↓	7
Gp7		↑	↑	↓		↑				4
Actinobacteria	↑	↓	↓	↑				↓	↑	6
Flavobacteria				↓	↑		↓			3
Sphingobacteria	↑	↑	↓		↑		↓	↓	↓	7
Caldilineae		↓								1
Thermomicrobia								↑		1
Cyanobacteria		↓		↑		↑	↑		↓	5
Deinococci		↑	↑				↓			3
Bacilli	↑	↓		↑	↓					4
Clostridia	↑	↑	↑			↑		↑	↑	6
Gemmatimonadetes		↑	↑	↓		↑	↓			5
Nitrospira		↑	↑							2
Planctomycetacia		↓	↓	↑	↑		↓	↓	↑	7
Alphaproteobacteria	↑	↑	↑	↓		↑			↑	6
Betaproteobacteria		↓	↓	↑	↓	↓	↑	↑		7
Deltaproteobacteria		↓	↓			↓	↑			4
Gammaproteobacteria	↑	↓	↓	↑	↑		↑	↑		7
Opitutae			↑							1
Spartobacteria		↑				↑				2
Subdivision3	↓			↓		↑				3
	10	19	20	17	8	11	13	9	9	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 28. Alteraciones de las clases en el suelo tratado con LAE a lo largo de los muestreos.**

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 24**.

Como se muestra en la **Tabla 29**, un total de 8 clases bacterianas de todas las que se consideraron con un comportamiento temprano (28) tuvieron una influencia principalmente atribuible al factor *tratamiento*. Algunas clases, cuya abundancia se incrementó, mostraron esa influencia solo en los dos primeros muestreos, como fueron las clases *Clostridia*, *Alphaproteobacteria*, *Spartobacteria* (sin mostrar interacción significativa), *Gemmatimonadetes* y *Gp10*. En cambio, el factor *tratamiento* tuvo una influencia más duradera sobre los incrementos de la abundancia de las clases *Deinococci* (sin mostrar interacción significativa entre factores) y *Nitrospira* durante los primeros cuatro muestreos. El incremento de la abundancia relativa de la clase

*Opitutae* mostró una elevada influencia del factor *tratamiento* a lo largo de todos los muestreos, con un especial peso estadístico en los dos primeros muestreos ya que no se halló una interacción significativa entre factores.

Se podría decir que la adición de LAE al suelo provocó un elevado número de cambios que se registraron de forma *temprana*, aunque no inmediatamente después de la aplicación. Las clases bacterianas cuyas alteraciones estuvieron más influidas por el factor *tratamiento* mostraron un incremento de su abundancia, como fue el caso de *Clostridia*, *Alphaproteobacteria*, *Spartobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *Gp10* durante los dos primeros muestreos, mientras que las clases *Deinococci*, *Nitrospira* y *Opitutae* durante un mayor número de muestreos.

Clase bacteriana	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	
<i>Subdivision3</i>	↓			↓		↑				3
<i>Gp5</i>	↓			↓						2
<i>Gp6</i>	↓	↑	↑	↓		↑	↓		↓	7
<i>Gp1</i>	↓		↑	↓	↓					4
<i>Clostridia</i>	↑	↑	↑			↑		↑	↑	6
<i>Alphaproteobacteria</i>	↑	↑	↑	↓		↑			↑	6
<i>Actinobacteria</i>	↑	↓	↓	↑				↓	↑	6
<i>Gammaproteobacteria</i>	↑	↓	↓	↑	↑		↑	↑		7
<i>Bacilli</i>	↑	↓		↑	↓					4
<i>Sphingobacteria</i>	↑	↑	↓		↑		↓	↓	↓	7
<i>Deltaproteobacteria</i>		↓	↓			↓	↑			4
<i>Caldilineae</i>		↓								1
<i>Planctomycetacia</i>		↓	↓	↑	↑		↓	↓	↑	7
<i>Betaproteobacteria</i>		↓	↓	↑	↓	↓	↑	↑		7
<i>Cyanobacteria</i>		↓		↑		↑	↑		↓	5
<i>Gp4</i>		↑	↑	↓					↓	4
<i>Deinococci</i>		↑	↑				↓			3
<i>Nitrospira</i>		↑	↑							2
<i>Spartobacteria</i>		↑				↑				2
<i>Gp7</i>		↑	↑	↓		↑				4
<i>Gemmatimonadetes</i>		↑	↑	↓		↑	↓			5
<i>Gp10</i>		↑	↑				↓	↓	↑	5
<i>Gp3</i>			↓		↓	↓	↑	↑		5
<i>Gp17</i>			↑	↓			↓			3
<i>Gp11</i>			↑							1
<i>Opitutae</i>			↑							1
<i>Gp25</i>				↓						1
<i>Flavobacteria</i>				↓	↑		↓			3
	10	19	20	17	8	11	13	8	9	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 29. Influencia de los factores sobre las alteraciones tempranas de las clases en el suelo tratado con LAE a lo largo de los muestreos.** La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 25**.

## 4.5.5 Análisis de las poblaciones bacterianas del suelo N

### 4.5.5.1 Filos bacterianos del suelo N

En los suelos N los filos que mostraron un mayor número de alteraciones fueron *Acidobacteria* (con 8 muestreos que mostraron alteración), *Firmicutes* (7), *Proteobacteria* (8). En cambio, los que menos alteraciones exhibieron fueron los filos *Chloroflexi* (2), *Verrucomicrobia* (2) y *Synergistetes*, que mostró una única alteración en el primer muestreo (N0) (**Tabla 30**).

A diferencia de otros suelos tratados, se puede observar que en el primer muestreo (N0) se detectó un elevado número de alteraciones (8, primavera). Aunque seis meses después (en el muestreo N2) se registró un número superior (10) que disminuyó en N4 (8). Por otro lado, los muestreos con menos alteraciones fueron los dos últimos, N7 (4) y N8 (5).

Filo bacteriano	N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	
<i>Acidobacteria</i>	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓		↓	8
<i>Actinobacteria</i>	↓		↓	↑				↓	↑	5
<i>Bacteroidetes</i>			↓		↑	↑	↓		↓	5
<i>Chloroflexi</i>	↑						↑			2
<i>Cyanobacteria</i>		↓	↓		↓	↓				4
<i>Deinococcus-Thermus</i>		↑	↑		↑					3
<i>Firmicutes</i>	↑	↑	↑	↑	↓		↑		↑	7
<i>Gemmatimonadetes</i>	↓		↑	↓	↑	↑	↓			6
<i>Nitrospira</i>			↑	↑				↑		3
<i>Planctomycetes</i>		↓	↓	↑	↓	↑	↓			6
<i>Proteobacteria</i>	↑	↓	↑		↑	↓	↑	↓	↑	8
<i>Synergistetes</i>	↑									1
<i>Verrucomicrobia</i>	↓							↑		2
	8	6	10	6	8	6	7	4	5	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 30.** Alteraciones de los filos en el suelo tratado con LANAE a lo largo de los muestreos.

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 22**.

Todos los filos analizados mostraron alteraciones *tempranas*, en las que se pudo observar un incremento de la abundancia de los filos *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Nitrospira*, *Proteobacteria* y *Synergistetes*. De entre todos los filos analizados, las variaciones de los filos bacterianos *Acidobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* no pudieron ser explicadas por ninguno de los factores utilizados en el ANOVA de doble vía (**Tabla 31**). Mientras que todas las alteraciones del resto de filos estuvieron influidas por la combinación de los factores *tratamiento* y *muestreo*, aunque el factor que explicó una mayor parte de la varianza fue el *tratamiento*, especialmente en el caso del filo *Deinococcus-Thermus* que se mantuvo durante todo el ensayo. No obstante, la abundancia de los filos *Synergistetes* y

*Nitrospira* estuvo influida exclusivamente por el *tratamiento* aunque solo durante los dos primeros muestreos. Los resultados observados confieren al filo *Synergistetes* un carácter marcador de la aplicación de este tipo de lodos en el suelo (**Tabla 31**).

Filo bacteriano	N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	
<b>Gemmatimonadetes</b>	↓		↑	↓	↑	↑	↓			6
<b>Acidobacteria</b>	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓		↓	8
<b>Actinobacteria</b>	↓		↓	↑				↓	↑	5
<b>Verrucomicrobia</b>	↓							↑		2
<b>Proteobacteria</b>	↑	↓	↑		↑	↓	↑	↓	↑	8
<b>Chloroflexi</b>	↑						↑			2
<b>Firmicutes</b>	↑	↑	↑	↑	↓		↑		↑	7
<b>Synergistetes</b>	↑									1
<b>Cyanobacteria</b>		↓	↓		↓	↓				4
<b>Planctomycetes</b>		↓	↓	↑	↓	↑	↓			6
<b>Deinococcus-Thermus</b>		↑	↑		↑					3
<b>Bacteroidetes</b>			↓		↑	↑	↓		↓	5
<b>Nitrospira</b>			↑	↑				↑		3
total	8	6	10	6	8	6	7	4	5	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 31. Influencia de los factores sobre las alteraciones tempranas de los fillos en el suelo tratado con LANAE a lo largo de los muestreos.**

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 23**.

#### 4.5.5.2 Clases bacterianas del suelo N

Entre las clases bacterianas analizadas, algunas mostraron alteraciones significativas en un elevado número de muestreos como, por ejemplo, la clase *Gp6* (en 7 muestreos), *Clostridia* (8) y *Alphaproteobacteria* (8). Entre las que menos podemos destacar las clases *Bacteroidia*, *Anaerolineae*, *Erysipelotrichi*, y *Synergistia* que mostraron una única alteración, aunque de carácter relevante ya que se localizó en el primero de los muestreos, tras añadir LANAE (**Tabla 32**). Cuando se analizan las variaciones en cada uno de los muestreos, y como ya se pudo observar en el estudio de los fillos bacterianos, el primer muestreo (N0) fue el que mayor número de variaciones mostró (21 alteraciones, primavera). En cambio, el muestreo N7, casi dos años después de la aplicación de LANAE, mostró el que menos (8). Es más, en los últimos tres muestreos (N6-N8) se observaron menos de la mitad de las alteraciones encontradas en el primero de los muestreos (N0), lo que indica un descenso de alteraciones en las poblaciones al final del análisis.

Clase bacteriana	N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	
Gp10	↓		↑			↑		↑	↑	5
Gp17				↓			↓			2
Gp3		↓		↑	↓	↓				4
Gp5	↓			↓			↓			3
Gp6	↓	↓	↑	↓		↑	↓		↓	7
Gp7	↑					↑			↓	3
Gp1	↓			↓						2
Gp18		↑								1
Gp4	↓		↑	↓						3
Gp25				↓					↓	2
Actinobacteria	↓		↓	↑				↓	↑	5
Sphingobacteria	↓					↑	↓		↓	4
Bacteroidia	↑									1
Flavobacteria				↓			↓			2
Anaerolineae	↑									1
Caldilineae		↓								1
Cyanobacteria		↓	↓		↓	↓				4
Deinococci		↑	↑		↑					3
Bacilli	↑	↑	↓		↓	↓		↓		6
Clostridia	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	8
Erysipelotrichi	↑									1
Gemmatimonadetes	↓		↑	↓	↑	↑	↓			6
Nitrospira			↑	↑				↑		3
Planctomycetacia		↓		↑	↓	↑	↓			5
Alphaproteobacteria	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑		↑	8
Betaproteobacteria	↑	↓	↓		↑	↓			↓	6
Deltaproteobacteria	↑	↓	↓		↓	↓		↓		6
Gammaproteobacteria	↑	↓		↓	↑					4
Epsilonproteobacteria	↑									1
Synergistia	↑									1
Opitutae									↑	1
Subdivision3	↓		↑		↑	↑		↑		5
Verrucomicrobiae								↑		1
	21	13	14	15	11	14	9	8	10	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 32. Alteraciones de las clases en el suelo tratado con LANAE a lo largo de los muestreos.**

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 24**.

Una semana después de aplicarse LANAE, la mayor parte de las clases bacterianas de los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes* sufrió un aumento de su abundancia, mientras que la de la clase *Subdivision3* (del filo *Verrucomicrobia*) y las clases bacterianas de los filos *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *Actinobacteria* disminuyó (**Tabla 32**).

Todas las alteraciones que se registraron en la abundancia relativa de las clases fueron *tempranas* en el tiempo, excepto las alteraciones detectadas en las clases *Opitutae* y *Verrucomicrobiae*, las cuales se manifestaron a partir del muestreo N7. De las 31 clases que manifestaron una alteración *temprana*, 14 de ellas tuvieron una mayor influencia del factor *tratamiento* (**Tabla 33**). De entre estas 14 clases, 8 mostraron una influencia más marcada por parte del factor *tratamiento* ya que no existió interacción entre factores.

En este sentido, la influencia del factor *tratamiento* fue destacable en los primeros muestreos para los incrementos de las clases *Bacteroidia*, *Erysipelotrichi*, *Synergistia*, *Gp18* y *Nitrospira*, y para la disminución de la abundancia de las clases *Gp1*, *Gemmatimonadetes* y *Subdivision3*. También fue destacable que el factor *tratamiento* mostrara una influencia más duradera (a lo largo de los 9 muestreos) en el caso del incremento de *Clostridia* y *Deinococci*, *Nitrospira* o de la clase *Gemmatimonadetes* (Tabla 33).

Clase bacteriana	N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	
<i>Alphaproteobacteria</i>	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑		↑	8
<i>Gp10</i>	↓		↑			↑		↑	↑	5
<i>Gp5</i>	↓			↓			↓			3
<i>Gp6</i>	↓	↓	↑	↓		↑	↓		↓	7
<i>Actinobacteria</i>	↓		↓	↑				↓	↑	5
<i>Sphingobacteria</i>	↓					↑	↓		↓	4
<i>Gp1</i>	↓			↓						2
<i>Gp4</i>	↓		↑	↓						3
<i>Gemmatimonadetes</i>	↓		↑	↓	↑	↑	↓			6
<i>Subdivision3</i>	↓		↑		↑	↑		↑		5
<i>Betaproteobacteria</i>	↑	↓	↓		↑	↓			↓	6
<i>Deltaproteobacteria</i>	↑	↓	↓		↓	↓		↓		6
<i>Gammaproteobacteria</i>	↑	↓		↓	↑					4
<i>Gp7</i>	↑					↑			↓	3
<i>Bacilli</i>	↑	↑	↓		↓	↓		↓		6
<i>Bacteroidia</i>	↑									1
<i>Anaerolineae</i>	↑									1
<i>Clostridia</i>	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	8
<i>Erysipelotrichi</i>	↑									1
<i>Epsilonproteobacteria</i>	↑									1
<i>Synergistia</i>	↑									1
<i>Cyanobacteria</i>		↓	↓		↓	↓				4
<i>Gp3</i>		↓		↑	↓	↓				4
<i>Planctomycetacia</i>		↓		↑	↓	↑	↓			5
<i>Caldilineae</i>		↓								1
<i>Gp18</i>		↑								1
<i>Deinococci</i>		↑	↑		↑					3
<i>Nitrospira</i>			↑	↑				↑		3
<i>Gp17</i>				↓			↓			2
<i>Gp25</i>				↓					↓	2
<i>Flavobacteria</i>				↓			↓			2
	21	13	14	15	11	14	9	7	9	
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	

**Tabla 33.** Influencia de los factores sobre las alteraciones tempranas de las clases en el suelo tratado con LANAE a lo largo de los muestreos. La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la Tabla 25.

## 4.5.6 ¿Qué rasgos bacterianos fueron más relevantes tras la adición de las enmiendas orgánicas?

### 4.5.6.1 ¿Con que rapidez se vieron afectadas las poblaciones del suelo?

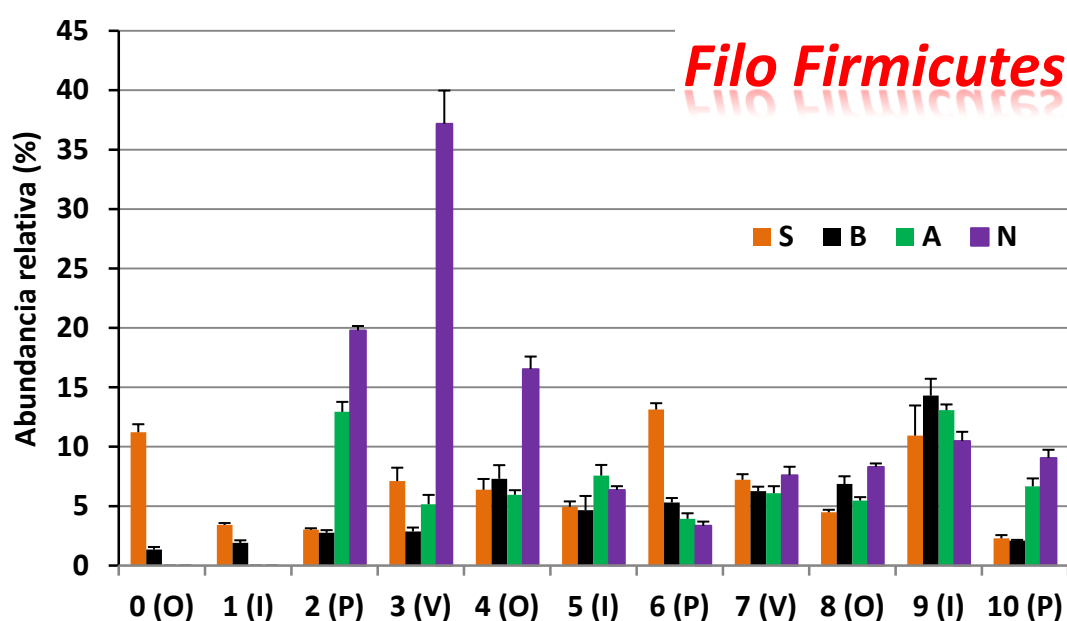
De los filos y clases bacterianas que fueron analizadas, la mayoría mostraron alteraciones *tempranas* cuando se aplicaron las enmiendas (es decir, dentro de los 4 primeros muestreos), salvo algunos grupos que mostraron un comportamiento *tardío*, como ya se ha mencionado. Finalmente, se puede decir que los suelos tratados con BC fueron los que mostraron un número menor de alteraciones *tempranas* en los grupos bacterianos analizados (filos y clases), por lo que los lodos (LAE y LANAE) fueron los que causaron un mayor impacto en las poblaciones bacterianas durante los primeros muestreos.

### 4.5.6.2 ¿Qué grupos bacterianos estuvieron influidos de forma predominante por el factor “tratamiento”?

Los resultados del ANOVA de dos factores indicaron que el filo *Firmicutes* presentó una mayor influencia por parte del factor *tratamiento* en los tres tipos de suelos enmendados (B, A y N). Por otro lado, en los suelos tratados con lodos (A y N) se observó que las variaciones en la abundancia de los filos *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia* y *Nitrospira* fueron debidas en mayor medida al factor *tratamiento*, especialmente se halló una influencia más significativa en las variaciones del filo *Nitrospira*. Por otra parte, con respecto a las clases bacterianas se puede observar que aunque la interacción con el factor *muestreo* fue siempre significativa, el factor *tratamiento* explicó en mayor medida la varianza de la abundancia de la clase *Clostridia* en los tres suelos enmendados (B, A y N). En cambio, en los suelos tratados con lodos (A y N) estuvieron influidas por el factor *tratamiento* las clases *Deinococci*, *Nitrospira* y *Gemmatimonadetes*.

### 4.5.6.3 Resultados más destacados.

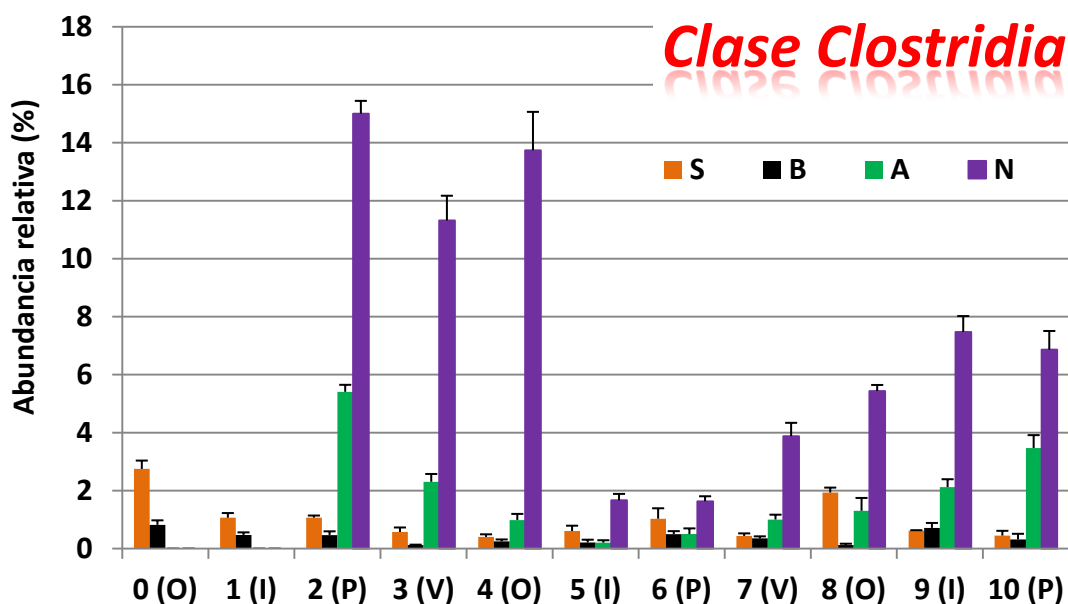
La abundancia del filo *Firmicutes* disminuyó en los primeros muestreos de B (como se observa en la **Tabla 23**). En cambio, en los suelos tratados con lodos de depuradora se registró un incremento de su abundancia una semana después de su aplicación (**Tabla 27 y Tabla 31**), de una manera especial en los suelos N (color morado, **Figura 30**). Posteriormente, en los últimos muestreos del análisis, la abundancia de este filo mostró resultados diversos que no siguieron la tónica inicial. Esto se refuerza con los resultados observados en el ANOVA de dos factores, que señalan un mayor peso del factor *tratamiento* en los primeros 4 muestreos de cada tipo de suelo.



**Figura 30. Evolución de la abundancia del filo *Firmicutes*.**

Valores medios (n=4) de la abundancia relativa porcentual y el error medio en los distintos suelos: control (S), tratado con BC (B), con LAE (A) y con LANAE (N). Para la numeración de los muestreos se ha elegido la cronología del suelo B. Otoño (O), invierno (I), primavera (P) y verano (V), son las estaciones del año.

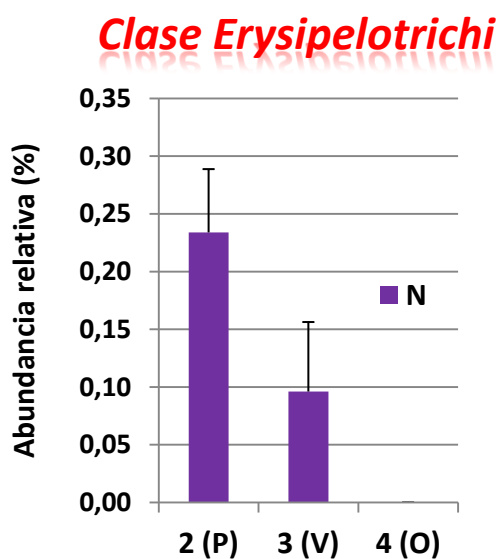
Si profundizamos en el estudio de las clases que componen el filo *Firmicutes* encontramos que la evolución de la clase *Clostridia* se incrementó en los muestreos de suelos tratados con lodos (suelos A y N), mientras que en el suelo B la abundancia disminuyó con respecto al suelo control (S). En el suelo N este incremento fue incluso más destacable (**Figura 31**), y se podría relacionar directamente con la aplicación de lodos de depuradora (**Tabla 27 y Tabla 31**) ya que, a pesar de que la interacción entre los factores *tratamiento* y *muestreo* siempre fue significativa para los resultados de abundancia de *Clostridia* y *Bacilli*, la influencia del factor *tratamiento* perduró para la clase *Clostridia* durante todo el ensayo en los tres suelos tratados, a diferencia de la clase *Bacilli*, donde hubo análisis en los que influyó más el *muestreo*.



**Figura 31. Evolución de la abundancia de la clase *Clostridia*.**

Valores medios (n=4) de la abundancia relativa porcentual y el error medio en los distintos suelos: control (S), tratado con BC (B), con LAE (A) y con LANAE (N). Para la numeración de los muestreos se ha elegido la cronología del suelo B. Otoño (O), invierno (I), primavera (P) y verano (V), son las estaciones del año.

Por otra parte, la abundancia de la clase *Erysipelotrichi* (*Firmicutes*) se incrementó exclusivamente en los primeros dos muestreos del suelo N, con valores de abundancia relativa bajos (0,10-0,20 %), lo que podría encontrarse estrechamente relacionado con la aplicación de LANAE (Figura 32).

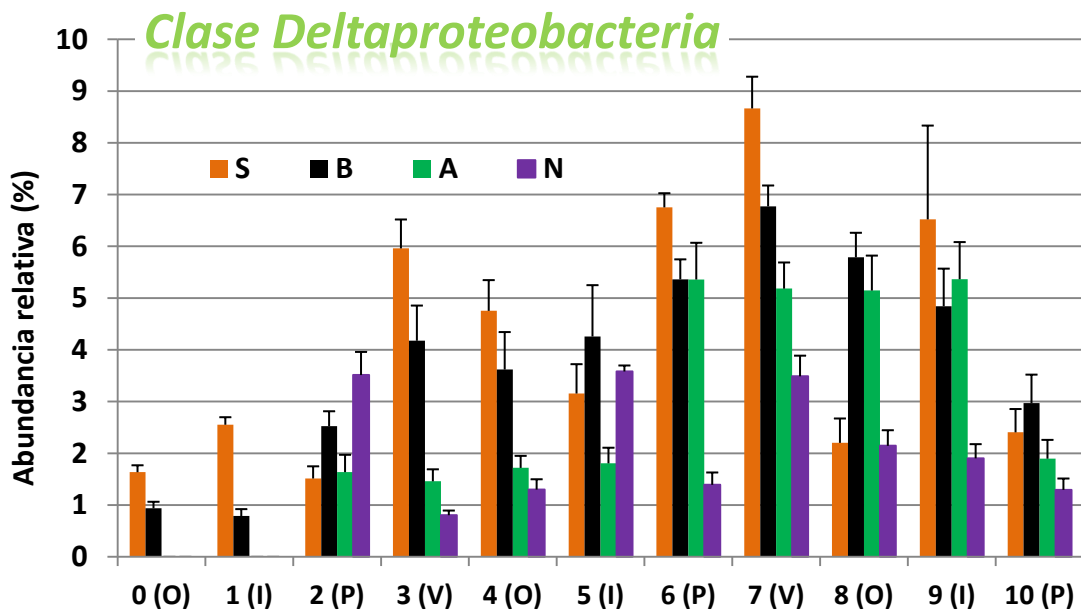


**Figura 32. Detalle de la evolución de la abundancia de la clase *Erysipelotrichi*.**

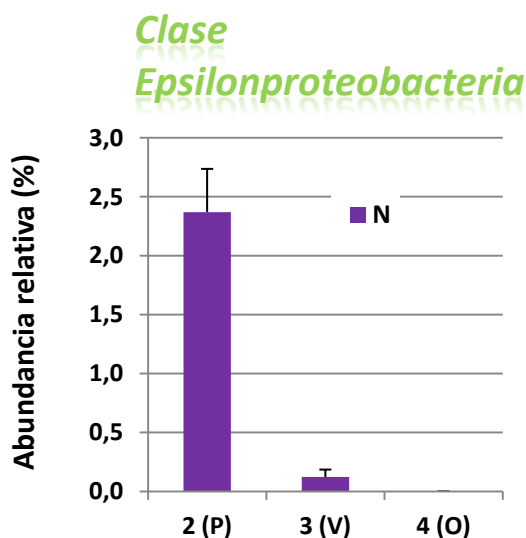
Valores medios (n=4) de la abundancia relativa porcentual y el error medio en el suelo tratado con LANAE (N). Para la numeración de los muestreos se ha elegido la cronología del suelo B. Otoño (O), invierno (I), primavera (P) y verano (V), son las estaciones del año.

Analizando la evolución de las clases del filo *Proteobacteria* los resultados más destacables se hallaron en las clases *Deltaproteobacteria* y *Epsilonproteobacteria*. Estas clases son menos típicas en el suelo en comparación con el resto de clases lo que pudo favorecer que los resultados fueran más sobresalientes. Aunque se detectó algún incremento de la abundancia de la clase *Deltaproteobacteria* en algún muestreo de los suelos enmendados, en general, cuando se aplicaron las enmiendas se produjo una disminución de este tipo de bacterias, como se aprecia en la **Figura 33.a** y también en la **Tabla 25, Tabla 29 y Tabla 33**. Esta disminución se pudo observar en la mayor parte de los muestreos de suelos tratados. No obstante, se puede destacar un incremento en el primer muestreo del suelo N (2-P), posiblemente debido a que en la enmienda LANAE existe una abundancia elevada de esta clase bacteriana. Sin embargo, su desaparición paulatina en subsiguientes muestreos parece mostrar una supervivencia baja de estas bacterias en el suelo a lo largo del tiempo.

a



b



**Figura 33. Evolución de algunas clases del filo *Proteobacteria* a lo largo de todo el análisis.**

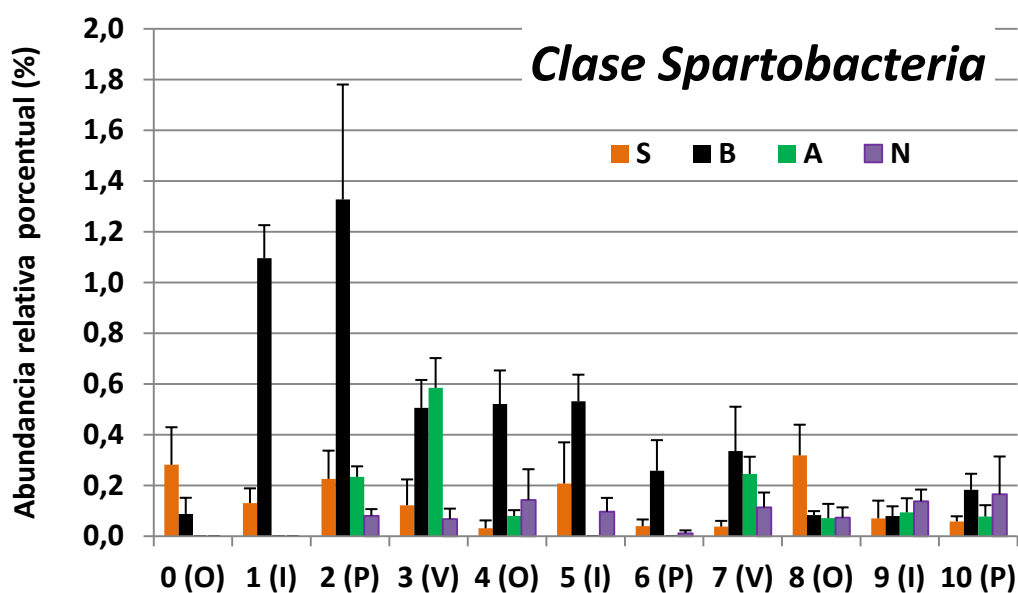
(a) Evolución de la abundancia de la clase *Deltaproteobacteria*.

(b) Detalle de la evolución de la clase *Epsilonproteobacteria*.

Valores medios (n=4) de la abundancia relativa porcentual y el error medio en los distintos suelos: control (S), tratado con BC (B), con LAE (A) y con LANAE (N). Para la numeración de los muestreos se ha elegido la cronología del suelo B. Otoño (O), invierno (I), primavera (P) y verano (V), son las estaciones del año.

Al igual que en el caso de la clase bacteriana *Erysipelotrichi*, la clase *Epsilonproteobacteria* mostró una tendencia muy similar en el suelo N (**Figura 33.b**). Sin embargo, esta última clase presenta valores de abundancia superiores a los de *Erysipelotrichi* y, por otra parte, su presencia no se registró en los análisis de las enmiendas (**Tabla 18**), por lo que se podría sospechar que su presencia en el suelo estaría relacionada con una estimulación de su crecimiento debido a la composición de LANAE.

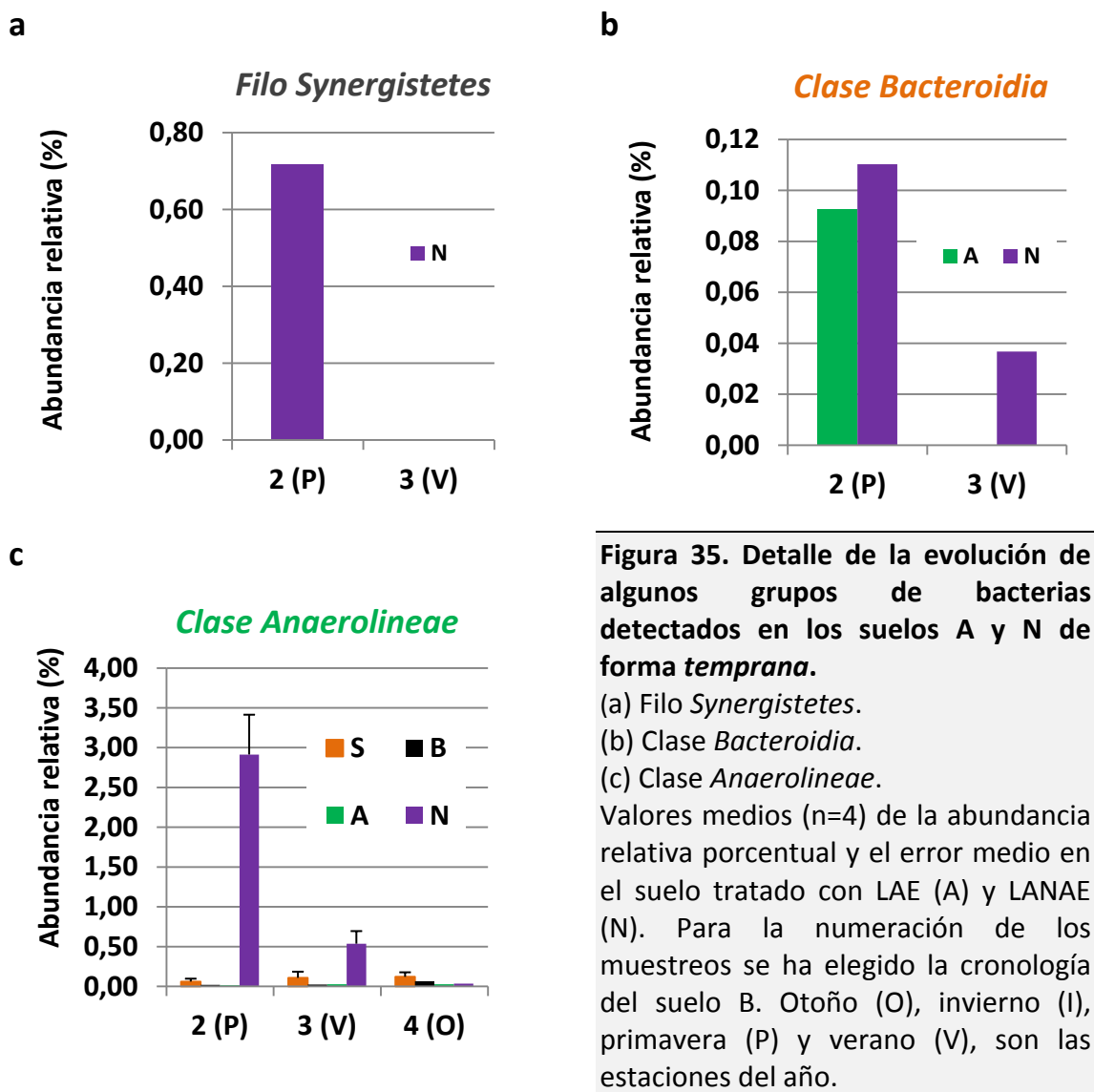
Otro filo bacteriano con un comportamiento destacable debido a los resultados estadísticos fue *Verrucomicrobia*. A pesar de que se trata de un filo con una abundancia moderada, su abundancia se incrementó en los suelos tratados con BC (suelo B) durante la mayor parte del estudio. En concreto, la abundancia de la clase *Spartobacteria* fue la que mostró los resultados más relevantes en el suelo B, en los que su abundancia fue mayor que en el resto de los suelos durante varios muestreos (barras en negro, **Figura 34**).



**Figura 34. Evolución de la clase *Spartobacteria* a lo largo de todo el análisis.**

Valores medios (n=4) de la abundancia relativa porcentual y el error medio en los distintos suelos: control (S), tratado con BC (B), con LAE (A) y con LANAE (N). Para la numeración de los muestreos se ha elegido la cronología del suelo B. Otoño (O), invierno (I), primavera (P) y verano (V), son las estaciones del año.

Finalmente, destacaron una serie de grupos bacterianos cuya abundancia se incrementó en varios de los muestreos al comienzo del análisis. Todos ellos se caracterizaron por detectarse en el análisis de las enmiendas (Tabla 17 y Tabla 18) y posteriormente en los suelos enmendados. En este sentido, tras la adición de LANAE se detectó un incremento de la abundancia relativa del filo *Synergistetes*, aunque sus valores se encontraron por debajo de 1 % de la abundancia total (Figura 35.a).



Aunque también su abundancia fue baja, en los suelos tratados con lodos (A y N) se apreció un incremento de la abundancia relativa de la clase *Bacteroidia* en el primero de los muestreos que solo perduró en el muestreo siguiente en el suelo N (Figura 35.b). Por otro lado, en el primer muestreo del suelo N se pudo destacar un incremento de la abundancia de las bacterias de la clase *Anaerolineae*, registrándose un descenso en el segundo muestreo. Este grupo bacteriano también se podría relacionar de forma directa con la aplicación de la enmienda LANAE (Figura 35.c).

## 4.5.7 OTUs marcadores del uso de las enmiendas

Como se explica en el apartado 4.4 Materiales y métodos, el elevado número de secuencias obtenidas se ordenó en clústeres denominados OTUs, en función de la similitud que guardaban las mismas con una secuencia representativa depositada en la base de datos de *Greengenes*. La importancia del uso de los OTUs reside en que se analizan las poblaciones a partir de una asignación taxonómica muy concreta por debajo del taxón *familia* (a veces, incluso, *género bacteriano*), a la vez que representativa, ya que se encuentran respaldados por un conjunto considerable de secuencias similares. Una vez generados, estos OTUs fueron sometidos a un conjunto de criterios de selección, que denominamos **criba**, en los que se valoró la representatividad y la abundancia en cada una de las muestras (proceso explicado en el apartado 4.4.4.1 Procedimientos para la selección de OTUs: criba). Con este procedimiento, además de incrementar la rigurosidad y representatividad de los OTUs seleccionados, se facilitó el manejo de los mismos. El análisis de estos OTUs podría ser útil para la detección de marcadores microbianos específicos en un suelo, los cuales indicarían que ha sido tratado con algún residuo, bien porque se encontró presente en dicho residuo, o bien porque la aplicación del residuo promovió la alteración de un OTU que ya se encontraba presente en el suelo (ya sea aumentando o disminuyendo).

### 4.5.7.1 ¿Cómo se procesaron los OTUs?

Con el fin de seleccionar aquellos OTUs que permitieran describir los procesos de cambio que habían sufrido las poblaciones bacterianas del suelo, se utilizaron una serie de criterios descritos en los siguientes pasos:

- **Paso 1.** En primer lugar, se seleccionaron los OTUs que superaron el proceso de criba establecido en el apartado 4.4.4.1.
- **Paso 2.** Se seleccionaron los OTUs cribados que cumplieron las siguientes condiciones sucesivamente:
  - Paso 2.1. OTUs que manifestaron en su abundancia diferencias significativas (incremento o disminución) con el suelo control.
  - Paso 2.2. OTUs que, además de reunir las condiciones anteriores, tuvieron alteraciones consideradas como *tempranas* (dentro de los primeros 4 muestreos) y que además mostraron una cierta *regularidad* (total o parcialmente) en la tendencia de sus alteraciones. Consideramos que una alteración fue *regular* cuando mostró en su tendencia **un solo cambio o ninguno**. Esta consideración aporta fiabilidad al uso del OTU como descriptor de la alteración producida.
- **Paso 3.** Los OTUs se ordenaron en función de cómo fueron sus alteraciones:
  - Tipo 1 o de **tendencia incrementada totalmente regular**: todas las alteraciones muestran incrementos respecto del suelo control.
  - Tipo 2 o de **tendencia incrementada parcialmente regular**: primeramente se observa **uno o varios** muestreos en los que el OTU

muestra un incremento de su abundancia, seguido de **una** disminución (un solo cambio de tendencia), sin volver a encontrarse incrementado en ningún otro muestreo posterior al cambio de tendencia.

- Tipo 3 o de **tendencia inhibida totalmente regular**: todas las alteraciones muestran disminuciones respecto del suelo control.
- Tipo 4 o de **tendencia inhibida parcialmente regular** primeramente se observa **uno o varios** muestreos en los que el OTU muestra una disminución de su abundancia, seguido de **un** incremento (un solo cambio de tendencia), sin volver a encontrarse disminuido en ningún otro muestreo posterior al cambio de tendencia.
- **Paso 4.** Agrupación de cómo se comportó un mismo OTU en los distintos suelos tratados. En función del tipo de alteración (1, 2, 3 o 4), se hicieron 5 grupos según cómo se combinaron los tipos de alteraciones en cada suelo (**Tabla 34**).
  - **Grupo I:** agrupa a aquellos OTUs que presentes en varios tipos de suelos, solo presentaron alteración de tipo 1. Es decir, son OTUs que muestran en todos los suelos un incremento de su abundancia de **tipo 1** (Ejemplos: 1, 1 o 1, 1, 1).
  - **Grupo II:** aquellos OTUs analizados en 2 o 3 tipos de suelo que mostraron al menos una alteración de **tipo 2**, pudiendo ser la otra/s de **tipo 1 o 2**. En ningún caso de tipo 3 o 4 (Ejemplos: 1, 2, 1/ 2, 1 o 2, 2).
  - **Grupo IV:** aquellos OTUs, que presentes en varios tipos de suelos, solo presentan alteración de **tipo 3**. Es un grupo análogo al grupo I, pero que trata de OTUs cuya presencia disminuyó con respecto al suelo control en todos los suelos tratados (Ejemplos: 3, 3 o 3, 3, 3).
  - **Grupo V:** aquellos OTUs analizados en 2 o 3 tipos de suelo, que han mostrado al menos una alteración de **tipo 4**, pudiendo ser la otra/s de **tipo 3 o 4**. En ningún caso de tipo 1 o 2 (Ejemplos: 3, 4, 3; 4, 3 o 4, 4).
  - **Grupo D (discrepantes):** agrupa los OTUs que han mostrado alteraciones contrarias. Es decir, que un OTU presente una alteración tipo 1 o 2 (incrementadas) en un suelo y en otro suelo presente una alteración 3 o 4 (inhibidas). Estos OTUs pueden ser útiles para diferenciar el comportamiento de un OTU en distintos suelos.

Otra consideración a tener en cuenta cuando se valoran los OTUs es el número de veces en los que se repite un determinado comportamiento. En las tablas expuestas a continuación (**Tabla 35 a Tabla 43**), se detallan en varias columnas el número de veces que se ha encontrado un comportamiento incrementado o inhibido en los primeros 4 muestreos (OTUs *tempranos*), y otra columna en la que se detalla el número de muestreos totales en los que se ha encontrado ese OTU alterado (tanto incrementado como inhibido).

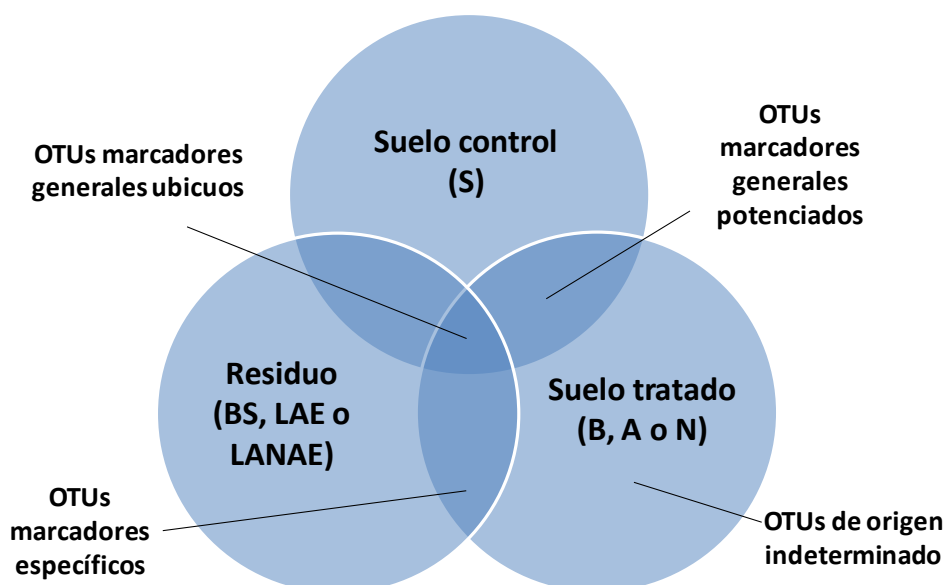
OTUs sin cribar	Criba Paso 1	Paso 2.1 y 2.2	Tipos de alteraciones Paso 3		Grupos Paso 4	
	OTUs cribados	OTUs coincidentes entre S y (B, A o N) con una alteración (incrementada o inhibida) <i>temprana</i> y con un comportamiento <i>regular (total o parcialmente)</i>	1	Incrementados totalmente	I	Incrementados totalmente
2	Incrementados parcialmente		II	Incrementados parcialmente		
3	Inhibidos totalmente		IV	Inhibidos totalmente		
4	Inhibidos parcialmente		V	Inhibidos parcialmente		
			D	Discrepantes		

**Tabla 34. Esquema del procesamiento de los OTUs.**

Los OTUs fueron cribados (Criba, paso 1), seleccionados según distintas condiciones (Pasos 2.1 y 2.2), ordenados en función del tipo de alteración (paso 3) y comparados entre los distintos tratamientos para formar grupos (paso 4).

#### 4.5.7.2 ¿De qué forma fueron categorizados?

Los OTUs que se detectaron en el suelo tratado se consideraron **marcadores generales** si se detectaron también en el suelo control, y **marcadores específicos** si se detectaron en la enmienda antes de aplicarse. Los primeros, a su vez, pueden ser **potenciados** cuando se altera su presencia en el suelo, pero no se detecta en ninguna de las enmiendas, o pueden ser **ubicuos** cuando se detectan tanto en las enmiendas como en el suelo control. Por último, los OTUs de **origen indeterminado** son aquellos cuya presencia se incrementa en un suelo tratado sin estar presentes en las enmiendas ni en el suelo control (**Figura 36**).



**Figura 36. Categorización de los OTUs.**

A continuación, se describen los OTUs pertenecientes a las clasificaciones de **OTUs marcadores generales** de carácter tanto **ubicuo** como **potenciado** (Tabla 35 a la Tabla 42), los **OTUs de origen indeterminado** (Tabla 43) y los OTUs que se designaron como **OTUs marcadores específicos** (Tabla 44).

#### 4.5.7.3 OTUs comunes de los suelos B, A y N

En este análisis se detectaron OTUs cuyo comportamiento se halló alterado con respecto al suelo control en todos los tipos de suelos tratados (B, A y N) (Tabla 35). Los **OTUs cuya presencia se halló incrementada** se clasificaron en los grupos I y II. Entre ellos, los OTUs correspondientes a los filos *Nitrospira* (1047) y al género *Rhodopirellula* (1055) (*Planctomycetes*) se encontraron incrementados en todos los suelos enmendados. También se observó que la presencia de un elevado número de OTUs del filo *Proteobacteria*, entre los que se puede destacar el OTU 1852 (*Gammaproteobacteria*), se incrementó en los tres tipos de suelos tratados en más de un único muestreo, pero especialmente en los suelos tratados con lodos (A y N). En los suelos B también se detectaron OTUs cuya abundancia se incrementó de manera especial, correspondientes a las clases *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* (1068, 1115 y 1334). Entre ellos podemos destacar el comportamiento del OTU 1334 (familia *Alcaligenaceae*; *Betaproteobacteria*) que tras detectarse con una abundancia elevada en la enmienda BC, su presencia quedó reflejada en 10 de los 11 muestreos del suelo B. Los resultados reflejan que existió una elevada variabilidad en la distribución de los distintos OTUs de *Proteobacteria*. Otro resultado destacable fue el incremento de la abundancia del OTU 658 (filo *Chloroflexi*; familia *Anaerolineaceae*) en los tres suelos tratados.

Por otra parte, los **OTUs que experimentaron una disminución de su abundancia** se clasificaron dentro de los grupos III y IV, donde se hallaron distintas combinaciones. En primer lugar, OTUs que mostraron el mismo comportamiento en las tres enmiendas como los OTUs 130 (*Acidobacteria*), 421 y 428 (*Actinobacteria*) y 738 (*Firmicutes*). En cambio, sí se hallaron OTUs cuya alteración fue más relevante en algún tipo de suelo enmendado. Por ejemplo, en las muestras de suelo B y N el OTU 1515 (género *Geobacter*; *Deltaproteobacteria*), en los suelos B y A el OTU 1839 (*Gammaproteobacteria*), y en los suelos A y N el 1840 (familia *Sinobacteraceae*; *Gammaproteobacteria*).

En el grupo D (**discrepantes**), se clasificaron aquellos OTUs que mostraron resultados distintos en cada uno de los suelos enmendados. Cabe destacar que la abundancia del OTU 675 (género *Truepera*; filo *Deinococcus-Thermus*), con una elevada presencia en BC, disminuye en el suelo B y, en cambio, aumenta en los suelos A y N. En este grupo también se clasifican otros OTUs que pudieron marcar una presencia preferente en algún tipo de suelo enmendado. Por ejemplo, mostraron un incremento exclusivo el OTU 1541 (familia *Polyangiaceae*; *Deltaproteobacteria*) en el suelo B y el OTU 1017 (clase *Clostridia*) en el suelo N. En los suelos A, los OTU 507 (género *Haliscomenobacter*; *Bacteroidetes*), 1122 (género *Rhodoplanes*; *Alphaproteobacteria*) y 1286 (familia *Rhodospirillaceae*; *Alphaproteobacteria*) también incrementaron su presencia, mientras que en los suelos B y N disminuyó su abundancia.

OTU	Nivel superior	Nivel inferior	B				A				N				G	B	A	N
			T.A.	↑	↓	#	T.A.	↑	↓	#	T.A.	↑	↓	#				
1047	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira</i>	1	1		2	1	2	2	1	3	4				u	p	p
1055	<i>Planctomycetes</i>	<i>Rhodopirellula</i>	1	1		3	1	1	2	1	1	3				u	u	u
1068	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Phenylobacterium</i>	1	3		7	1	1	2	1	3	6				u	u	p
1115	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Devosia</i>	1	3		8	1	1	1	1	1	2				u	p	p
1334	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	1	4		10	1	1	3	1	1	2				u*	u	u
1852	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lysobacter</i>	1	2		4	1	3	5	1	3	7				u	u	p
658	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	1	1		4	2	1	1	3	2	3	4			u	u	u*
1099	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bosea</i>	1	3		6	1	2	2	2	2	3				u	u	u
1258	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Roseomonas</i>	2	1		2	1	2	3	1	3	6				u	u	u
130	<i>Acidobacteria_Gp25</i>	<i>Gp25</i>	3		1	1	3		1	3	3	1	2			p	p	p
421	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rubrobacter</i>	3		1	1	3		2	2	3	2	3			u	p	p
428	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	3		2	3	3		3	5	3	3	4			u	u	u
738	<i>Firmicutes.Bacilli</i>	<i>Paenibacillus</i>	3		2	3	3		2	3	3	2	4			u	p	p
1840	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Sinobacteraceae</i>	3		1	4	3		2	4	3	2	4			p	p	p
1309	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>	4	1	1	3	4		1	3	3	3	4			u	p	u
1515	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter</i>	3		4	5	4	1	1	3	3	2	4			u	u	u
1839	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Steroidobacter</i>	3		2	2	4		2	4	3	1	2			u	u	u
118	<i>Acidobacteria_Gp10</i>	<i>Gp10</i>	4	1	1	2	2	1	1	3	3	1	1			u	u	p
122	<i>Acidobacteria_Gp17</i>	<i>Gp17</i>	2	1	2	3	2	1	1	3	3	2	3			u	u	p
133	<i>Acidobacteria_Gp3</i>	<i>Gp3</i>	3		1	3	4		2	6	2	1	3			u	p	p
296	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococccineae</i>	1	1		2	4	1	1	2	4	1	1	2		u	u	p
326	<i>Actinobacteria</i>	<i>Marmoricola</i>	2	1		4	2	2	3	4	2	1	4			u	u	u
507	<i>Bacteroidetes.Sphingobacteria</i>	<i>Haliscomenobacter</i>	3		1	1	2	1	1	2	3	1	1			u	u	u
675	<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Truepera</i>	3		1	2	1	1	1	1	1	1	1			u*	p	u
1017	<i>Firmicutes.Clostridia</i>	<i>Clostridia</i>	3		1	1	4		1	2	2	1	1	4		u	u	u*
1122	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodoplanes</i>	3		1	1	2	1	2	3	2	2	4			u	u*	u
1286	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	3		1	1	1	1	1	4	2	1	5			p	p	p
1396	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Massilia</i>	1	2		5	4	1	1	5	2	1	3			u	p	p
1541	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Polyangiaceae</i>	2	1		4	3		1	4	3	2	5			u	p	p

**Tabla 35. OTUs que mostraron alteraciones tempranas en su abundancia comunes a los suelos B, A y N respecto del suelo control.**

La primera columna muestra el número del OTU (colores según el filo). Las columnas segunda y tercera indican los niveles taxonómicos, de más general a más detallado. Las siguientes columnas corresponden a los tipos de suelos (B, A y N), cada una de las cuales se dividen en cuatro subcolumnas. La primera de ellas informa del tipo de alteración (T.A.), en donde los colores verdes son incrementos y los rojos son inhibiciones; la segunda de las subcolumnas (flecha verde) indica el número de muestreos en los que aumenta su presencia, mientras que la tercera (flecha roja) donde disminuye, ambas subcolumnas contabilizan alteraciones tempranas; la cuarta subcolumna (#) indica el número de muestreos totales (tempranos y tardíos) en donde se ha encontrado alteración (incremento o inhibición), representados mediante un gradiente de amarillos y naranjas. La columna "G" categoriza a los grupos de alteraciones en las cuales se incluyen los distintos OTUs. Las tres últimas columnas indican si fueron ubicuos (u) o potenciados (p) en cada uno de los distintos tipos de tratamientos, mientras que los asteriscos (\*) informan de si esos OTUs se encuentran dentro de los 9 más abundantes de las enmiendas orgánicas (Tabla 19).

#### 4.5.7.4 OTUs comunes de los suelos B y A

Tras la aplicación de BC y LAE en el suelo se incrementó la presencia de OTUs de los filos *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* y *Verrucomicrobia* (grupo I). En cambio, los OTUs de los filos *Acidobacteria* y *Planctomycetes* disminuyeron su abundancia en los suelos tratados (grupo II).

Dentro de los OTUs del grupo D, el OTU 763 (género *Geobacillus*; *Firmicutes*) mostró una disminución de su abundancia en los suelos B, mientras que se incrementó en los suelos A, confirmando la tendencia habitual de este grupo de bacterias. Por otra parte, los OTUs de *Alphaproteobacteria* (1205 y 1216) mostraron resultados diversos y contrarios entre los distintos suelos tratados.

OTU	Nivel superior	Nivel inferior	B				A				G	B	A
			T. A.	↑	↓	#	T. A.	↑	↓	#			
259	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i>	1	4	5	1	1	1	1	I	u	u	
1305	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Novosphingobium</i>	1	1	4	1	1	2	u		u		
1533	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Nannocystis</i>	1	1	1	1	1	1	u		p		
1920	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Spartobacteria</i>	1	2	3	1	1	1	u		p		
138	<i>Acidobacteria_Gp9</i>	<i>Gp9</i>	3	1	1	3	1	1	II	u	p		
1059	<i>Planctomycetes</i>	<i>Zavarzinella</i>	3	2	5	3	2	4		u	p		
763	<i>Firmicutes.Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i>	3	1	2	1	1	2	D	u*	p		
1205	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacter</i>	2	1	2	4	1	3		u	u*		
1216	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rubellimicrobium</i>	4	1	4	1	1	2		u	p		

**Tabla 36. OTUs que mostraron alteraciones *tempranas* en su abundancia comunes a los suelos B y A.**

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 35**.

#### 4.5.7.5 OTUs comunes de los suelos B y N

Entre los OTUs cuya presencia se incrementa (grupo I) destacó el OTU 1851 que lo hace en varios muestreos (Tabla 37). Por otro lado, entre los que disminuyeron (grupos III y IV) encontramos diversos OTUs de *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, confirmándose un resultado habitual, pero también descendió la presencia de OTUs de la clase *Alphaproteobacteria*. El OTU 969 (*Clostridiales*) disminuye su presencia en el suelo B, mientras que en el suelo N se incrementa. En cambio, el resultado fue opuesto en el caso de los OTUs 1859 (*Gammaproteobacteria*) y 1923 (*Verrucomicrobia*) (grupo D).

OTU	Nivel superior	Nivel inferior	B				N				G	B	N
			T. A.	↑	↓	#	T. A.	↑	↓	#			
529	<i>Bacteroidetes.Sphingobacteria</i>	<i>Cytophagaceae</i>	1	1	2	1	1	3				u	p
1454	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Shinella</i>	1	2	6	1	1	2			I	u	u
1851	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Luteimonas</i>	1	3	7	1	2	8				u	u
125	<i>Acidobacteria_Gp1</i>	<i>Gp1</i>	3		1	2	3		1	2		p	p
135	<i>Acidobacteria_Gp5</i>	<i>Gp5</i>	3		2	3	3		1	2		u	p
396	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	3		1	2	3		1	2		u	u
425	<i>Actinobacteria</i>	<i>Solirubrobacterales</i>	3		2	2	3		2	2		u	p
1120	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pedomicrobium</i>	3		1	1	3		1	2		u	p
1123	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	3		2	2	3		1	1		u	u
1157	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	4		2	4	4		1	1	7	u	u
1217	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rubrimonas</i>	3		1	1	4		1	2		u	p
1315	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	4		3	4	4		1	3		u	p
969	<i>Firmicutes.Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	3		1	2	1		1	1		u	u*
1859	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	1	3	5	3		1	2		D	u	u
1923	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Subdivision3</i>	1	1	3	4		1	4			u	u

**Tabla 37. OTUs que mostraron alteraciones tempranas en su abundancia en comunes a los suelos B y N.**

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la Tabla 35.

#### 4.5.7.6 OTUs comunes de los suelos A y N

Los OTUs cuya abundancia se incrementó en los suelos A y N (grupos I y II) pertenecieron a la clase *Alphaproteobacteria* y al filo *Actinobacteria*, principalmente (Tabla 38). Los OTUs que mostraron una disminución en su abundancia respecto del suelo control (grupos III y IV), también pertenecieron a los mismos filos bacterianos, pero además se observó la disminución de los OTUs 659 (*Chloroflexi*) y 1543 (orden *Myxococcales*; *Deltaproteobacteria*) en ambos tipos de suelos enmendados.

El OTU 151 (subclase *Acidimicrobidae*; *Actinobacteria*) confirmó el carácter ambiguo de los OTUs de *Actinobacteria*, ya que se observaron resultados diferentes a lo largo de este análisis (grupo D).

OTU	Nivel superior	Nivel inferior	A			N			G	A	N
			T. A.	↑	↓	#	T. A.	↑			
182	<i>Actinobacteria</i>	<i>Blastococcus</i>	1	1	1	1	1	1	I	p	p
335	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microlunatus</i>	1	1	1	1	1	1	I	u	u
1265	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillum</i>	1	2	2	1	1	2	I	p	p
1273	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Oceanibaculum</i>	1	1	1	1	1	4	I	p	p
1274	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pelagibius</i>	1	1	1	1	1	5	I	p	p
1169	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Amaricoccus</i>	1	1	1	2	1	2	II	u	u
422	<i>Actinobacteria</i>	<i>Conexibacter</i>	3	1	1	3	1	1	III	u	u
1300	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Erythrobacter</i>	3	1	2	3	1	2	III	u	u
1543	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	3	1	2	3	2	4	III	p	p
659	<i>Chloroflexi</i>	<i>Caldilinea</i>	4	2	4	3	1	1	IV	u	p
1626	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Acidithiobacillus</i>	3	1	2	4	1	2	IV	u	u
151	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobidae</i>	3	1	1	1	1	1	D	u	p

**Tabla 38. OTUs que mostraron alteraciones tempranas en su abundancia comunes a los suelos A y N.**

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la Tabla 35.

#### 4.5.7.7 OTUs exclusivos del suelo B

Los OTUs 1066, 1393, 1264 (*Proteobacteria*) y 472 (*Bacteroidetes*) constituyeron una serie de OTUs cuyo incremento fue significativo en al menos dos muestreos. Entre los OTUs con alteración de tipo 2 (incrementados parcialmente) también se hallaron representantes del filo *Bacteroidetes* y el OTU 1531, de la clase *Deltaproteobacteria*, también se incrementó en los primeros muestreos del suelo B. Los OTUs pertenecientes al filo *Planctomycetes* (1050 y 1058) mostraron comportamientos heterogéneos. En este tipo de suelo también fue destacable la disminución de varios OTUs del filo *Firmicutes*, tal y como se ha observado en resultados previos.

OTU	Nivel superior	Nivel inferior	B			
			T. A.	↑	↓	#
1066	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>	1	3	5	u
1393	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Herbaspirillum</i>	1	3	5	u
1264	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	1	2	3	u
472	<i>Bacteroidetes.Sphingobacteria</i>	<i>Ferruginibacter</i>	1	2	2	u
137	<i>Acidobacteria_Gp7</i>	<i>Gp7</i>	1	1	3	u
1735	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Methylobacter</i>	1	1	3	u
1935	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobium</i>	1	1	2	u
539	<i>Bacteroidetes.Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	1	1	1	u
1531	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Kofleria</i>	2	2	3	p
483	<i>Bacteroidetes.Sphingobacteria</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	2	1	5	u
1050	<i>Planctomycetes</i>	<i>Blastopirellula</i>	2	1	2	u
1058	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	3	2	7	u*
788	<i>Firmicutes.Bacilli</i>	<i>Tumebacillus</i>	3	1	2	u
989	<i>Firmicutes.Clostridia</i>	<i>Schwartzia</i>	3	1	2	p
758	<i>Firmicutes.Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	3	1	1	u*
1287	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillales</i>	4	1	5	u
736	<i>Firmicutes.Bacilli</i>	<i>Cohnella</i>	4	1	2	u

**Tabla 39. OTUs que mostraron alteraciones tempranas en su abundancia exclusivas del suelo B.**

OTUs cuya abundancia mostró una alteración significativa y temprana respecto de S. La primera columna muestra el número del OTU (colores según el filo). Las columnas segunda y tercera indican los niveles taxonómicos, de más general a más detallado. La columna cuarta corresponde al suelo enmendado (B), que se divide en cuatro subcolumnas. La primera de ellas informa del tipo de alteración (T.A.), en donde los colores verdes son incrementos y los rojos son inhibiciones; la segunda de las subcolumnas (flecha verde) indica el número de muestreos en los que aumenta su presencia, mientras que la tercera (flecha roja) donde disminuye, ambas subcolumnas contabilizan alteraciones tempranas; la cuarta subcolumna (#) indica el número de muestreos totales (tempranos y tardíos) en donde se ha encontrado alteración (incremento o inhibición), representados mediante un gradiente de amarillos y naranjas. La última columna indica si fueron ubicuos (u) o potenciados (p), mientras que los asteriscos (\*) informan de si esos OTUs se encuentran dentro de los diez más abundantes.

#### 4.5.7.8 OTUs exclusivos del suelo A

En el suelo A se pueden destacar algunos OTUs cuya abundancia se incrementó (tipo 1 y 2) y otros en los que disminuyó (tipo 3 y 4) (**Tabla 40**). En primer lugar, se observó un incremento en la presencia del OTU 2000 (*Cyanobacteria*), siendo un resultado característico en este tipo de suelos enmendados. Además, entre otros, también se observó el incremento puntual de un OTU del filo *Verrucomicrobia* (1912).

Entre los OTUs cuya abundancia disminuyó destacamos algunos OTUs pertenecientes a varios grupos bacterianos (*Planctomycetes*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*).

OTU	Nivel superior	Nivel inferior	A			
			T. A.	↑	↓	#
2000	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	1	1	2	p
1062	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Geminicoccus</i>	1	1	1	p
1912	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Opitutus</i>	1	1	1	p
149	<i>Actinobacteria</i>	<i>Iamia</i>	2	1	2	u
1000	<i>Firmicutes.Clostridia</i>	<i>Halocella</i>	2	1	2	p
1053	<i>Planctomycetes</i>	<i>Pirellula</i>	3		3	u
405	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nitriliruptor</i>	3		2	p
482	<i>Bacteroidetes.Sphingobacteria</i>	<i>Terrimonas</i>	3		1	p
1057	<i>Planctomycetes</i>	<i>Singulisphaera</i>	4	1	5	u
1857	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	4		5	u
424	<i>Actinobacteria</i>	<i>Solirubrobacter</i>	4		2	p

**Tabla 40.** OTUs que mostraron alteraciones *tempranas* en su abundancia exclusivas del suelo A.

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 39**.

#### 4.5.7.9 OTUs exclusivos del suelo N

Entre los OTUs cuya presencia se incrementó (tipo 1 y 2) se pueden observar distintos representantes de *Actinobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacilli* y *Clostridia*. Destaca en un mayor número de muestreos el incremento de la abundancia del OTU 805 (familia *Planococcaceae*) y el 1403 (orden *Burkholderiales*) (Tabla 41). Los OTUs cuya abundancia disminuyó (tipo 3 y 4) también pertenecieron a distintos grupos (*Bacteroidetes*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Planctomycetes*). Nuevamente se aprecia la disminución de OTUs de *Planctomycetes* y de la clase *Sphingobacteria*, como en el suelo A.

OTU	Nivel superior	Nivel inferior	N			
			T. A.	↑	↓	#
310	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micromonospora</i>	1	1	1	p
1464	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Bdellovibrio</i>	1	1	1	p
1456	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Thauera</i>	2	1	1	4 u
805	<i>Firmicutes.Bacilli</i>	<i>Planococcaceae</i>	2	2	4	u
1403	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	2	2	3	p
874	<i>Firmicutes.Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	2	1	2	u
474	<i>Bacteroidetes.Sphingobacteria</i>	<i>Flavisolibacter</i>	3		1	3 p
478	<i>Bacteroidetes.Sphingobacteria</i>	<i>Niastella</i>	3		1	2 p
1536	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Nannocystineae</i>	3		1	2 u
1594	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Kluyvera</i>	3		1	2 u
1996	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	3		1	2 u
150	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobineae</i>	3		1	1 p
1281	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Skermanella</i>	4	2	1	7 p
1054	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomyces</i>	4	1	2	4 u
1378	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Polaromonas</i>	4		1	3 u

**Tabla 41. OTUs que mostraron alteraciones tempranas en su abundancia exclusivas del suelo N.**

La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la Tabla 39.

#### 4.5.8 OTUs generales ubicuos, OTUs de origen indeterminado y OTUs marcadores específicos

**¿Qué OTUs, con una abundancia elevada en las enmiendas, se incrementaron posteriormente en el suelo enmendado?**

Una manera de determinar si hubo una influencia directa por parte de las enmiendas, sobre la composición de poblaciones del suelo, se obtiene observando OTUs pertenecientes exclusivamente a las enmiendas que aparecieran en el suelo enmendado. En la **Tabla 42**, se puede observar que los OTUs de la clase *Clostridia* (1017 y 969) y de la familia *Anaerolineaceae* (658), con abundancia elevada en el lodo LANAE (**Tabla 19**), se detectaron posteriormente con una abundancia también elevada en el suelo tratado N. De forma similar ocurrió con el OTU 1122 (género *Rhodoplanes*) en el suelo A, y con el OTU 1334 (*Betaproteobacteria*) (abundante en la enmienda BC) cuya abundancia se detectó especialmente incrementada en el suelo B (durante los primeros cuatro muestreos).

OTU	Nivel superior	Nivel inferior	B			A			N			B	A	N			
			T. A.	↑	↓	#	T. A.	↑	↓	#	T. A.				↑	↓	#
1334	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	1	4		10	1	1	3	1	1	2	u*	u	u		
658	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	1	1		4	2	1	1	3	2	3	4	u	u	u*	
1017	<i>Firmicutes.Clostridia</i>	<i>Clostridia</i>	3		1	1	4		1	2	2	1	1	4	u	u	u*
1122	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodoplanes</i>	3		1	1	2	1		2	3		2	4	u	u*	u
969	<i>Firmicutes.Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	3		1	2					1	1		1	u		u*

**Tabla 42. OTUs generales ubicuos.**

OTUs con una abundancia elevada en las enmiendas, según la **Tabla 19** (destacados en amarillo) y cuya presencia se verificó en el respectivo suelo tratado. La interpretación de esta tabla se realiza como se explica en la **Tabla 35**.

### OTUs de origen indeterminado

Para este conjunto de OTUs, que no fueron detectados en el análisis de las enmiendas, los que mostraron un resultado más relevante fueron los OTUs 1447 y 1565 (ambos del filo *Proteobacteria*), los cuales marcaron el inicio de la aplicación del lodo LANAE en el suelo porque su abundancia disminuyó tras el primer y el segundo muestreo (Tabla 43).

B	Nivel superior	Nivel inferior	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
528	<i>Bacteroidetes.Sphingobacteria</i>	<i>Sporocytophaga</i>	0	0	1	15	3	1	0	0	0	0	0
1067	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacter</i>	0	5	2	0	0	0	0	1	2	5	1
1269	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Inquilinus</i>	0	0	1	0	0	0	0	12	0	1	1
A			A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8		
721	<i>Firmicutes.Bacilli</i>	<i>Lactobacillus</i>			0	0	0	0	11	0	0	0	0
1269	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Inquilinus</i>			0	14	2	1	0	1	2	9	4
N			N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8		
166	<i>Actinobacteria</i>	<i>Dietzia</i>			0	11	2	0	1	0	0	0	0
391	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomadura</i>			0	30	1	6	2	3	1	0	1
1447	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Dechloromonas</i>			15	0	0	0	0	0	0	0	0
1565	<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Sulfuricurvum</i>			187	10	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 43. OTUs de origen indeterminado.**

OTUs ordenados según el tipo de suelos enmendados. En la primera columna se presentan la numeración de los mismos. En la segunda y tercera columnas se detallan la descripción taxonómica. En las columnas posteriores se presentan los muestreos y el número de secuencias que se agruparon dentro de ese OTU, destacándose los muestreos con mayor número de secuencias.

## OTUs marcadores específicos

Este resultado destaca aquellos OTUs que podrían considerarse como **marcadores específicos** del uso alguna/as enmiendas en concreto, debido a su posible transmisión al suelo desde las enmiendas y, además, cuya presencia no se ha detectó en ninguno de los muestreos de suelo control (**Tabla 44**). Se observa que este tipo de OTUs apareció únicamente en los suelos tratados con lodo anaerobio (suelo N), aunque la procedencia de los mismos pudo ser atribuida a ambos tipos de lodos (LAE y LANAE). Los que procedieron del lodo LANAE pertenecen a los filos *Bacteroidetes* y a la clase *Deltaproteobacteria*, mientras que los que procedieron de ambos lodos (LAE/ LANAE) pertenecieron a los filos *Actinobacteria* y *Firmicutes*. En cualquier caso, todos ellos fueron detectados principalmente en los primeros muestreos y su abundancia fue disminuyendo a lo largo del análisis.

Enmien.	S. T.	OTU	Nivel superior	Nivel inferior	Número de secuencias/ número de muestreo									
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	
LANAE	N	454	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Petrimonas</i>	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		469	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidales</i>	38	14	0	0	0	0	0	0	0	0
		542	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prolixibacter</i>	21	0	0	0	0	2	0	0	0	0
		1484	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobulbus</i>	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1548*	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophaceae</i>	118	6	0	0	0	0	0	0	0	0
		1557	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophorhabdus</i>	55	1	0	0	0	0	0	1	0	0
LAE / LANAE	N	154*	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomyces</i>	48	22	0	0	0	0	0	0	0	
		790	<i>Bacilli</i>	<i>Ureibacillus</i>	22	6	0	0	0	0	0	0	0	
		843	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium</i>	11	15	1	0	0	0	0	0	0	
		846*	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	173	56	7	0	1	0	0	0	0	

**Tabla 44. OTUs marcadores específicos.**

OTUs presentes en las enmiendas y en los suelos tratados que no han sido detectados en el suelo control. En la primera columna "Enmien." se indica la enmienda o enmiendas donde se detecta el OTU. Columna "S. T." indica el **suelo tratado** en el que se ha detectado el OTU. En la tercera, cuarta y quinta columnas se detallan la numeración y la descripción taxonómica, remarcados con asterisco los que aparecen como OTUs más abundantes en las enmiendas (**Tabla 19**). En las columnas posteriores se presentan los muestreos y el número de secuencias que se agruparon dentro de ese OTU destacándose los muestreos con mayor número de secuencias.

## 4.6 Discusión

---

La aplicación de los residuos orgánicos utilizados en este trabajo modificó la estructura de las poblaciones microbianas del suelo, produciéndose el incremento relativo de algunos grupos de bacterias y el descenso de otros. Varios estudios similares registran también cambios en la estructura microbiana del suelo en un plazo corto de tiempo tras la adición de diversos residuos orgánicos (Ros *et al.*, 2006a; Ros *et al.*, 2011; Val-Moraes *et al.*, 2011) e incluso a largo plazo, después de 25 años (Bastida *et al.*, 2013). En nuestro trabajo, hemos utilizado tres tipos de enmiendas a dosis muy elevadas lo que supuso la adición de una gran cantidad de materia orgánica junto con los propios microorganismos presentes en ellas, además de otros compuestos como metales pesados y sales presentes también en las enmiendas orgánicas (Smith, 2009). De esta manera, cabe pensar que los cambios de la estructura de las poblaciones del suelo se produjeron debido a los cambios químicos y físicos provocados en el suelo, así como a la introducción de microorganismos procedentes de las propias enmiendas. A partir de estos resultados también deberíamos ser capaces de poder indicar qué cambios serían susceptibles de ser utilizados de manera sistemática tras la adición de enmiendas procedentes de residuos urbanos.

### 4.6.1 ¿De qué manera influyeron las enmiendas sobre las poblaciones bacterianas nativas del suelo?

El incremento de la materia orgánica y, concretamente, de los compuestos lábiles en los suelos enmendados pudo ser la causa principal del aumento de determinados grupos bacterianos como, por ejemplo, el de los filos **Bacteroidetes** y **Proteobacteria**. Este resultado podría justificarse debido a que, en general, se trata de microorganismos mayoritariamente copiotrofos (Fierer *et al.*, 2007; Fierer *et al.*, 2012a), por lo que su incremento, principalmente en los primeros muestreos, podría deberse a la elevada presencia de sustancias (muchas de ellas fácilmente degradables), como se constata en más investigaciones (Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Nemergut *et al.*, 2008; Cytryn *et al.*, 2011; Poulsen *et al.*, 2012; Curiel Yuste *et al.*, 2012; Fierer *et al.*, 2012a; Bastida *et al.*, 2013). En este sentido, nuestros resultados mostraron correlaciones positivas entre la abundancia de la clase **Bacteroidia** (filo **Bacteroidetes**) con el carbono orgánico ( $r=0,78$ ;  $P<0,001$ ), el fósforo disponible ( $r=0,78$ ;  $P<0,001$ ), el nitrógeno total ( $r=0,81$ ;  $P<0,001$ ) y el amonio ( $r=0,87$ ;  $P<0,001$ ). De una forma similar, la abundancia del filo **Nitrospira**, en los tres suelos enmendados, se correlacionó con la concentración del carbono lábil ( $Lp_1$ ) ( $r=0,42$ ;  $P<0,05$ ) y de nitratos ( $r=0,49$ ;  $P<0,01$ ), componentes que se incrementaron tras la adición de las enmiendas. La relación de la abundancia de **Nitrospira** con la concentración de compuestos de nitrógeno podría explicarse dado que es un grupo que interviene en los procesos de oxidación de nitrito (Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Lücker *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012a). El estudio de la abundancia a nivel de filo bacteriano aporta bastante información pero, sin embargo, el incremento medio de la abundancia relativa de algunas bacterias, como las del filo **Proteobacteria**, no fue especialmente elevado (próximo al 10 %) (Tabla 20), por lo que pensamos que realmente la alteración relevante sucedió en las proporciones de las distintas clases bacterianas que componían dicho filo, apelando a su versatilidad fisiológica y metabólica (Ros *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Bastida *et al.*, 2013). De este

modo, pudimos comprobar que se produjo un incremento diferencial de la clase **Betaproteobacteria** que ha sido detectado por otros investigadores, probablemente debido a su comportamiento copiotrofo (Fierer *et al.*, 2007; Curiel Yuste *et al.*, 2012). Además, en nuestro estudio hemos detectado que la presencia de algunos OTUs de esta clase se incrementa como consecuencia directa de la adición de las enmiendas (por ejemplo, el OTU 1334; familia *Alcaligenaceae*). Por otro lado, la abundancia de la clase **Gammaproteobacteria** también se ha relacionado con la presencia de nutrientes de diversa naturaleza (Poulsen *et al.*, 2012; Chodak *et al.*, 2014) como, por ejemplo, de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (Niepceron *et al.*, 2013), o tras la adición de enmiendas de nitrógeno inorgánico (Campbell *et al.*, 2010; Coolon *et al.*, 2013). En nuestro trabajo, la abundancia del OTU 1852 (genero *Lysobacter*; familia *Xanthomonadaceae*; **Gammaproteobacteria**) aumentó de forma significativa en varios muestreos de los tres tipos de suelos enmendados, lo que hace pensar que la abundancia de este género se encontró asociada a estas prácticas agrícolas, como ya ha sido sugerido (Gondim-Porto, 2012). Por otra parte, el incremento de la abundancia de la clase **Alphaproteobacteria** estuvo en consonancia con otros análisis que emplearon varios residuos similares a los nuestros (Val-Moraes *et al.*, 2011; Poulsen *et al.*, 2012) e, incluso, por parte de algunas investigaciones, se llega a considerar como un buen marcador del uso de enmiendas (Ros *et al.*, 2011; Bastida *et al.*, 2013). En nuestro trabajo, las correlaciones positivas, aunque bajas, con el incremento de determinadas fracciones del carbono orgánico, como la fracción lábil (Lp<sub>1</sub>) ( $r=0,33$ ;  $P<0,05$ ), podrían relacionar el incremento de esta clase bacteriana con el uso de enmiendas orgánicas, especialmente en los suelos A, como se desprende de los ANOVA de dos factores (**Tabla 29**).

Sin embargo, el incremento de la abundancia de la clase **Gammaproteobacteria** no es un buen marcador de la presencia de enmiendas orgánicas puesto que en nuestro trabajo hemos encontrado diversos ejemplos de OTUs cuya abundancia disminuyó cuando se aplicaron las enmiendas (por ejemplo, 1594, 1626 o 1839) y porque los resultados de la evolución de este filo fueron muy heterogéneos. Por otra parte, observamos una disminución generalizada de la abundancia de la clase **Deltaproteobacteria** en los suelos enmendados (OTUs: 1515, 1536 y 1543) y, de hecho, ya se propuso la presencia de esta clase de bacterias como marcadora de un suelo sin enmendar (Gondim-Porto, 2012). En nuestros análisis, existe una correlación negativa entre esta clase y la concentración de nitratos en el suelo ( $r=-0,42$ ;  $P<0,05$ ), resultado que también presentó cierta consonancia con estudios previos en los que se observó un descenso de esta clase bacteriana al enmendar el suelo con enmiendas de nitrógeno inorgánico (la correlación en ese estudio fue significativa  $r=-0,44$ ) (Fierer *et al.*, 2012a) o con lodos de depuradora (Val-Moraes *et al.*, 2011). Sin embargo, también hemos observado el incremento de la presencia de algunos OTUs de esta clase (1464, 1531 y 1533) en determinados muestreos, que pudiera ser justificado por su diverso metabolismo (Castro *et al.*, 2010; Val-Moraes *et al.*, 2011). Por lo tanto, este sería un ejemplo de la dificultad de asignar un comportamiento estricto a un grupo de bacterias, ya que dentro del mismo taxón pueden hallarse diferentes fenotipos metabólicos. De esta manera, la variedad de resultados observados en las poblaciones microbianas de suelos tratados con una elevada cantidad de nutrientes podría deberse a su versatilidad metabólica (Fierer *et al.*, 2007; DeBruyn *et al.*, 2011; Carbonetto *et al.*, 2014). Este es el caso también de **Gemmatimonadetes** y de **Actinobacteria** en

nuestros resultados. La abundancia del filo *Actinobacteria* disminuyó cuando se aplicaron las enmiendas, al igual que en trabajos previos (Köberl *et al.*, 2011; Gondim-Porto, 2012; Bastida *et al.*, 2013; Pezzolla *et al.*, 2013), lo que justificaría la asociación de este grupo de microorganismos con ambientes pobres en nutrientes (Fierer *et al.*, 2012a; Wang *et al.*, 2012b). Por el contrario, nuestros resultados mostraron que la abundancia de algunos OTUs de este filo se incrementó tras la adición de materia orgánica (149, 182, 259, 310, 335,...), como también se ha descrito anteriormente (Singh *et al.*, 2010; Nemergut *et al.*, 2010). Por su parte, los resultados de la presencia del filo *Gemmatimonadetes* fueron difíciles de interpretar aunque parece estar influido por la aplicación de las distintas enmiendas. Pese a que se trata de un grupo relacionado con los sistemas de depuración de aguas (Zhang *et al.*, 2003), su presencia se ha detectado también en suelos agrícolas de climas áridos y semiáridos (Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Jangid *et al.*, 2008; Siles *et al.*, 2014), ya que en general se adaptan bien a ambientes secos (DeBruyn *et al.*, 2011), por lo que en nuestro caso debido al carácter ambiguo observado, no propondríamos a este grupo bacteriano como un indicador de la presencia de enmiendas orgánicas.

Desde el punto de vista de la respuesta nutricional de los microorganismos, el aumento de la materia orgánica podría disminuir la presencia de algunas bacterias como, por ejemplo, *Acidobacteria*, ya que su desarrollo se asocia con suelos pobres en nutrientes debido a su carácter oligotrofo (Smit *et al.*, 2001; Fierer *et al.*, 2007; Gondim-Porto, 2012). Su disminución se ha comprobado en suelos tratados con enmiendas orgánicas (Campbell *et al.*, 2010; Ros *et al.*, 2011) y nuestros resultados también han corroborado este comportamiento donde, por ejemplo, pudimos destacar la disminución del OTU 130 (clase *Gp25*) en los tres suelos enmendados durante los primeros muestreos. Los resultados de algunas correlaciones (negativas) también podrían apoyar estos resultados como, por ejemplo, entre la abundancia de la clase *Gp1* y el carbono orgánico ( $r=-0,40$ ;  $P<0,01$ ), o de la clase *Gp17* y el nitrógeno total ( $r=-0,42$ ;  $P<0,05$ ), resultados similares a los hallados en otros trabajos en los que se aplicaron enmiendas orgánicas (Nielsen *et al.*, 2014) o enmiendas minerales con un alto contenido en nitrógeno (Fierer *et al.*, 2012a). Por el contrario, también hemos hallado correlaciones positivas que asocian la concentración de algunos nutrientes con la abundancia de algunas de las clases de *Acidobacteria* como, por ejemplo, la concentración de nitrito con las clases *Gp10* ( $r=0,35$ ;  $P<0,05$ ) y *Gp25* ( $r=0,41$ ;  $P<0,05$ ), puesto que, a juzgar por el análisis de su genoma, presentan genes implicados en la reducción de diversas especies de nitrógeno (Ward *et al.*, 2009). Pero, además de los factores fundamentalmente nutricionales, otros factores que podrían influir en la abundancia de este filo se encuentran relacionados con las variaciones edáficas, como las producidas en el pH o en la humedad del suelo (Lauber *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2010; Naether *et al.*, 2012). De hecho, se han observado varios muestreos en los que la abundancia de *Acidobacteria* se encuentra influida de forma predominante por el factor *muestreo*, pese a la interacción existente entre ambos factores (**Tabla 23**, **Tabla 27** y **Tabla 31**). En este sentido, se ha observado que en suelos naturales y enmendados, donde disminuye el pH, se observa una mayor abundancia del filo *Acidobacteria* (Lauber *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009; Chaudhry *et al.*, 2012). Sin embargo, esta explicación no sería válida en nuestro caso ya que, a pesar de disminuir el pH del suelo, se ha observado un descenso general de la proporción del filo *Acidobacteria*, según se ha comprobado también en otros suelos de carácter

alcalino enmendados y sin enmendar (Rousk *et al.*, 2010; Bastida *et al.*, 2013; Siles *et al.*, 2014). Esta contradicción podría hacernos pensar que en nuestro análisis el descenso de las acidobacterias tuvo una mayor relación con el incremento de nutrientes, como ya hemos comentado anteriormente. Coincidiendo con nuestros resultados, Siles (2014) observó que en suelos enmendados donde desciende el pH, junto con el incremento de los nutrientes, se favorece la disminución de varios grupos mayoritarios de este filo bacteriano (Siles *et al.*, 2014). Algunas de las correlaciones obtenidas en nuestro trabajo apoyarían esta última observación como, por ejemplo, el descenso del pH y la disminución de *Gp1* ( $r=0,39$ ;  $P<0,05$ ) o *Gp5* ( $r=0,47$ ;  $P<0,01$ ). Además del valor de pH del suelo, la humedad del suelo podría ser otro factor importante sobre la abundancia de este tipo de bacterias (Castro *et al.*, 2010), pero en nuestro análisis no se hallaron evidencias que relacionaran el incremento de la humedad con la variación en la presencia de este filo bacteriano. Por lo tanto, pese a los distintos factores que pueden influir sobre la abundancia de este filo, el incremento de los nutrientes parece ser el factor común y determinante a la hora de justificar la disminución de la abundancia de *Acidobacteria* en suelos enmendados.

En cambio, a diferencia de *Acidobacteria*, las bacterias del filo ***Cyanobacteria*** parecieron encontrarse más influidas por la humedad, ya que su presencia mostró una correlación negativa con la humedad del suelo ( $r=-0,33$ ;  $P<0,05$ ) que se incrementó con la adición de enmiendas. Pero, nuevamente, quizá la justificación de este descenso podría deberse más bien al incremento de la materia orgánica en el suelo, ya que se ha comprobado la relación negativa existente entre la abundancia de este grupo con el incremento nutricional producido por las enmiendas (He *et al.*, 2011; Gondim-Porto, 2012; Ramirez *et al.*, 2012; Fierer *et al.*, 2012a). En concreto, podría deberse a un exceso de nitrógeno, tal y como sugiere el trabajo de Poulsen y colaboradores (Poulsen *et al.*, 2012), sin embargo, en nuestro trabajo no se han observado resultados estadísticos que apoyaran este hecho. Otro grupo bacteriano que sufrió una disminución en su presencia tras la aplicación de las enmiendas fue ***Planctomycetes***. Este resultado parece contradictorio, considerando que varios trabajos destacan que estas bacterias son detectadas en lodos de depuradora (Snaidr *et al.*, 1997; Chouari *et al.*, 2005; Fuerst y Sagulenko, 2011), como en los tres residuos orgánicos empleados en nuestro estudio. Sin embargo, el descenso de la abundancia de las bacterias de este filo al aplicar las tres enmiendas (OTUs 1053, 1057, 1058, 1059,...), como también se ha comprobado en suelos enmendados con altas dosis de lodos de depuradora (Val-Moraes *et al.*, 2011), posiblemente fue debido a que no lograron adaptarse a las condiciones del suelo. En la bibliografía consultada no se han hallado conclusiones que definan de forma clara el comportamiento de este grupo de bacterias, las cuales se encuentran cómodas tanto en condiciones de sequía (Sheik *et al.*, 2011; Niederberger *et al.*, 2015), como en regímenes nutricionalmente pobres (Jenkins *et al.*, 2002), pero de forma contraria, también se detectan en las propias enmiendas (con alto contenido de agua y de nutrientes) (Briée *et al.*, 2007; Chiellini *et al.*, 2013), por lo que su comportamiento debería comprobarse de forma más profunda.

Aparte de las poblaciones cuya presencia se vio influida por los cambios que se producían en el suelo, como el incremento de la materia orgánica, el incremento de la humedad o la variación del pH, existieron otras poblaciones cuyo incremento pudo deberse directamente a la aplicación de las enmiendas ya que fueron detectadas en el

análisis de residuos en un primer momento y posteriormente pudieron transmitirse al suelo.

#### 4.6.2 ¿Es posible definir marcadores microbianos que delaten el uso de las enmiendas en el suelo?

Uno de los objetivos de este capítulo es el de buscar y definir de la forma más clara posible qué variaciones de la presencia de los microorganismos o grupos de microorganismos pueden utilizarse como marcadores que permitan señalar el uso de residuos urbanos en suelos agrícolas. Como se ha comentado anteriormente, por una parte, el efecto de las enmiendas contribuye a que algunos grupos proliferen mientras que otros no. Y por otra parte, algunos grupos bacterianos presentes en las enmiendas podrían transmitirse al suelo y prosperar en él tras su aplicación. Pues bien, a partir de este estudio se podrían proponer algunas poblaciones determinadas u OTUs cuyo comportamiento permitiese definir marcadores de la utilización de estos residuos en el suelo.

##### 4.6.2.1 ¿Se transmitieron y mantuvieron en el suelo las poblaciones presentes en las enmiendas orgánicas?

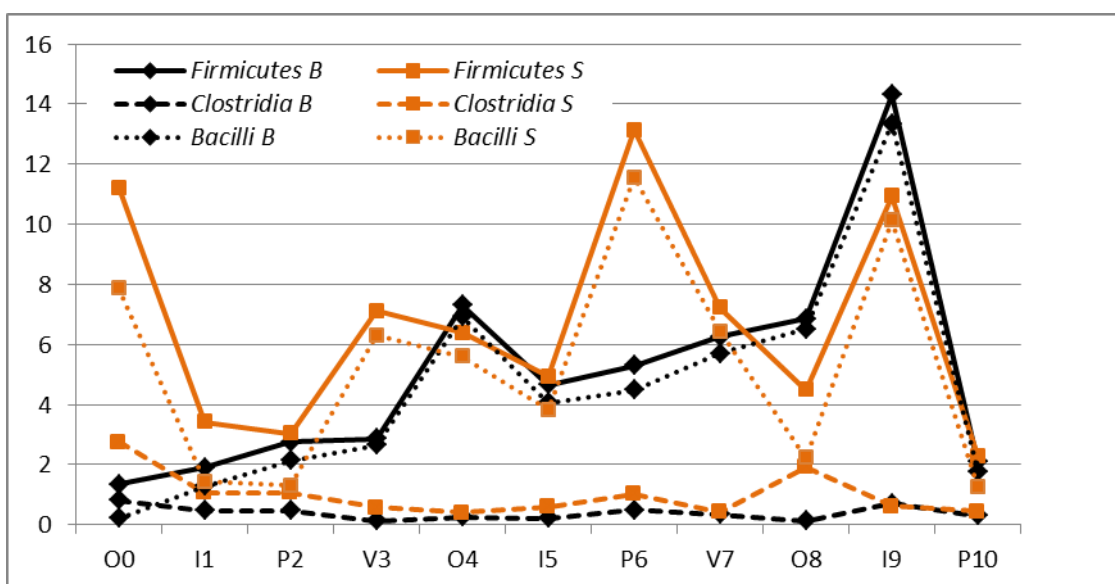
La abundancia de algunas poblaciones bacterianas en los suelos enmendados pudo haberse incrementado porque formaban parte de la composición original de las enmiendas aplicadas. Este podría ser el caso de algunas bacterias de los filos *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Synergistetes*, *Bacteroidetes* y *Chloroflexi*. De esta forma, el hecho de producirse una transmisión de las bacterias presentes en las enmiendas al suelo podría ser un indicador directo de que se han llevado a cabo estas prácticas agrícolas. Así, a partir de nuestros resultados podríamos tener dos tipos de dinámicas: la primera, que el grupo bacteriano en cuestión se encontrara en pequeña proporción en la enmienda y prosperara en el suelo enmendado, o que, en segundo lugar, se encontrara en gran proporción en la enmienda y se mantuviera en proporciones elevadas en el suelo tratado durante al menos los primeros muestreos.

Un ejemplo de la primera de las circunstancias podría ser la presencia del filo *Verrucomicrobia*, el cual ha sido relacionado con un grado de complejidad química elevado en las enmiendas (Martínez-García *et al.*, 2012; Vasileiadis *et al.*, 2013; Fierer *et al.*, 2013). Esta asociación indicaría la posible presencia de enmiendas similares a BC (enmiendas compostadas) en el suelo, las cuales contienen una mayor proporción de compuestos recalcitrantes. De hecho, la correlación entre la clase *Spartobacteria* (filo *Verrucomicrobia*) y el carbono recalcitrante fue positiva ( $r=0,38$ ;  $P<0,05$ ) y, recientemente, se han estudiado las hidrolasas específicas presentes en el genoma de estas bacterias para la degradación de hidratos de carbono complejos (Herlemann *et al.*, 2013). El incremento de *Verrucomicrobia* se pudo observar en los primeros muestreos de los suelos tratados B (OTU 1935), pese a que este tipo de bacterias no fue detectado con una abundancia especialmente elevada (1,02 %) en el análisis de la enmienda BC (**Tabla 17**). Por el contrario, en los suelos tratados con lodos (A y N) no se produjo este aumento de su abundancia, que podría justificarse por la concentración elevada de algunos nutrientes más lábiles en los lodos y, de hecho, según otros

autores, *Verrucomicrobia* se considera un grupo de bacterias con un comportamiento fundamentalmente oligotrófico (da Rocha *et al.*, 2010; Senechkin *et al.*, 2010), puesto que disminuye su abundancia en otros suelos enmendados (Bergmann *et al.*, 2011; Ramirez *et al.*, 2012).

Para el segundo tipo de dinámica, grupos bacterianos que mostraron una elevada proporción en las enmiendas, tenemos el caso del filo *Firmicutes* (cuya abundancia en los residuos fue próxima al 50 % de la abundancia total), como también se ha comprobado previamente en otros lodos de depuradora (Matches *et al.*, 1974; Rivière *et al.*, 2009; Gondim-Porto, 2012). Salvo en el caso del suelo B, se produce un aumento de la abundancia relativa de este filo en el suelo tras la adición de los lodos, lo que nos permitiría distinguir si se usó un tipo de enmienda u otro. Este aumento de *Firmicutes* en los suelos A y N podría deberse al carácter copiotrofo de estas bacterias (Nemergut *et al.*, 2010; Ramirez *et al.*, 2012), resultado que ha sido publicado previamente tras la adición de residuos orgánicos e inorgánicos (Ge *et al.*, 2008; Poulsen *et al.*, 2012), e incluso a dosis menores que las que hemos utilizado en nuestro estudio (Val-Moraes *et al.*, 2011). En cambio, en los suelos B su abundancia relativa es menor al comienzo del ensayo (**Figura 30**), lo que podría significar que las bacterias de este filo no se adaptaron a las condiciones del suelo con este tipo de enmiendas compostadas, de manera similar a lo descrito por otros autores (Kramer y Gleixner, 2008; Pezzolla *et al.*, 2013). Por tanto, la razón de estas diferencias podría encontrarse en la distinta composición química de cada enmienda. Este resultado se encontró respaldado por la influencia predominante del factor *tratamiento* sobre la que ejerció el factor *muestreo* en la evolución del filo *Firmicutes* y la clase *Clostridia* principalmente. Al igual que en el caso del filo *Proteobacteria*, la descripción desglosada del filo *Firmicutes* en clases bacterianas permite distinguir mejor los cambios producidos por cada tipo de enmienda. Así, en los suelos tratados con lodos de depuradora, al comienzo del ensayo la presencia de la clase *Clostridia* se incrementó notablemente respecto del suelo control, sugiriendo que su procedencia sería a partir de los propios lodos, puesto que en LAE y LANAE se detectó una abundancia predominante de las bacterias de la clase *Clostridia* (entre 38-48 % de la abundancia total de bacterias), mientras que en BC no llegó al 1%. Un dato muy interesante es que los OTUs de la clase *Clostridia* detectados en los lodos se incrementaron en el suelo A (por ejemplo, el OTU 1000) y, especialmente en el suelo N (OTUs 874, 969, 1017), coincidiendo con parte de los OTUs previamente observados en más suelos enmendados (Gondim-Porto, 2012). Este resultado podría apoyar la transmisión de este tipo de bacterias desde los lodos a los suelos tratados, aunque también esos mismos OTUs fueron detectados en alguno de los muestreos del suelo control, por lo que el origen podría ser dual. Sin embargo, al contrario que ocurrió con *Clostridia*, a pesar de que en BC se halló una proporción elevada de bacterias de la clase *Bacilli* (52 % de la abundancia total de bacterias), se observa una menor presencia de bacterias de esta clase en los primeros muestreos del suelo B en comparación con el suelo control (S) (véase más adelante en la **Figura 37**). La explicación de este resultado podría deberse bien a razones metodológicas, o bien a razones de competición ecológica con otras bacterias como las Gram negativas. La presencia de *Firmicutes* podría estar subestimada en este tipo de estudios basados en el análisis del DNA presente en el suelo (Janssen, 2006) debido a la extraordinaria resistencia de las endosporas que forman estos microorganismos que podría dificultar

la extracción de su material genético y su posterior amplificación (Araujo *et al.*, 2012). Sin embargo, fue posible detectar gran cantidad de OTUs de *Bacilli* y de *Clostridia* capaces de producir endosporas en las distintas enmiendas, por lo que consideramos que no debería haber razón alguna que impidiera extraer el DNA de este tipo de estructuras presentes en los suelos tratados y no de las presentes en las enmiendas. Respecto a los procesos de competición entre los microorganismos, se ha comprobado que las bacterias Gram negativas son capaces de crecer más rápido en suelos con compuestos lábiles de carbono (Griffiths *et al.*, 1998; Kramer y Gleixner, 2008), haciendo disminuir la proporción de bacterias Gram positivas como las del filo *Firmicutes*. Sin embargo, la proporción de carbono lábil en todos los suelos tratados fue similar a lo largo del tiempo, por lo que esta razón tampoco sería útil para explicar los resultados del suelo B. Por tanto, pese a que los resultados del ANOVA indicaron que la disminución de la presencia de este grupo de bacterias estuvo muy influida por el factor *tratamiento* no encontramos una justificación estadística completa para este resultado en el suelo B.



**Figura 37. Evolución del filo *Firmicutes* y sus clases bacterianas más abundantes en el suelo B.**

Aunque a una escala menor, por tener una abundancia relativa más baja, dentro del segundo tipo de dinámica propuesto se encontraría también el incremento de la abundancia de las bacterias de la clase *Erysipelotrichi* del filo *Firmicutes* en los primeros muestreos (Figura 32). Este aumento podría atribuirse de una forma más clara que el resto de las clases bacterianas de este filo a una transmisión desde las enmiendas, puesto que constituye una fracción pequeña pero relevante de los lodos (Tabla 18). Su presencia ha sido descrita en otros trabajos que estudian suelos tratados con lodo procedente de la depuración de aguas urbanas (Han *et al.*, 2011; Gondim-Porto, 2012; Poulsen *et al.*, 2012), y también en suelos tratados con desechos fecales porcinos, por lo que esta clase de bacterias podría considerarse como marcadora de contaminación fecal tras el uso de estas enmiendas orgánicas (Han *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2013).

Con un comportamiento similar a *Erysipelotrichi*, algunas bacterias del filo ***Synergistetes***, presentes en LANAE (**Figura 35**), incrementan su presencia en el suelo en el primer muestreo, al igual que en trabajos similares (Riber *et al.*, 2014). En nuestro caso podría tratarse de un indicador candidato para ser usado como marcador de la aplicación de LANAE ya que se detectó en los suelos N, especialmente al comienzo. Su presencia, descrita en digestores anaerobios (Rivière *et al.*, 2009) y, más recientemente, en lodos obtenidos mediante procesos anaerobios (Qiao *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014), podría apoyar esta última consideración.

La detección de secuencias de estos dos últimos grupos bacterianos (*Erysipelotrichi* y *Synergistetes*) como marcadoras del uso de lodos, podría tener un significado clínico puesto que *Erysipelotrichi* pertenece a un grupo de patógenos oportunistas en humanos y en animales (Hong *et al.*, 2013), mientras que, algunos autores asocian a *Synergistetes* con la microbiota del tracto intestinal de animales con patologías entéricas o con periodontitis en el caso de humanos (do Cabo Fernandes *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014). Debido a que su presencia parece estar relacionada con un origen animal, estas bacterias tienen una abundancia baja tanto en el análisis de las enmiendas como en el de los suelos. De esta forma, no hemos hallado OTUs que pudiéramos proponer como posibles marcadores fecales. No obstante, por las razones sanitarias previamente expuestas, pensamos que su análisis ha de ser también considerado cuando se analizan suelos tratados con este tipo de enmiendas.

Dentro de este mismo grupo de bacterias con presencia en los lodos y que se mantiene con una abundancia destacable durante un cierto tiempo en los suelos tratados, se encuentran algunos taxones de los filos *Bacteroidetes* y *Chloroflexi*. Estas bacterias, pertenecientes a la clase ***Bacteroidia*** y al filo ***Chloroflexi*** y descritas en el análisis de los lodos de depuradora (LAE y LANAE; **Tabla 18**), están implicadas en la degradación de diversos compuestos orgánicos (Chouari *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2007; Rivière *et al.*, 2009; Kallistova *et al.*, 2014). De manera particular, en el presente trabajo hemos observado una elevada abundancia de bacterias de la clase ***Anaerolineae*** (OTU 658; filo *Chloroflexi*) en LANAE (17,10 %) y también en el suelo N, coincidiendo con estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Gondim-Porto, 2012). No obstante, su supervivencia en el suelo no fue prolongada, posiblemente debido a que nutricionalmente se trata de un filo bacteriano de requerimientos muy específicos y que precisa valores elevados de humedad para su crecimiento (Janssen, 2006; Yoon *et al.*, 2010; Fierer *et al.*, 2012a; Ding *et al.*, 2013), por lo que su adaptación al suelo pudo verse comprometida a lo largo del tiempo. Por estas razones, el uso de estas bacterias como indicadores tempranos de la presencia de algunos lodos de depuradora podría ser de utilidad.

#### ***4.6.2.2 ¿El incremento de algunos grupos poco abundantes en el suelo podría servir como indicativo de la presencia de las enmiendas?***

La abundancia de algunos grupos bacterianos presentes en el suelo control que son poco habituales y cuya abundancia en las enmiendas fue baja o nula, se potenció tras la aplicación de las enmiendas en el suelo (OTUs *potenciados*). Por otra parte, hubo otras bacterias que hemos catalogado como de origen *indeterminado* en el

apartado de resultados (**Tabla 43**), ya que su presencia no se pudo detectar ni en la enmienda, ni en el suelo control. Ambos grupos de bacterias (*potenciadas* e *indeterminadas*) podrían indicar el uso de las enmiendas de una manera indirecta, ya que su presencia aumentaría en el suelo tratado, muy probablemente por motivos relacionados con los cambios químicos de los suelos enmendados.

Dentro del primer grupo de bacterias (*potenciadas*) nos encontramos con el filo ***Deinococcus-Thermus*** (clase ***Deinococci***; OTU 675), que se considera como un filo poco frecuente en los suelos (Janssen, 2006) pero que incrementa su presencia en suelos que presentan condiciones extremas como, por ejemplo, los de climas desérticos (Elshahed *et al.*, 2008; Theodorakopoulos *et al.*, 2013; Schwartz *et al.*, 2014). Este tipo de bacterias se detectó en la enmienda BC con una proporción relativamente elevada (3 %) posiblemente debido a su carácter termófilo (Partanen *et al.*, 2010), pero no en las enmiendas LAE y LANAE, aunque ha sido encontrado previamente en el lodo activado de una depuradora de agua marina (Sánchez *et al.*, 2011). Pero, curiosamente, tras la aplicación de las enmiendas, su presencia se incrementó especialmente en los suelos A y N, al igual que en un experimento precedente (Gondim-Porto, 2012). ¿Cuál podría ser la razón de que a pesar de no encontrarse en la enmienda aplicada aparezca en el suelo tratado? Una explicación podría ser que a pesar de haber realizado un rastreo exhaustivo (**Figura 26**. Curvas de rarefacción del suelo control (S), suelos enmendados (B, A y N) y residuos orgánicos.), no es posible detectar todos los microorganismos presentes en una muestra. Otra explicación podría ser que la máxima “*Everything is everywhere, but, environment selects*” de Lourens Baas-Becking se aplica perfectamente en un medio como es el suelo (De Wit y Bouvier, 2006). Estas bacterias se encontrarían en el suelo previamente al tratamiento pero a tan baja concentración que fueron muy difíciles de detectar, incluso con esta metodología. Tras la adición de los lodos es cuando se producen las condiciones apropiadas para el crecimiento de esos microorganismos. Posteriormente, al cambiar las condiciones ambientales, la presencia de éstos declina hasta hacerse prácticamente testimonial. Esas condiciones apropiadas que permiten el crecimiento de este grupo de microorganismos podrían ser el incremento en el contenido en sales de los suelos enmendados. Precisamente los análisis químicos de los suelos A y N confirmaron un incremento de la conductividad eléctrica en estos suelos (salinidad), a diferencia del suelo tratado con BC, lo que podría favorecer el incremento de la presencia de este tipo de bacterias en estos suelos enmendados y explicaría la correlación encontrada entre la conductividad eléctrica y su presencia ( $r=0,44$ ;  $P<0,05$ ), puesto que se trata de un grupo bacteriano que ha sido detectado en suelos ricos en sales (Theodorakopoulos *et al.*, 2013). Algo parecido sucede también con ***Nitrospira***, filo detectado con una baja abundancia solamente en el análisis de BC, pero que posteriormente se pudo confirmar el incremento de su abundancia en los tres suelos enmendados (OTU 1047). Como se comenta anteriormente (apartado 4.6.1), este aumento podría deberse al incremento de los nutrientes lábiles y algunas especies de nitrógeno en los suelos enmendados.

Por otra parte, las bacterias de la clase ***Epsilonproteobacteria*** fueron consideradas como de origen **indeterminado** ya que no fueron detectadas en el suelo control y, aunque su presencia sí se observa en el análisis de otros lodos de depuradora (Snaidr *et al.*, 1997; Stampi *et al.*, 1999; Kodama y Watanabe, 2004), en el

análisis de los residuos orgánicos empleados en nuestro trabajo no se han hallado secuencias correspondientes a este grupo. En suelos naturales se trata de un grupo bacteriano extremadamente atípico (Spain *et al.*, 2009) y su hábitat natural más frecuente son los fondos marinos que presentan condiciones de presión selectiva más extremas (Briée *et al.*, 2007). No obstante, en nuestro trabajo, fueron detectadas en los suelos N, aunque por un corto periodo de tiempo, al igual que en otro estudio realizado en suelos de Brasil (Val-Moraes *et al.*, 2011). Concretamente, el OTU 1565 (género *Sulfuricurvum*; *Epsiloproteobacteria*) fue observado en los primeros dos muestreos de los suelos N. Otros estudios también han observado su presencia en suelos tratados con heces porcinas (Hong *et al.*, 2013). Recientemente, se ha publicado el análisis de su genoma en el que se han hallado genes de resistencia que presumiblemente aumentan la supervivencia de este género en presencia de altas concentraciones de metales, además de atribuírsele cierta similitud genética con patógenos de la misma clase bacteriana (Handley *et al.*, 2014). Por lo tanto, la presencia de este tipo de bacterias en el suelo tratado podría favorecerse por las condiciones selectivas que ejercen las enmiendas durante los primeros muestreos en el suelo.

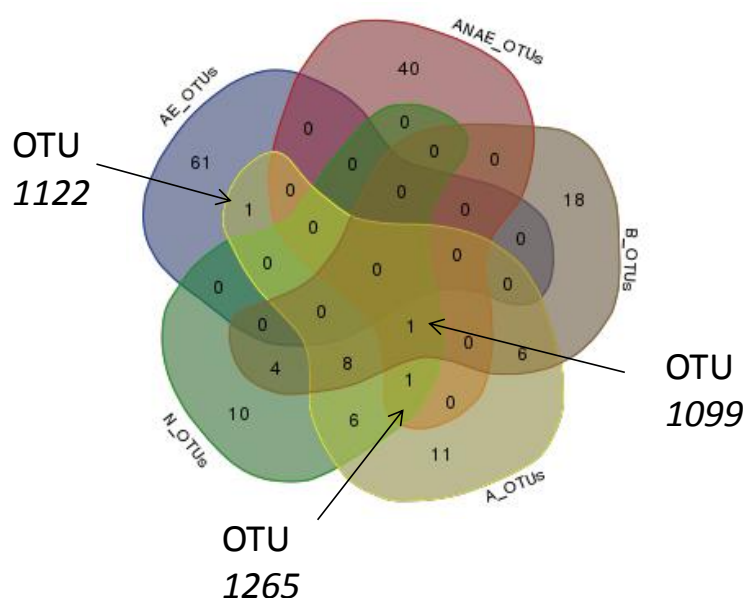
#### **4.6.2.3 ¿Podrían proponerse algunos OTUs como marcadores del uso de las enmiendas orgánicas?**

En la literatura científica consultada no se han hallado referencias que definan grupos microbianos específicos (incluso OTUs) como marcadores del uso de las enmiendas orgánicas en el suelo. Pese a ello, en los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio por la Dra. Gondim-Porto se describieron OTUs marcadores en los suelos contiguos de la misma finca agraria tratados con lodos de depuradora de digestión aerobia y anaerobia (Gondim-Porto, 2012). Apoyándonos en este trabajo (**análisis previo**), en el **análisis actual** hemos pretendido establecer si algunos de los OTUs considerados como de origen **indeterminado** (es decir, que no fueron detectados ni en las enmiendas ni en el suelo control, **Tabla 43**), como **ubicuos** y **potenciados** (es decir, que formarían parte del suelo control, aparte de proceder o no de las enmiendas, **Tabla 42**) y como **específicos** de las enmiendas (que se transmitieran de la enmienda al suelo y no se hallaran en el suelo control, **Tabla 44**) pueden ser utilizados como marcadores. Se pueden observar algunas coincidencias, pero en cualquier caso, no hemos sido capaces de detectar ningún marcador específico exclusivo que permitiera detectar la aplicación de enmiendas compostadas (tipo suelo B).

Con la comparación del primer grupo de OTUs (de origen **indeterminado**) se hallaron algunas coincidencias entre ambos experimentos. Por ejemplo: algunos OTUs descritos en los suelos B (análisis actual) coincidieron solamente con los destacados en los suelos tratados con lodo aerobio (a. previo), como 528 (género *Sporocytophaga*; *Bacteroidetes*) y 1269 (género *Inquilinus*; *Alphaproteobacteria*), por lo que su detección, además de relacionarse con los lodos aerobios, podría ampliarse también a enmiendas similares a BC. En cambio, el OTU 1067 (género *Caulobacter*; *Alphaproteobacteria*), detectado en el suelo B (a. actual), coincidió con los suelos tratados con ambos tratamientos, lodos aerobios y anaerobios (a. previo), así que su

detección podría relacionarse con el uso general de enmiendas orgánicas. Otras coincidencias fueron las de los OTUs 391 (género *Actinomadura*; *Actinobacteria*) y 1447 (género *Dechloromonas*; *Betaproteobacteria*), detectados en los suelos N (a. actual), con los mismos OTUs hallados en los suelos tratados con lodo aerobio y anaerobio en el trabajo de Gondim-Porto (a. previo), por lo que la observación conjunta de ambos experimentos propondría a este OTU como marcador general de lodos en el suelo. Las coincidencias de estos resultados confirman la utilidad de algunos OTUs como marcadores de la presencia de la enmienda.

Por otra parte, los OTUs **ubicuos o potenciados** (cuya abundancia en el suelo se incrementó tras la aplicación de las enmiendas; **Tabla 35 a Tabla 41**), fueron también reevaluados comparándolos con el análisis previo (Gondim-Porto, 2012), como se muestra en la **Figura 38**.



**Figura 38. Análisis comparativo entre OTUs marcadores.**

Mediante un diagrama de *Venn* se comparan los OTUs detectados como marcadores en el análisis previo de Gondim-Porto (designados como AE\_OTUs, suelos enmendados con lodos aerobios, y ANAE\_OTUs, suelos enmendados con lodos anaerobios) (Gondim-Porto, 2012) con los OTUs detectados en el análisis actual (N\_OTUs, B\_OTUs y A\_OTUs).

En ambos ensayos, el OTU **1122** (género *Rhodoplanes*; *Alphaproteobacteria*), presente en el suelo sin enmendar, mostró un incremento de su abundancia en los suelos enmendados con lodos aerobios (**Figura 38**). Se trata de un género bacteriano que fuimos capaces de hallar en el suelo control pero que también se ha descrito en lodos de depuradora (Hiraishi y Ueda, 1994), y se ha definido como un tipo de bacterias capaz de reducir las especies oxidadas de nitrógeno en el proceso de desnitrificación (Okamura *et al.*, 2009). Por otra parte, el OTU **1265** (género *Azospirillum*, *Alphaproteobacteria*), que previamente fue considerado como un marcador exclusivo de la enmienda ANAE (suelos tratados con lodo anaerobio del análisis previo), se ha detectado en los suelos tratados con ambos tipos de lodos (A y N) en el trabajo actual. Por lo tanto, tras esta segunda prueba, no se puede confirmar su carácter como marcador exclusivo de lodo anaerobio, pero sí podríamos

presentarlo como un marcador general del uso de lodos. De una forma similar, el OTU **1099** (género *Bosea*, *Alphaproteobacteria*) podríamos considerarlo como un marcador general del uso de enmiendas orgánicas (suelos B, A y N), puesto que previamente había sido identificado en el trabajo de Gondim-Porto aunque entonces fue designado como marcador exclusivo del uso de lodo anaerobio (LANAE) (Gondim-Porto, 2012). Varios autores han detectado este OTU en digestores con diferentes tipos de tratamientos para la depuración de aguas (Ouattara *et al.*, 2003; Sharma y Philip, 2015).

Finalmente, se realizó la comparación de los OTUs que en el análisis actual fueron designados como **OTUs marcadores específicos (Tabla 44)** con los observados en el análisis previo de Gondim-Porto en el que fueron designados como marcadores exclusivos de la aplicación de una enmienda concreta. De esta manera, hemos comprobado que algunos OTUs propuestos en el análisis actual como marcadores exclusivos de la enmienda LANAE, en realidad se trataría de marcadores de lodos en general, ya que se consideraron en el análisis previo como OTUs característicos del lodo aerobio o de ambos. Este fue el caso de algunos OTUs del filo *Bacteroidetes* como 454 y 469. El OTU 454 (género *Petrimonas*) fue designado previamente como marcador del uso del lodo aerobio mientras que el OTU 469 (orden *Bacteroidales*) anteriormente fue propuesto como marcador general de lodos (lodo aerobio y anaerobio). Con estas comparaciones solo podemos sugerir un carácter general para estos dos OTUs como marcador del uso de lodos (de cualquier tipo) en el suelo. Otro ejemplo de marcador general para el uso de lodos en el suelo sería el OTU 1557 (clase *Deltaproteobacteria*) que fue detectado en suelos tratados con LANAE (a. actual) pero que en el análisis previo apareció en suelos tratados con ambos tipos de lodo. También, a partir de los resultados del análisis actual, proponemos otros marcadores generales del uso de LAE y LANAE indistintamente, como los OTUs 154 (género *Actinomyces*, filo *Actinobacteria*), 790 (Clase *Bacilli*, filo *Firmicutes*), 843 y 846 (clase *Clostridia*, filo *Firmicutes*), de los cuales el único que coincidió con el análisis previo fue el primero de ellos. En cualquier caso, después del estudio de los datos presentados aquí, proponemos a los OTUs 542 (género *Prolixibacter*; *Bacteroidetes*), 1484 y 1548 (clase *Deltaproteobacteria*) como marcadores exclusivos del uso de las enmiendas anaerobias que no han sido observados en el análisis previo.

OTU/s propuesto/s para suelos tratados...	...A	...N	...A/N	...B/A	...B/A/N
Verificados en ambos trabajos	1122		154	528	1067
			391	1269	1099
			454		
			469		
			1265		
			1447		
Propuestos por primera vez		542	790		
		1484	843		
		1548	846		

**Tabla 45. Resumen de los OTUs verificados previamente o propuestos en el análisis actual por primera vez.**

En “verificado en ambos trabajos” se recogen los OTUs propuestos en análisis previos (Gondim-Porto, 2012) y que posteriormente fueron observados en el trabajo presente. Los OTUs propuestos como marcadores de suelo tratado “B” han sido observados únicamente en el trabajo presente bajo esas condiciones, ya que en el análisis previo no se aplicó BC. En “Propuestos por primera vez” se recogen los OTUs que han sido propuestos exclusivamente en el trabajo presente.

Tras esta comparativa de dos experimentos similares se podría concluir que establecer marcadores del uso de estos residuos en los suelos enmendados es una tarea compleja, puesto que las metodologías de obtención de unos u otros residuos son diferentes y que aún asumiendo que pudieran existir los mismos microorganismos, el crecimiento durante el proceso de producción de las enmiendas puede estimular a unos y no a otros. Además, la materia prima de origen de lodos y productos compostados puede ser muy distinta en función del tamaño y los tipos de poblaciones humanas que residen en las ciudades de procedencia (Newton *et al.*, 2015). Por todo ello, los resultados aquí descritos muestran que los OTUs que pudieran indicar la presencia o uso de los distintos tipos de enmiendas han de ser revisados con mucha cautela si se quieren proponer como marcadores específicos.

## 4.7 Conclusiones

---

1. La adición de residuos orgánicos influyó de forma significativa sobre la estructura de las poblaciones microbianas del suelo modificando su composición durante un periodo prolongado de tiempo.
2. El incremento de la materia orgánica y, en especial, de los compuestos lábiles presumiblemente favoreció el desarrollo de algunos grupos bacterianos oportunistas del suelo (como *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*) y la disminución relativa de otros con un metabolismo oligotrófico (como *Acidobacteria* y *Cyanobacteria*) en los suelos enmendados.
3. Algunos elementos de los filos *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *Planctomycetes* mostraron alteraciones en su abundancia durante todo el ensayo aunque la influencia de las enmiendas en su presencia no es clara.
4. Los cambios que produce en el suelo la adición de las enmiendas podrían estimular el crecimiento de algunos grupos bacterianos poco abundantes del suelo como *Epsiloproteobacteria*, *Deinococcus-Thermus* o *Nitrospira*.
5. La aplicación del lodo anaerobio produjo los cambios más importantes en el suelo como el incremento de la abundancia de las bacterias de los filos *Firmicutes* (clases *Clostridia* y *Erysipelotrichi*), *Synergistetes*, *Chloroflexi* (clase *Anaerolineae*) y *Bacteroidetes* (clase *Bacteroidia*) durante los primeros muestreos.
6. Pese a la complejidad del análisis se pueden proponer algunos OTUs antes no propuestos, que podrían ser usados para detectar de forma exclusiva la aplicación de lodos anaerobios en el suelo: 542 (*Bacteroidetes*), 1484 y 1548 (*Deltaproteobacteria*), o bien para la detección de ambos tipos de lodos (aerobio y anaerobio): 790, 843 y 846 (*Clostridia*). Sin embargo, en el presente trabajo no hemos podido detectar marcadores nuevos exclusivos para el uso de lodos aerobios ni para el uso de basura compostada.
7. Confirmamos el uso del OTU 1122 (*Alphaproteobacteria*) como marcador específico de lodo aerobio, con respecto a experimentos previos.
8. Por otra parte, también proponemos la detección de otros OTUs para la determinación de la presencia de diferentes enmiendas en suelos tratados con:
  - a. lodos (aerobio y anaerobio): 154 y 391 (*Actinobacteria*), 454 y 469 (*Bacteroidetes*), 1265, 1447 y 1557 (*Proteobacteria*).
  - b. basura compostada y lodo aerobio: 528 (*Bacteroidetes*) y 1269 (*Proteobacteria*).
  - c. los tres tipos de enmiendas: 1067 y 1099 (*Proteobacteria*).

## Capítulo V

---

### 5 Reflexión final



## 5.1 ¿Cómo es el impacto microbiológico en el suelo tras la adición de enmiendas orgánicas? Resistencia y resiliencia

---

En el análisis realizado hemos podido comprobar que los parámetros microbianos estudiados son sensibles a las perturbaciones que causa la aplicación de enmiendas orgánicas en el suelo, es decir, que las poblaciones microbianas nativas no fueron resistentes a los cambios. Esta observación está en consonancia con la revisión de trabajos similares realizada por Allison y Martiny (2008) en la que se observó que más del 80 % de los suelos enmendados con residuos orgánicos mostraban sensibilidad frente a las perturbaciones causadas por estos productos (Allison y Martiny, 2008). No obstante, pese a esta ausencia de resistencia, se pudieron observar diferentes grados de alteración en los tres tipos de suelos enmendados. Concretamente, al poco tiempo de añadirse las enmiendas, en el suelo tratado con lodo anaerobio fue donde se registró un mayor número de cambios, tanto a nivel de la respiración basal y de la biomasa, como de los perfiles metabólicos o taxonómicos. Gracias a ello también se pudieron definir un mayor número de caracteres o marcadores relacionados con la aplicación de estas enmiendas.

Puesto que en todos los suelos se hallaron alteraciones significativas, quizá lo interesante sería valorar hasta qué momento persistieron dichas alteraciones. En este sentido se ha comprobado que tras dos años de estudio siguieron registrándose diferencias significativas en todas las características analizadas en los tres suelos tratados, por lo que no podemos determinar claramente qué tratamiento indujo efectos menos duraderos, o dicho de otra manera, qué suelo mostró poblaciones con una mayor resiliencia a los cambios. Este hecho es habitual ya que en un elevado número de trabajos similares las perturbaciones duraron varios años (Allison y Martiny, 2008; Bastida *et al.*, 2013). Posiblemente, las dosis tan elevadas de enmiendas, que mantuvieron sus efectos químicos y físicos hasta el final del análisis, promovieron la persistencia de los cambios microbianos en el suelo durante el periodo de análisis.

Un aspecto interesante relacionado con la resistencia y la resiliencia de las poblaciones microbianas en los mismos suelos consistiría en determinar el efecto que se produciría en ellas tras una nueva aplicación del mismo tipo de enmiendas años después del presente análisis. En ese hipotético caso, ¿mostrarían el mismo nivel de alteraciones que el estudio actual? Diversos trabajos hablan del concepto de tolerancia comunitaria inducida por estrés o “entrenamiento” que pueden adquirir los microorganismos tras ser sometidos previamente a condiciones similares como, por ejemplo, estados de sequía severos que incrementan la resiliencia de las poblaciones frente a nuevas condiciones de sequía (Schimel *et al.*, 2007a; Berard *et al.*, 2012). En nuestro caso particular, las poblaciones de los suelos previamente tratados podrían estar más preparadas para amortiguar el incremento masivo y repentino de la materia orgánica, sin sufrir tantas variaciones en su patrón metabólico ni taxonómico como ha sucedido en el presente trabajo. Otro aspecto interesante que tener en cuenta en el suelo tratado con enmiendas orgánicas consiste en su nivel de diversidad microbiana. El mantenimiento de niveles elevados de diversidad microbiana en el suelo juega un papel importante en la resistencia frente a las perturbaciones, al ser capaces las

poblaciones de desarrollar un mayor número de funciones (Gardi y Jeffery, 2009; Bardgett y van der Putten, 2014). Una situación en la que no se produciría una disminución del número de funciones sucedería cuando organismos diferentes son capaces de realizar procesos metabólicos similares en el suelo. Este hecho se denomina redundancia funcional y gracias a él las poblaciones del suelo podrían sobreponerse a los cambios que inducen las perturbaciones sin reducir el número original de funciones, obviamente si su sensibilidad a estas perturbaciones es distinta. En nuestro trabajo, el estudio de los perfiles metabólicos tras la aplicación de enmiendas parece señalar un aumento de la diversidad funcional, el cual puede encontrarse muy relacionado con el aumento a nivel de la diversidad taxonómica y, por ende, la aplicación de enmiendas en el suelo podría favorecer la capacidad de resistencia del suelo.

## 5.2 Entonces, ¿qué residuo es más conveniente para su uso en agricultura y cuál es su influencia en el medio ambiente?

---

Pese a las modificaciones de índole general que se producen en los suelos enmendados de nuestro trabajo, existen modificaciones más específicas que dependen del tipo de enmienda que se añade al suelo (Bastida *et al.*, 2008b; Bowles *et al.*, 2014). En función de los resultados observados, a nivel tanto edáfico como microbiano, se podría recomendar el uso de enmiendas compostadas para ser utilizadas en una sola aplicación durante el plazo de al menos dos años.

A nivel químico, consideramos que el uso de enmiendas compostadas es más favorable debido a la mayor proporción de carbono recalcitrante que se añade con estos residuos (junto con el carbono lábil que de por sí se añade). Este tipo de carbono complejo permitiría el mantenimiento de la materia orgánica en el suelo durante un periodo prolongado de tiempo. Por el contrario, los lodos de depuradora aplicados aportan una mayor proporción de carbono lábil en el suelo que promueve el incremento de su mineralización (en forma de CO<sub>2</sub>) en vez de permanecer en el suelo. Desde la perspectiva de las características físicas del suelo, la estabilidad de los agregados formados en el suelo B es mayor, lo que significa un punto a favor adicional en términos de salud del suelo. Desde un enfoque más sanitario, químicamente las enmiendas compostadas son menos nocivas que los lodos sin compostar debido al tratamiento térmico que sufren en su elaboración. En estos términos existen diversos trabajos que también muestran preferencia por el uso de residuos orgánicos compostados (Diacono y Montemurro, 2010; Tarrasón *et al.*, 2010; Jorge-Mardomingo *et al.*, 2013; Sciubba *et al.*, 2014).

Desde el punto de vista microbiano, este tipo de enmienda parece ser la que causó menos impacto sobre las poblaciones microbianas del suelo. En primer lugar, a nivel fisiológico, ya que a pesar de que se incrementaron la respiración y la biomasa tras la aplicación de la enmienda en el suelo B, se alcanzó una estabilidad en el cociente metabólico (qCO<sub>2</sub>) a lo largo del segundo año, el cual fue incluso más bajo que el observado en el suelo control. Por otra parte, aunque ocurrió especialmente en los primeros muestreos, los resultados de los perfiles de consumo de sustratos (CLPPs)

mostraron un aumento de la diversidad funcional con respecto al resto de suelos enmendados, por lo que esto podría ser positivo en términos de resistencia, como hemos comentado anteriormente. En segundo lugar, a nivel taxonómico, podríamos resaltar que con estas enmiendas no se introdujeron microorganismos potencialmente patógenos, por lo que desde un punto de vista sanitario este tipo de enmiendas ofrece mayores garantías.

### 5.3 ¿Qué relación existe entre las modificaciones en el perfil metabólico y los cambios poblacionales?

---

Establecer la relación entre la estructura de las poblaciones microbianas y su perfil metabólico en el suelo (estructura-funcionalidad) permitiría comprender de forma más profunda los cambios que suceden en éste ante diversas perturbaciones, tal y como sugieren algunas investigaciones (Zak *et al.*, 2003; Allison y Martiny, 2008; Bastida *et al.*, 2013). Sin embargo, se trata de una tarea de extrema complejidad (Achenbach y Coates, 2000; Nielsen *et al.*, 2011) y, en muchas ocasiones, solamente se llegan a definir unos pocos marcadores que ayudan a esclarecer dicha relación (Fierer *et al.*, 2007; Allison y Martiny, 2008). Es más, incluso el verdadero problema no acabaría ahí ya que las técnicas empleadas presentan varias limitaciones. Una de ellas reside en la escala de trabajo utilizada en los ensayos *in vitro*, puesto que las pequeñas cantidades de suelo usadas habitualmente en estos análisis en realidad representan una parte pequeña del ecosistema (Treseder *et al.*, 2012) que, en muchas ocasiones, se intenta compensar con el número de muestras analizadas. Otras de las limitaciones serían los factores espacial y temporal, ya que las poblaciones microbianas son distintas en función de las diferentes condiciones de cada punto de muestreo y de cada momento (Fierer y Jackson, 2006; Philippot *et al.*, 2009; Bardgett y van der Putten, 2014). Por todas estas razones describir la ecología del suelo sigue siendo una tarea compleja y, por ello, en diversos estudios se intentan utilizar modelos que ayuden a extrapolar los datos obtenidos a pequeña escala (Wieder *et al.*, 2013; Cederlund *et al.*, 2014; Powell *et al.*, 2015).

Una de las formas de establecer nuevos modelos se basa en el uso de marcadores microbianos que caractericen las poblaciones microbianas en función de su atributos biológicos (e. g. fisiológicos, como la respiración o la biomasa) (Webb *et al.*, 2010) para, posteriormente, intentar comprender el comportamiento de los microorganismos con el medio que los rodea (McGill *et al.*, 2006; Allison, 2012). Estos modelos permitirían predecir qué procesos fisiológicos se producirían y de qué manera, así como la presencia/ausencia o la proporción de las especies a lo largo de diferentes condiciones del suelo (Webb *et al.*, 2010; Allison, 2012). En este sentido, existen diversos trabajos que intentan definir atributos microbianos en suelos que sufren alteraciones climatológicas, como pueden ser la sequía o las precipitaciones (Schimel *et al.*, 1999; Allison y Martiny, 2008; Allison y Treseder, 2008; Castro *et al.*, 2010). En nuestro caso, hemos intentado encontrar indicadores, y correlaciones entre ellos, que permitieran alimentar modelos publicados que intentan predecir el comportamiento del suelo en función de las actividades microbianas (Manzoni *et al.*, 2014) con el fin de definir lo que ocurriría en suelos tratados con enmiendas orgánicas.

El incremento de la respiración basal y de la biomasa microbiana, inducido por la presencia de la materia orgánica (según se explica en el capítulo II), se correlacionó positivamente con los valores de las tasas de consumo de la alanina (aminoácido) y de la fructosa y la glucosa (azúcares), y de forma negativa con las tasas de consumo de algunos ácidos orgánicos como el ácido cítrico y el ácido málico (**Tabla 46**). Asumimos que los microorganismos responsables de esos incrementos de respiración y biomasa son copiotrofos y oportunistas, por lo que sugerimos la posible relación entre estas poblaciones y el incremento del consumo de algunos azúcares y aminoácidos junto con la disminución del metabolismo de algunos ácidos orgánicos.

	Á. cítrico	Á. málico	Alanina	Fructosa	Glucosa
Respiración basal		-0,34	0,33	0,50	0,39
Biomasa microbiana	-0,43	-0,49	0,34	0,47	0,41

**Tabla 46. Correlaciones significativas ( $P < 0,05$ ) entre las variables fisiológicas y las tasas de consumo de algunos sustratos.**

Las correlaciones positivas se colorean en azul y las negativas en rosa.

Estas correlaciones refuerzan el posible uso de la glucosa como un marcador importante de la aplicación de enmiendas orgánicas (**Tabla 46**). Debido al comportamiento observado en el análisis de CLPPs, este sustrato ya había sido sugerido previamente como marcador (tardío) de suelos tratados con residuos orgánicos (capítulo III) y, además, se correlaciona de forma individual pero significativa con algunos OTUs bacterianos como se muestra a continuación en la **Tabla 47**. Estos OTUs pertenecen fundamentalmente a *Proteobacteria*, filo en el que una gran parte de microorganismos que lo integran presentan una nutrición copiotrofa. Así, en futuros ensayos de suelos tratados con enmiendas orgánicas podríamos asociar un incremento en el uso de este sustrato con un incremento en la proporción de determinados OTUs de las clases *Beta* y *Gammaproteobacteria*. Aparte del caso de la glucosa, la abundancia relativa de varios OTUs de *Proteobacteria* o de la familia *Planococcaceae* (OTU 805, filo *Firmicutes*) mostró una correlación positiva con la evolución de las tasas de consumo de otro azúcar como la arabinosa o con aminoácidos como la lisina y el GABA (**Tabla 47**). Entre estas correlaciones se puede resaltar la del consumo de lisina con el OTU 805, debido a que fue observada de forma exclusiva.

También nos resultó muy interesante el comportamiento de los OTUs de la clase *Deltaproteobacteria*. Por regla general, la presencia de las bacterias de esta clase disminuyó cuando se aplicaron las enmiendas, y de hecho las correlaciones que se hallaron entre este grupo bacteriano y algunos nutrientes añadidos con las enmiendas (Nitratos:  $r = -0,42$ ;  $P < 0,05$ ) u otras propiedades (conductividad  $r = -0,36$ ;  $P < 0,05$  o humedad del suelo  $r = -0,33$ ;  $P < 0,05$ ) fueron negativas, aunque no especialmente altas. Sin embargo, a nivel de estructura-funcionalidad se observó que la abundancia de algunos OTUs de esta clase (1522 y 1536) se correlacionó de forma positiva con el consumo de algunos azúcares y aminoácidos (**Tabla 47**). Por esta razón se sugiere prestar una atención mayor al análisis concreto de estas bacterias en suelos enmendados.

Grupo microbiano / OTU		Tasa de consumo de...			
		Lisina	GABA	Glucosa	Arabinosa
<b>Bacilli</b>					
<b>805</b>	<i>Planococcaceae</i>	0,53			
<b>Alphaproteobacteria</b>					
<b>1121</b>	<i>Prosthecomicrobium</i>		0,67		0,56
<b>1216</b>	<i>Rubellimicrobium</i>		0,51		
<b>Betaproteobacteria</b>					
<b>1391</b>	<i>Collimonas</i>		0,54		0,54
<b>1393</b>	<i>Herbaspirillum</i>			0,56	
<b>1396</b>	<i>Massilia</i>			0,73	
<b>1454</b>	<i>Shinella</i>			0,65	
<b>Deltaproteobacteria</b>					
<b>1522</b>	<i>Cystobacter</i>				0,5
<b>1536</b>	<i>Nannocystineae</i>		0,51		
<b>Gammaproteobacteria</b>					
<b>1839</b>	<i>Steroidobacter</i>				0,53
<b>1857</b>	<i>Stenotrophomonas</i>			0,56	

**Tabla 47. Correlaciones significativas ( $P < 0,001$ ) entre OTUs y tasas de consumo de algunos sustratos.**

Todas las correlaciones fueron positivas.

Haciendo referencia al poder discriminatorio de los ácidos orgánicos destacados en el capítulo III, hemos encontrado una serie de correlaciones (significativas aunque no especialmente fuertes) entre sus tasas de consumo y algunos grupos bacterianos, que refuerzan el uso como marcador de alguno de estos compuestos (Tabla 48). De esta forma, se aprecia que las tasas de consumo del ácido protocatéutico, sustrato de difícil degradación, se correlacionan de forma negativa con varios taxones y OTUs del filo *Proteobacteria*, correspondientes principalmente a organismos copiotrofos y oportunistas. Por el contrario, esas tasas se correlacionan de forma positiva con la abundancia de *Acidobacteria* (y algunos OTUs concretos de ese filo y clases y algunos pertenecientes a filos distintos), el cual presenta un metabolismo oligotrofo. Aunque somos conscientes de que esta última observación no implica necesariamente que la degradación de este sustrato complejo sea llevada a cabo por *Acidobacteria*, se puede decir que la disminución de la abundancia de este grupo bacteriano, que ocurre cuando se añaden enmiendas, coincide con la disminución relativa de la degradación del ácido protocatéutico. Por esta razón, el uso del ácido protocatéutico en el ensayo de CLPPs es importante ya que muestra un número de correlaciones significativas relevante (Tabla 48), probablemente debido a que es un

compuesto difícil de degradar, más próximo a las ligninas y compuestos análogos que se encuentran de manera natural en el suelo.

De la misma manera, las correlaciones obtenidas entre el uso del ácido cítrico y la abundancia de diversos grupos microbianos indican que se trata de un buen marcador. El consumo de ácido cítrico se correlaciona negativamente con una serie de OTUs, sin coincidir con los que se correlacionaron con el consumo del ácido protocatéutico, con lo que podemos hallar diferencias discriminatorias entre el consumo de las poblaciones del suelo (**Tabla 48**). Estos resultados confirman la bondad de este marcador puesto que ya nos permitió diferenciar entre los patrones de consumo de las poblaciones asociadas a los diferentes suelos tratados (capítulo III). En cambio, el análisis de otros ácidos orgánicos, como el oxálico o el málico, no nos reportó tanta información como para considerarlos tan determinantes de los cambios sufridos en el suelo.

	Tasa de...			Tasa de...			Tasa de...	
	Á. prot.	Á. cít.		Á. prot.	Á. cít.		Á. prot.	Á. cít.
<b>Acidobac.</b>	0,37		<b>134</b>	0,37		<b>1069</b>	α	0,39
<b>Actino.</b>	-0,34		<b>135</b>	0,37		<b>1115</b>	α	-0,32
<b>Gemmatmdts.</b>	0,33		<b>136</b>	0,33		<b>1117</b>	α	0,34
<b>Proteobac.</b>	-0,40		<b>396</b>	0,32		<b>1205</b>	α	-0,35
<b>Gp2</b>		0,82	<b>425</b>	0,43		<b>1305</b>	α	-0,35
<b>Gp4</b>	0,35		<b>474</b>	0,45		<b>1309</b>	α	-0,34
<b>Gp5</b>	0,36		<b>529</b>		-0,38	<b>1334</b>	β	-0,40
<b>Gp6</b>	0,35		<b>632</b>		-0,36	<b>1393</b>	β	-0,38
<b>Actino.</b>	-0,34		<b>659</b>	-0,35		<b>1454</b>	β	-0,32
<b>Caldil.</b>		-0,43	<b>736</b>		-0,39	<b>1456</b>	β	-0,34
<b>Gemmatmdts.</b>	0,31		<b>1042</b>	0,39		<b>1522</b>	δ	-0,38
<b>Betaprot.</b>	-0,33					<b>1531</b>	δ	0,38
						<b>1558</b>	δ	0,49**

**Tabla 48. Correlaciones entre grupos bacterianos u OTUs y tasas de consumo de ácido protocatéutico y cítrico.**

Las correlaciones positivas se colorean en azul y las negativas en rosa. Todas mostraron una significación de  $P < 0,05$ , excepto \*\*, cuya significación fue de  $P < 0,01$ .

Consideramos que estos datos contribuirían a dilucidar la relación estructura-funcionalidad de las poblaciones microbianas del suelo mediante su introducción en modelos del tipo previamente indicado. Es más, según la bibliografía que hemos consultado, creemos que estos datos son los primeros publicados que permiten relacionar el consumo de determinados sustratos con grupos concretos de microorganismos (mucho de ellos géneros bacterianos) en suelos tratados con enmiendas orgánicas procedentes del tratamiento de residuos urbanos. No obstante, Nielsen y colaboradores fueron capaces de correlacionar la presencia/abundancia de determinados OTUs con algunas características edáficas y microbianas en suelos

enmendados con *biochar* (una especie de carbón vegetal). Sin embargo, éste y muchos otros trabajos publicados, solo realizan un análisis al final del ensayo (Poulsen *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015). En nuestro trabajo, en cambio, se realiza un seguimiento trimestral a lo largo de dos años, lo que proporciona un elevado número de datos que concede un rigor estadístico significativo a nuestros resultados.

## 5.4 ¿De qué manera podrían aplicarse los hallazgos encontrados?

---

En el trabajo aquí expuesto proponemos la determinación de un conjunto de marcadores característicos de una o varias enmiendas que permitirían detectar de forma rápida la presencia de éstas en el suelo, indicar la calidad de un suelo tras la utilización de dichas enmiendas (posibles patógenos, índices fisiológicos, diversidad funcional) y, como hemos comentado, ayudar a establecer relaciones entre la estructura de las poblaciones y su funcionalidad. Estos marcadores son de carácter metabólico o de carácter taxonómico.

Para determinar el primer tipo de marcadores proponemos el uso de un dispositivo con un fundamento similar al de MicroResp<sup>TM</sup>, basado en unas modificaciones recientemente sugeridas (Swallow y Quideau, 2015). En el trabajo de Swallow se propone realizar el ensayo en una placa de incubación con un menor número de pocillos (24 en vez de 96) de mayor tamaño. La introducción de esta mejora salvaría los problemas que conlleva el uso de pequeñas cantidades de suelo, además de la perturbación que supone su tamización. A partir de nuestros resultados, sugerimos el uso de un número reducido de sustratos como, por ejemplo, la glucosa, la arginina, el ácido protocatéquico y el ácido cítrico que consideramos que presentan cierta relevancia en la identificación de diferencias metabólicas entre las poblaciones, aunque podrían usarse otros más especializados en función de las enmiendas aplicadas que se comentan posteriormente. De la misma manera se determinaría la respiración basal y la biomasa microbiana a lo largo de 4 horas. Todas estas determinaciones metabólicas podrían llevarse a cabo en un solo día, permitiendo describir en el suelo analizado la diversidad funcional, la respiración, la biomasa y los índices fisiológicos.

Para determinar el segundo conjunto de marcadores, podríamos utilizar la técnica de la PCR cuantitativa (qPCR) usando cebadores específicos para la detección selectiva de los grupos bacterianos y OTUs propuestos en este trabajo. Mediante esta metodología se podría cuantificar en el plazo de pocas horas la presencia de microorganismos concretos o de grupos de microorganismos, lo que ayudaría a describir la estructura de las poblaciones microbianas presentes en el suelo así como la presencia de posibles patógenos tras la aplicación de enmiendas.

Desde nuestro punto de vista, también consideramos que el número y tipo de sustratos empleados en el ensayo de CLPPs podría adecuarse a ensayos más específicos, ya que no todos los sustratos fueron lo suficiente informativos. En este sentido se han realizado modificaciones de MicroResp<sup>TM</sup> en las que únicamente el consumo de glucosa es suficiente para evaluar el efecto tóxico de metales en el suelo (Wakelin *et al.*, 2013). Por tanto, se podrían proponer nuevos juegos de sustratos

basándonos en que en los suelos expuestos a un tipo de enmienda determinado se seleccionan poblaciones microbianas que degradan mejor los sustratos presentes en ese tipo de enmienda. Cabe recordar que los sustratos que recomienda MicroResp™ son compuestos químicos de carácter general que secretan las raíces (Campbell *et al.*, 2003), por lo que quizá esta metodología no estaría bien adaptada al ensayo de suelos tratados con enmiendas orgánicas. Así, si se adaptaran los sustratos a sustratos similares a los de las enmiendas se podrían determinar con una mayor exactitud si hay diferencias metabólicas entre las poblaciones de los suelos tratados con enmiendas compostadas o sin compostar, por ejemplo.

Además de para mejorar la detección del tipo de enmienda aplicada, también sugerimos el uso de sustratos específicos para otro tipo de experimentos. Por ejemplo sustratos basados en compuestos contaminantes del suelo, como herbicidas, metales o derivados farmacéuticos con el fin de diseñar nuevos experimentos sobre suelos previamente enmendados con residuos orgánicos. Concretamente, proponemos la evaluación de la respuesta de las poblaciones del suelo frente a la presencia de compuestos derivados de herbicidas. Estos compuestos son utilizados de forma habitual en agricultura, pero su uso inapropiado puede ser una amenaza para la microbiota del suelo (Tejada, 2009; Bacmaga *et al.*, 2015). Considerando este problema, proponemos evaluar si los suelos previamente enmendados son más resistentes a la presencia de herbicidas (como diflufenicán, mesosulfuron-metil,...). En función de los resultados que se obtuvieran en dicho experimento, se podría valorar un posible efecto beneficioso adicional del uso de las enmiendas orgánicas en el suelo. En caso de que las poblaciones de los suelos enmendados presentasen una mayor degradación de estos herbicidas, se podrían seleccionar dichas poblaciones con el fin de ser estudiadas para conocer los procesos de biorremediación de suelos contaminados con un exceso de agroquímicos (Singh y Singh, 2014). Estableciendo un paralelismo con la anterior propuesta, esta metodología también se podría aplicar al estudio de la degradación de disruptores endocrinos, compuestos recalcitrantes que causan efectos graves en especies animales, que ya están siendo detectados en suelos tratados con lodos de depuradora urbana (Rhind *et al.*, 2013).

## 5.5 Reflexión final

---

En nuestro trabajo se han detallado una serie de modificaciones relacionadas con el uso de tres tipos de enmiendas orgánicas procedentes de residuos urbanos, las cuales indican que existen diferencias en la microbiota del suelo a partir de diversos indicadores fisiológicos y metabólicos de las poblaciones microbianas, así como en la composición de las poblaciones bacterianas que lo forman. Además, la influencia de cada enmienda en el suelo fue diferente según el indicador que se midió. Es decir, para las variables de respiración y biomasa y para los perfiles de consumo se observó una influencia mayor de la aplicación de BC en el suelo, por el contrario, los suelos tratados con lodos de depuradora presentaron un mayor número de alteraciones en la estructura de sus poblaciones bacterianas. A pesar de ello, consideramos que todos los indicadores han de tenerse en cuenta de una forma integradora, ya que son complementarios entre sí. A pesar de que este trabajo se basa en el estudio del comportamiento de las poblaciones microbianas en el suelo tras una aplicación de

enmiendas orgánicas, muchos de los datos obtenidos podrían extrapolarse a otras situaciones del suelo, por lo que podemos decir que se contribuye al conocimiento de la microbiología del suelo en general.

A lo largo de dos años hemos comprobado que el suelo sufre alteraciones de forma casi inmediata que van disminuyendo, pero sin dejar de manifestarse hasta en el último de los muestreos. Esas alteraciones se deben a la “explosión biológica” del crecimiento de las poblaciones microbianas y su metabolismo, originada por la adición de una gran cantidad de compuestos presentes en las enmiendas y las modificaciones físicas producidas por éstas en el suelo. Algunos de los indicadores estudiados desde el punto de vista de la salud del suelo resultaron positivos a lo largo del tiempo como en el caso del cociente metabólico ( $qCO_2$ ) de los suelos tratados con basura compostada (BC). Así, el valor de este índice fisiológico fue mejor que el del suelo control, aunque hubo notables alteraciones en la estructura de las poblaciones y en sus perfiles metabólicos. La cuestión sería la siguiente, ¿qué son más relevantes en términos de salud del suelo, los indicadores fisiológicos o los relacionados con estructura-funcionalidad? Según la definición de salud de suelo de Doran (Doran y Zeiss, 2000; Doran, 2002), lo más importante para ésta parecen ser los factores relativos a la fisiología de las poblaciones, mientras que la estructura de esas poblaciones se contempla solamente en términos de diversidad sin importar qué microorganismos concretos la conforman. En esta definición, por la que apuestan también otros investigadores (Bran Nogueira Cardoso *et al.*, 2013), lo importante es que el suelo siga siendo un recurso natural al servicio de los seres humanos, independientemente de qué seres biológicos lo integren. Pero quizá la definición de salud del suelo sea demasiado antropocéntrica todavía. Desde el punto de vista de nuestro trabajo, microbiológico, esto nos hace reflexionar sobre la importancia que existe en profundizar de forma más global en los tipos de indicadores microbianos, es decir, en busca de qué es lo que hacen y quiénes son los microorganismos que se encuentran en el suelo. Con estudios similares al presente deberíamos ser capaces de establecer cuáles son aquellos más apropiados en términos de información, versatilidad, rapidez y coste para ser utilizados en la descripción de la salud del suelo.



## **6 Conclusiones**



## 6.1 Conclusiones

---

1. La respiración basal de los suelos enmendados fue superior a la del suelo control durante el primer año tras la adición de las enmiendas. Este incremento dependió especialmente de los nutrientes más fácilmente degradables (lábilés).
2. La respiración basal durante el segundo año de ensayo fue superior a la del suelo control solo en el caso de los suelos tratados con lodos de depuradora, lo que indica que la naturaleza química de las mismas es determinante en cuanto a la respuesta microbiana que se produce.
3. La biomasa microbiana se incrementó en los suelos enmendados durante todo el ensayo, independientemente del tipo de tratamiento. En particular, el aumento de la humedad y el de la cantidad de algunos compuestos de nitrógeno parecen regular este incremento.
4. Las poblaciones de los distintos suelos provocaron un incremento considerable del valor de  $qCO_2$ , en algunos casos presumiblemente achacable al incremento de la actividad de una parte de la población, pero en otros casos como una respuesta al estrés que supone la presencia de algunas enmiendas.
5. La aplicación de la enmienda compostada (BC) produjo un incremento en términos globales de la materia orgánica del suelo y disminuyó la producción de  $CO_2$ , suponiendo un impacto más moderado sobre las poblaciones del suelo.
6. La adición de enmiendas al suelo produce un cambio en el perfil de consumo de una serie de sustratos que es distinto en función del tipo de enmienda utilizada.
7. Por regla general, el consumo de azúcares y aminoácidos se incrementó, mientras que el de ácidos orgánicos disminuyó, probablemente por el desarrollo de poblaciones oportunistas en el suelo que presentan un consumo preferente por los primeros.
8. El consumo del ácido protocatéquico disminuyó en las parcelas enmendadas posiblemente debido al incremento de la cantidad de compuestos lábilés de carbono fáciles de metabolizar.
9. El análisis del número de alteraciones significativas totales del consumo y de los valores de  $qCO_2$  de los sustratos permitió comprobar que los efectos de la aplicación de enmiendas perduraron más de dos años, lo que indica que la repercusión metabólica de las dosis aplicadas ha de medirse en plazos de tiempo superiores a los dos años.
10. Los consumos de arginina, glucosa, ácido cítrico y ácido protocatéquico fueron característicos de la presencia en los suelos de enmiendas orgánicas por lo que podrían ser utilizados como marcadores para determinar la existencia de alteraciones en el suelo.
11. La adición de residuos orgánicos influyó de forma significativa sobre la estructura de las poblaciones microbianas del suelo modificando su composición durante un periodo prolongado de tiempo.

12. El incremento de la materia orgánica y, en especial, de los compuestos lábiles presumiblemente favoreció el desarrollo de algunos grupos bacterianos oportunistas del suelo (como *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*) y la disminución relativa de otros con un metabolismo oligotrófico (como *Acidobacteria* y *Cyanobacteria*) en los suelos enmendados.
13. Algunos elementos de los filos *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *Planctomycetes* mostraron alteraciones en su abundancia durante todo el ensayo aunque la influencia de las enmiendas en su presencia no es clara.
14. Los cambios que produce en el suelo la adición de las enmiendas podrían estimular el crecimiento de algunos grupos bacterianos poco abundantes del suelo como *Epsilonproteobacteria*, *Deinococcus-Thermus* o *Nitrospira*.
15. La aplicación del lodo anaerobio produjo los cambios más importantes en el suelo como el incremento de la abundancia de las bacterias de los filos *Firmicutes* (clases *Clostridia* y *Erysipelotrichi*), *Synergistetes*, *Chloroflexi* (clase *Anaerolineae*) y *Bacteroidetes* (clase *Bacteroidia*) durante los primeros muestreos.
16. Pese a la complejidad del análisis se pueden proponer algunos OTUs antes no propuestos, que podrían ser usados para detectar de forma exclusiva la aplicación de lodos anaerobios en el suelo: 542 (*Bacteroidetes*), 1484 y 1548 (*Deltaproteobacteria*), o bien para la detección de ambos tipos de lodos (aerobio y anaerobio): 790, 843 y 846 (*Clostridia*). Sin embargo, en el presente trabajo no hemos podido detectar marcadores nuevos exclusivos para el uso de lodos aerobios ni para el uso de basura compostada.
17. Confirmamos el uso del OTU 1122 (*Alphaproteobacteria*) como marcador específico de lodo aerobio, con respecto a experimentos previos.
18. Por otra parte, también proponemos la detección de otros OTUs para la determinación de la presencia de diferentes enmiendas en suelos tratados con:
  - a. lodos (aerobio y anaerobio): 154 y 391 (*Actinobacteria*), 454 y 469 (*Bacteroidetes*), 1265, 1447 y 1557 (*Proteobacteria*).
  - b. basura compostada y lodo aerobio: 528 (*Bacteroidetes*) y 1269 (*Proteobacteria*).
  - c. los tres tipos de enmiendas: 1067 y 1099 (*Proteobacteria*).

## **7 Bibliografía**



Abubaker J, Cederlund H, Arthurson V y Pell M. (2013). Bacterial community structure and microbial activity in different soils amended with biogas residues and cattle slurry. *Applied Soil Ecology*, **72**: 171-180.

Achenbach LA y Coates JD. (2000). Disparity between bacterial phylogeny and physiology - Comparing 16S rRNA sequences to assess relationships can be a powerful tool, but its limitations need to be considered. *American Society for Microbiology News*, **66**: 714-715.

Acosta-Martínez V, Dowd S, Sun Y y Allen V. (2008). Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**: 2762-2770.

Acosta-Martínez V, Cruz L, Sotomayor-Ramírez D y Pérez-Alegría L. (2007). Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Applied Soil Ecology*, **35**: 35-45.

Agren GI, Wetterstedt JA y Billberger MFK. (2012). Nutrient limitation on terrestrial plant growth: modeling the interaction between nitrogen and phosphorus. *New Phytologist*, **194**: 953-960.

Alkorta I et al. (2003). Molecular microbial biodiversity assessment: a biological indicator of soil health. *Reviews on environmental health*, **18**.

Allison SD. (2012). A trait-based approach for modelling microbial litter decomposition. *Ecology Letters*, **15**: 1058-1070.

Allison SD y Martiny JBH. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**: 11512-11519.

Allison SD y Treseder K. (2008). Warming and drying suppress microbial activity and carbon cycling in boreal forest soils. *Global Change Biology*, **14**: 2898-2909.

Álvaro-Fuentes J et al. (2009). Soil aggregation and soil organic carbon stabilization: effects of management in semiarid mediterranean agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, **73**: 1519-1529.

Anderson JPE y Domsch KH. (1978). Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **10**: 207-213.

Anderson TH y Domsch KH. (1993). The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental-conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **25**: 393-395.

Anderson TH y Domsch KH. (1990). Application of ecophysiological quotients (qCO<sub>2</sub> and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology & Biochemistry*, **22**: 251-255.

Anderson TH. (2003). Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **98**: 285-293.

Anderson TH y Domsch KH. (1989). Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **21**: 471-479.

- Anderson TH y Domsch KH. (2010). Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. *Soil Biology & Biochemistry*, **42**: 2039-2043.
- Antolín MC et al. (2005). Growth, yield and solute content of barley in soils treated with sewage sludge under semiarid mediterranean conditions. *Field Crops Research*, **94**: 224-237.
- Aparna K, Pasha MA, Rao DLN y Krishnaraj PU. (2014). Organic amendments as ecosystem engineers: Microbial, biochemical and genomic evidence of soil health improvement in a tropical arid zone field site. *Ecological Engineering*, **71**: 268-277.
- Araujo JF et al. (2012). Characterization of soil bacterial assemblies in brazilian savanna-like vegetation reveals *Acidobacteria* dominance. *Microbial Ecology*, **64**: 760-770.
- Arshad MA y Martin S. (2002). Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **88**: 153-160.
- Atlas RM y Bartha R (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Prentice Hall, Madrid.
- Austin AT et al. (2004). Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia*, **141**: 221-235.
- Babujia L, Hungria M, Franchini J y Brookes P. (2010). Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. *Soil Biology & Biochemistry*, **42**: 2174-2181.
- Bacmaga M et al. (2015). Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with a mixture of diflufenican + mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl-sodium. *Environmental Science and Pollution Research International*, **22**: 643-656.
- Bailey VL, Peacock AD, Smith JL y Bolton H. (2002). Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation-extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, **34**: 1385-1389.
- Baker GC, Smith JJ y Cowan DA. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, **55**: 541-555.
- Banerjee MR, Burton DL y Depoe S. (1997). Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics. *Agriculture Ecosystems & Environment*, **66**: 241-249.
- Banning NC et al. (2012). Analysis of soil microbial community level physiological profiles in native and post-mining rehabilitation forest: Which substrates discriminate? *Applied Soil Ecology*, **56**: 27-34.
- Bardgett RD y Saggar S. (1994). Effects of heavy metal contamination on the short-term decomposition of labelled <sup>14</sup>C-glucose in a pasture soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **26**: 727-733.
- Bardgett RD y van der Putten WH. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, **515**: 505-511.
- Bastida F, Hernández T, Albaladejo J y García C. (2013). Phylogenetic and functional changes in the microbial community of long-term restored soils under semiarid climate. *Soil Biology & Biochemistry*, **65**: 12-21.

- Bastida F, Kandeler E, Hernández T y García C. (2008a). Long-term effect of municipal solid waste amendment on microbial abundance and humus-associated enzyme activities under semiarid conditions. *Microbial Ecology*, **55**: 651-661.
- Bastida F et al. (2008b). Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, **40**: 318-329.
- Bastida F, Moreno JL, García C y Hernández T. (2007). Addition of urban waste to semiarid degraded soil: Long-term effect. *Pedosphere*, **17**: 557-567.
- Bastida F et al. (2009). Role of amendments on N cycling in Mediterranean abandoned semiarid soils. *Applied Soil Ecology*, **41**: 195-205.
- Bastida F, Zsolnay A, Hernández T y García C. (2008c). Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma*, **147**: 159-171.
- Bastida F et al. (2012). Effects of organic amendments on soil carbon fractions, enzyme activity and humus-enzyme complexes under semi-arid conditions. *European Journal of Soil Biology*.
- Bastida F, Moreno JL, Hernández T y García C. (2006). Microbiological activity in a soil 15 years after its devegetation. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**: 2503-2507.
- Bennett LT, Mele PM, Annett S y Kasel S. (2010). Examining links between soil management, soil health, and public benefits in agricultural landscapes: An Australian perspective. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **139**: 1-12.
- Berard A et al. (2011). Resilience of soil microbial communities impacted by severe drought and high temperature in the context of Mediterranean heat waves. *European Journal of Soil Biology*, **47**: 333-342.
- Berard A, Ben Sassi M, Renault P y Gros R. (2012). Severe drought-induced community tolerance to heat wave. An experimental study on soil microbial processes. *Journal of Soils and Sediments*, **12**: 513-518.
- Berard A et al. (2014). Use of the MicroResp<sup>TM</sup> method to assess pollution-induced community tolerance in the context of metal soil contamination. *Ecological Indicators*, **40**: 27-33.
- Bergmann GT et al. (2011). The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, **43**: 1450-1455.
- Bevivino A et al. (2014). Soil Bacterial Community Response to Differences in Agricultural Management along with Seasonal Changes in a Mediterranean Region. *PLoS ONE*, **9**: e105515.
- Bhatia CR (2008). *Role of Microbial Diversity for Soil, Health and Plant Nutrition* en Nautiyal C y Dion P (Eds) *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence*. Pp 53-74. Springer Berlin Heidelberg.
- Bini D et al. (2013). Effects of land use on soil organic carbon and microbial processes associated with soil health in southern Brazil. *European Journal of Soil Biology*, **55**: 117-123.
- Bitton G (2010). *Sludge Microbiology* en *Wastewater Microbiology*. Pp 383-408. John Wiley & Sons, Inc..
- Bitton G (2005). *Introduction to wastewater treatment* en *Wastewater microbiology*. Pp 213-223. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.

Blagodatskaya E y Kuzyakov Y. (2008). Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biology and Fertility of Soils*, **45**: 115-131.

Blagodatsky SA, Heinemeyer O y Richter J. (2000). Estimating the active and total soil microbial biomass by kinetic respiration analysis. *Biology and Fertility of Soils*, **32**: 73-81.

Blanco H y Lal R (2010). *Principles of soil conservation and management*. Springer, Dordrecht, Netherlands.

BOE. (1990). Real Decreto 1310-1990, de 29 de octubre, por el cual se regula la utilización de los lodos de depuradora en el sector agrario.

BOE. (2009). Resolución de 20 de enero de 2009, de la Secretaría de Estado de Cambio Climático, por la que se publica el Acuerdo del consejo de Ministros por el que se aprueba el Plan Nacional Integrado de Residuos para el período 2008-2015.

BOE. (2011). Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados.

BOE. (2013). Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario.

Bolan NS et al. (2012). Stabilization of carbon in composts and biochars in relation to carbon sequestration and soil fertility. *Science of The Total Environment*, **424**: 264-270.

Bongiovanni MD y Lobartini JC. (2006). Particulate organic matter, carbohydrate, humic acid contents in soil macro- and microaggregates as affected by cultivation. *Geoderma*, **136**: 660-665.

Bonjoch X y Blanch A. (2009). Resistance of faecal coliforms and enterococci populations in sludge and biosolids to different hygienisation treatments. *Microbial Ecology*, **57**: 478-483.

Bossio DA, Scow KM, Gunapala N y Graham KJ. (1998). Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, **36**: 1-12.

Bowles TM, Costa-Martínez V, Calderón F y Jackson LE. (2014). Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biology & Biochemistry*, **68**: 252-262.

Bradley RL y Fyles JW. (1995). A kinetic parameter describing soil available carbon and its relationship to rate increase in C mineralization. *Soil Biology & Biochemistry*, **27**: 167-172.

Bran Nogueira Cardoso EJ et al. (2013). Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? *Scientia Agricola*, **70**: 274-289.

Briée C, Moreira D y López-García P. (2007). Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology*, **158**: 213-227.

Brochier V et al. (2012). Occurrence of pathogens in soils and plants in a long-term field study regularly amended with different composts and manure. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **160**: 91-98.

Brockett BFT, Prescott CE y Grayston SJ. (2011). Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. *Soil Biology & Biochemistry*, **44**: 9-20.

Brookes PC et al. (2008). The mineralisation of fresh and humified soil organic matter by the soil microbial biomass. *Waste Management*, **28**: 716-722.

Brookes PC, Powlson DS y Jenkinson DS. (1982). Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **14**: 319-329.

Brussaard L et al. (2004). Biological soil quality from biomass to biodiversity-importance and resilience. *Managing Soil Quality: Challenges in Modern Agriculture*, 139-162.

Buckeridge KM, Banerjee S, Siciliano SD y Grogan P. (2013). The seasonal pattern of soil microbial community structure in mesic low arctic tundra. *Soil Biology & Biochemistry*, **65**: 338-347.

Burton J, Chen CR, Xu ZH y Ghadiri H. (2010). Soil microbial biomass, activity and community composition in adjacent native and plantation forests of subtropical Australia. *Journal of Soils and Sediments*, **10**: 1267-1277.

Buscot F (2005). *What are soils?* en Varma A y Buscot F (Eds) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Pp 3-17. Springer, Berlin, Germany.

Cai QY et al. (2007). Concentration and speciation of heavy metals in six different sewage sludge-composts. *Journal of Hazardous Materials*, **147**: 1063-1072.

Campbell BJ et al. (2010). The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. *Environmental Microbiology*, **12**: 1842-1854.

Campbell CD et al. (2008). Long term repeated burning in a wet sclerophyll forest reduces fungal and bacterial biomass and responses to carbon substrates. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**: 2246-2252.

Campbell CD, Grayston SJ y Hirst DJ. (1997). Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, **30**: 33-41.

Campbell CD et al. (2003). A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 3593-3599.

Campbell, C. D., Chapman, S. J., and Davidson, Mitchell S. (2006). *Microresp. Technical Manual. A versatile soil respiration system.*

Carbonell G et al. (2009). Sewage sludge applied to agricultural soil: Ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 1309-1319.

Carbonell G et al. (2011). Effects of municipal solid waste compost and mineral fertilizer amendments on soil properties and heavy metals distribution in maize plants (*Zea mays* L.). *Chemosphere*, **85**: 1614-1623.

Carbonetto B et al. (2014). Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine pampas. *PLoS ONE*, **9**.

Carpenter-Boggs L, Kennedy AC y Reganold JP. (2000). Organic and biodynamic management effects on soil biology. *Soil Science Society of America Journal*, **64**: 1651-1659.

Castaldi P, Garau G y Melis P. (2008). Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and water-soluble fractions. *Waste Management*, **28**: 534-540.

Castro HF et al. (2010). Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 999-1007.

Cederlund H et al. (2014). Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial communities with predictable responses of major bacterial phyla. *Applied Soil Ecology*, **84**: 62-68.

Cellier A et al. (2012). Use of urban composts for the regeneration of a burnt Mediterranean soil: A laboratory approach. *Journal of Environmental Management*, **95**: S238-S244.

Chakraborty A, Chakrabarti K, Chakraborty A y Ghosh S. (2011). Effect of long-term fertilizers and manure application on microbial biomass and microbial activity of a tropical agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, **47**: 227-233.

Chaparro J, Sheflin A, Manter D y Vivanco J. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, **48**: 489-499.

Chapman SJ, Campbell CD y Artz RRE. (2007). Assessing CLPPs using MicroResp<sup>(TM)</sup> - A comparison with biolog and multi-SIR. *Journal of Soils and Sediments*, **7**: 406-410.

Chaudhry V et al. (2012). Changes in bacterial community structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. *Microbial Ecology*, **64**: 450-460.

Chen JK et al. (2008). Substrate-induced changes in microbial community-level physiological profiles and their application to discriminate soil microbial communities. *Journal of Environmental Sciences-China*, **20**: 725-731.

Chiellini C et al. (2013). Characterization and comparison of bacterial communities selected in conventional activated sludge and membrane bioreactor pilot plants: a focus on *Nitrospira* and *Planctomycetes* bacterial phyla. *Current Microbiology*, **67**: 77-90.

Chishaki N y Horiguchi T (1997). *Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency* en Ando T, Fujita K, Mae T, Matsumoto H, Mori S y Sekiya J (Eds) *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment*. Pp 341-345. Springer Netherlands.

Chodak M et al. (2014). Soil chemical properties affect the reaction of forest soil bacteria to drought and rewetting stress. *Annals of Microbiology*, 1-11.

Chouari R et al. (2005). Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environmental Microbiology*, **7**: 1104-1115.

Choudhary OP et al. (2011). Effects of long-term use of sodic water irrigation, amendments and crop residues on soil properties and crop yields in rice-wheat cropping system in a calcareous soil. *Field Crops Research*, **121**: 363-372.

- Chowdhury S, Farrell M y Bolan N. (2014). Priming of soil organic carbon by malic acid addition is differentially affected by nutrient availability. *Soil Biology & Biochemistry*, **77**: 158-169.
- Claesson MJ et al. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research*, **38**: e200.
- Clarke BO y Smith SR. (2011). Review of "emerging" organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International*, **37**: 226-247.
- Coleman DC, Gupta V y Moore JC (2012). *Soil ecology and agroecosystem studies* en *Microbial Ecology in Sustainable Agroecosystems*. Pp 1-21. CRC Press.
- Coleman DC y Wall DH (2015). *Chapter 5 - Soil Fauna: Occurrence, Biodiversity, and Roles in Ecosystem Function* en Paul EA (Eds) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. Pp 111-149. Academic Press, Boston.
- Cook BD y Allan DL. (1992). Dissolved organic-carbon in old field soils - total amounts as a measure of available resources for soil mineralization. *Soil Biology & Biochemistry*, **24**: 585-594.
- Coolon JD et al. (2013). Long-term nitrogen amendment alters the diversity and assemblage of soil bacterial communities in tallgrass prairie. *PLoS ONE*, **8**.
- Cordovil C, de Varennes A, Pinto R y Fernandes R. (2011). Changes in mineral nitrogen, soil organic matter fractions and microbial community level physiological profiles after application of digested pig slurry and compost from municipal organic wastes to burned soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **43**: 845-852.
- Costanza R et al. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, **387**: 253-260.
- Creamer R et al. (2014). Measuring basal soil respiration across Europe: Do incubation temperature and incubation period matter? *Ecological Indicators*, **36**: 409-418.
- Curiel Yuste J et al. (2007). Microbial soil respiration and its dependency on carbon inputs, soil temperature and moisture. *Global Change Biology*, **13**: 2018-2035.
- Curiel Yuste J et al. (2014). Strong functional stability of soil microbial communities under semiarid Mediterranean conditions and subjected to long-term shifts in baseline precipitation. *Soil Biology & Biochemistry*, **69**: 223-233.
- Curiel Yuste J et al. (2012). Changes in soil bacterial community triggered by drought-induced gap succession preceded changes in soil C stocks and quality. *Ecology and Evolution*, **2**: 3016-3031.
- Curiel Yuste J et al. (2011). Drought-resistant fungi control soil organic matter decomposition and its response to temperature. *Global Change Biology*, **17**: 1475-1486.
- Currey PM et al. (2010). Turnover of labile and recalcitrant soil carbon differ in response to nitrate and ammonium deposition in an ombrotrophic peatland. *Global Change Biology*, **16**: 2307-2321.

- Cytryn E et al. (2011). Short-term structure and functional changes in bacterial community composition following amendment with biosolids compost. *Applied Soil Ecology*, **48**: 160-167.
- da Rocha UN et al. (2010). Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the *Verrucomicrobia* subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere. *Journal of Soils and Sediments*, **10**: 326-339.
- de Araujo ASF, de Melo WJ y Singh RP. (2010). Municipal solid waste compost amendment in agricultural soil: changes in soil microbial biomass. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, **9**: 41-49.
- de Santiago-Martín A et al. (2013). Metal extractability patterns to evaluate (potentially) mobile fractions in periurban calcareous agricultural soils in the Mediterranean area—analytical and mineralogical approaches. *Environmental Science and Pollution Research*, **20**: 6392-6405.
- De Wit R y Bouvier T. (2006). Everything is everywhere, but, the environment selects; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology*, **8**: 755-758.
- DeBruyn JM et al. (2011). Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 6295-6300.
- Degens BP y Harris JA. (1997). Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, **29**: 1309-1320.
- DeSantis TZ et al. (2006). NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Research*, **34**: W394-W399.
- Dexter AR. (2004). Soil physical quality: Part I. Theory, effects of soil texture, density, and organic matter, and effects on root growth. *Geoderma*, **120**: 201-214.
- Diacono M y Montemurro F. (2010). Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **30**: 401-422.
- Dilly O. (2001). Microbial respiratory quotient during basal metabolism and after glucose amendment in soils and litter. *Soil Biology & Biochemistry*, **33**: 117-127.
- Ding GC et al. (2013). Changes of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semi-arid ecosystem. *PLoS ONE*, **8**.
- do Cabo Fernandes C, Rechenberg DK, Zehnder M y Belibasakis GN. (2014). Identification of *Synergistetes* in endodontic infections. *Microbial Pathogenesis*, **73**: 1-6.
- Doran JW. (2002). Soil health and global sustainability: translating science into practice. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **88**: 119-127.
- Doran JW y Zeiss MR. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, **15**: 3-11.
- Edgar RC et al. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, **27**: 2194-2200.
- Eigenberg RA et al. (2002). Electrical conductivity monitoring of soil condition and available N with animal manure and a cover crop. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **88**: 183-193.

- Eilers KG, Lauber CL, Knight R y Fierer N. (2010). Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **42**: 896-903.
- El Azhari N et al. (2012). Long-term impact of 19 years' farmyard manure or sewage sludge application on the structure, diversity and density of the protocatechuate-degrading bacterial community. *Agriculture Ecosystems & Environment*, **158**: 72-82.
- Elshahed MS et al. (2008). Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 5422-5428.
- Enwall K et al. (2007). Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**: 106-115.
- Epstein E (1997). *The science of composting*. Technomic Publishing, Lancaster, USA.
- Epstein E. (1998). Pathogenic health aspects of land application. *Biocycle*, **39**: 62.
- Esteller MV, Martínez-Valdés H, Garrido S y Uribe Q. (2009). Nitrate and phosphate leaching in a Phaeozem soil treated with biosolids, composted biosolids and inorganic fertilizers. *Waste Management*, **29**: 1936-1944.
- European Commission. (1986). Council Directive 86/278/EEC of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture.
- European Commission. DG Environment. (2004). Preliminary Impact Assessment for an Initiative on the Biological Treatment of Biodegradable Waste.
- Fanin N, Hättenschwiler S, Schimann H y Fromin N. (2015). Interactive effects of C, N and P fertilization on soil microbial community structure and function in an Amazonian rain forest. *Functional Ecology*, **29**: 140-150.
- Farrell M et al. (2010). Microbial diversity and activity are increased by compost amendment of metal-contaminated soil. *Fems Microbiology Ecology*, **71**: 94-105.
- Feng Y et al. (2003). Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology & Biochemistry*, **35**: 1693-1703.
- Fernández-Getino AP et al. (2012). Restoration of abandoned, degraded agricultural soil using composted biosolid: influence on selected soil properties. *Arid Land Research and Management*, **26**: 200-210.
- Ferreras L et al. (2006). Effect of organic amendments on some physical, chemical and biological properties in a horticultural soil. *Bioresource Technology*, **97**: 635-640.
- Fierer N, Bradford MA y Jackson RB. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, **88**: 1354-1364.
- Fierer N, Colman BP, Schimel JP y Jackson RB. (2006). Predicting the temperature dependence of microbial respiration in soil: A continental-scale analysis. *Global Biogeochemical Cycles*, **20**.
- Fierer N y Jackson RB. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 626-631.

- Fierer N et al. (2012a). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME Journal*, **6**: 1007-1017.
- Fierer N y Schimel JP. (2003). A proposed mechanism for the pulse in carbon dioxide production commonly observed following the rapid rewetting of a dry soil. *Soil Science Society of America Journal*, **67**: 798-805.
- Fierer N y Schimel JP. (2002). Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biology & Biochemistry*, **34**: 777-787.
- Fierer N, Schimel JP y Holden PA. (2003). Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology & Biochemistry*, **35**: 167-176.
- Fierer N et al. (2013). Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States. *Science*, **342**: 621-624.
- Fierer N et al. (2012b). Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**: 21390-21395.
- Filip Z. (2002). International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **88**: 169-174.
- Fisk M y Fahey T. (2001). Microbial biomass and nitrogen cycling responses to fertilization and litter removal in young northern hardwood forests. *Biogeochemistry*, **53**: 201-223.
- Fließbach A, Martens R y Reber HH. (1994). Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology & Biochemistry*, **26**: 1201-1205.
- Fließbach A, Oberholzer HR, Gunst L y Mäder P. (2007). Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **118**: 273-284.
- Fontaine S, Mariotti A y Abbadie L. (2003). The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology & Biochemistry*, **35**: 837-843.
- Fourti O. (2013). The maturity tests during the composting of municipal solid wastes. *Resources, Conservation and Recycling*, **72**: 43-49.
- Fraç M, Oszust K y Lipiec J. (2012). Community Level Physiological Profiles (CLPP), characterization and microbial activity of soil amended with dairy sewage sludge. *Sensors*, **12**: 3253-3268.
- Frac M et al. (2014). Soil microbial functional and fungal diversity as influenced by municipal sewage sludge accumulation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **11**: 8891-8908.
- Franco-Otero V et al. (2012). Short-term effects of organic municipal wastes on wheat yield, microbial biomass, microbial activity, and chemical properties of soil. *Biology and Fertility of Soils*, **48**: 205-216.
- Frey SD, Elliott ET y Paustian K. (1999). Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients. *Soil Biology & Biochemistry*, **31**: 573-585.

- Frey SD (2015). *Chapter 8 - The Spatial Distribution of Soil Biota* en Paul EA (Eds) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. Pp 223-244. Academic Press, Boston.
- Frostegård Å, Tunlid A y Bååth E. (1991). Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*, **14**: 151-163.
- Fuerst JA y Sagulenko E. (2011). Beyond the bacterium: *Planctomycetes* challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews Microbiology*, **9**: 403-413.
- Gallardo A y Schlesinger W. (1992). Carbon and nitrogen limitations of soil microbial biomass in desert ecosystems. *Biogeochemistry*, **18**: 1-17.
- Gans J, Wolinsky M y Dunbar J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, **309**: 1387-1390.
- Garbeva P, van Veen JA y van Elsas JD. (2004). Microbial Diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, **42**: 243-270.
- Garbisu C, Alkorta I y Epelde L. (2011). Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance. *Applied Soil Ecology*, **49**: 1-4.
- García C, Hernández T y Costa F. (1992). Mineralization in a calcareous soil of a sewage-sludge composted with different organic residues. *Waste Management & Research*, **10**: 445-452.
- García-Gil JC, Plaza C, Soler-Rovira P y Polo A. (2000). Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, **32**: 1907-1913.
- García-Orenes F et al. (2009). Effects of agricultural management on surface soil properties and soil–water losses in eastern Spain. *Soil & Tillage Research*, **106**: 117-123.
- García-Orenes F et al. (2010). Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil & Tillage Research*, **109**: 110-115.
- García-Orenes F, Morugan-Coronado A, Zornoza R y Scow K. (2013). Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a Mediterranean agro-ecosystem. *PLoS ONE*, **8**.
- Gardi, C. and Jeffery, S. (2009). Soil biodiversity. European Commission. Joint Research Centre. Institute for Environment and Sustainability. Land Management & Natural Hazards Unit.
- Gardiner DT y Miller RW (2008). *Soils in our environment*. Pearson prentice hall, New Jersey.
- Garland JL, Mackowiak CL y Zabaloy MC. (2010). Organic waste amendment effects on soil microbial activity in a corn-rye rotation: Application of a new approach to community-level physiological profiling. *Applied Soil Ecology*, **44**: 262-269.
- Garland JL y Mills AL. (1991). Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 2351-2359.
- Garland JL, Roberts MS, Levine LH y Mills AL. (2003). Community-level physiological profiling performed with an oxygen-sensitive fluorophore in a microtiter plate. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 2994-2998.

- Ge T et al. (2013). Microbial biomass, activity, and community structure in horticultural soils under conventional and organic management strategies. *European Journal of Soil Biology*, **58**: 122-128.
- Ge Y et al. (2008). Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China. *Journal of Soils and Sediments*, **8**: 43-50.
- Geisseler D, Horwath WR, Joergensen RG y Ludwig B. (2010). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review. *Soil Biology & Biochemistry*, **42**: 2058-2067.
- Geisseler D, Horwath WR y Scow KM. (2011). Soil moisture and plant residue addition interact in their effect on extracellular enzyme activity. *Pedobiologia*, **54**: 71-78.
- Geisseler D y Scow KM. (2014). Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, **75**: 54-63.
- Giacometti C et al. (2013). Chemical and microbiological soil quality indicators and their potential to differentiate fertilization regimes in temperate agroecosystems. *Applied Soil Ecology*, **64**: 32-48.
- Giller KE, Witter E y Mcgrath SP. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology & Biochemistry*, **30**: 1389-1414.
- Girvan MS et al. (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 1800-1809.
- Gondim-Porto C. (26-9-2012). *Análisis microbiológico de un suelo agrícola mediterráneo tras la aplicación de lodos de depuradora urbana*. Tesis Doctoral. Dept. Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- Gondim-Porto C y Navarro-García F (2010). *Sanidad ambiental de suelos agrícolas mediterráneos tratados con lodos de depuradora urbana: un estudio a corto plazo*. en Asociación Española de Evaluación del Impacto Ambiental MMA (Eds) *Evaluación de Impacto Ambiental: cooperación, desarrollo y sostenibilidad*. Pp 26-32 Madrid, España.
- González-Ubierna S et al. (2012). Soil organic matter evolution after the application of high doses of organic amendments in a Mediterranean calcareous soil. *Journal of Soils and Sediments*, 1-12.
- Griffiths BS, Ritz K, Ebbelwhite N y Dobson G. (1998). Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology & Biochemistry*, **31**: 145-153.
- Griffiths BS y Philippot L. (2013). Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews*, **37**: 112-129.
- Grinhut T, Hadar Y y Chen Y. (2007). Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. *Fungal Biology Reviews*, **21**: 179-189.
- Guggenberger G (2005). *Humification and Mineralization in Soils* en Varma A y Buscot F (Eds) *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Pp 85-106. Springer Berlin Heidelberg.
- Gupta RK y Abrol IP (1990). *Salt-Affected Soils: Their Reclamation and Management for Crop Production* en Lal R y Stewart BA (Eds) *Advances in Soil Science*. Pp 223-288. Springer New York.

- Hamady M et al. (2008). Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods*, **5**: 235-237.
- Hamer U y Marschner B. (2005). Priming effects in soils after combined and repeated substrate additions. *Geoderma*, **128**: 38-51.
- Han G et al. (2007). Biotic and abiotic factors controlling the spatial and temporal variation of soil respiration in an agricultural ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**: 418-425.
- Han I et al. (2011). Bacterial community analysis of swine manure treated with autothermal thermophilic aerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **89**: 835-842.
- Handley KM et al. (2014). The complete genome sequence for putative H<sub>2</sub>- and S-oxidizer *Candidatus Sulfuricurvum* sp., assembled de novo from an aquifer-derived metagenome. *Environmental Microbiology*, **16**: 3443-3462.
- Hao Q, Cheng B y Jiang C. (2013). Long-term tillage effects on soil organic carbon and dissolved organic carbon in a purple paddy soil of Southwest China. *Acta Ecologica Sinica*, **33**: 260-265.
- Hao XL, Jiang R y Chen T. (2011). Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics*, **27**: 611-618.
- Hargreaves JC, Adl MS y Warman PR. (2008). A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **123**: 1-14.
- Hayes MHB y Clapp CE. (2001). Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Science*, **166**.
- Haynes R, Murtaza G y Naidu R (2009). *Inorganic and Organic Constituents and Contaminants of Biosolids: Implications for Land Application*.
- He ZL, Van Nostrand JD, Deng Y y Zhou JZ. (2011). Development and applications of functional gene microarrays in the analysis of the functional diversity, composition, and structure of microbial communities. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, **5**: 1-20.
- He Z et al. (2012). The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide. *The ISME journal*, **6**: 259-272.
- Hemmat A, Aghilinategh N, Rezainejad Y y Sadeghi M. (2010). Long-term impacts of municipal solid waste compost, sewage sludge and farmyard manure application on organic carbon, bulk density and consistency limits of a calcareous soil in central Iran. *Soil & Tillage Research*, **108**: 43-50.
- Herlemann DPR et al. (2013). Metagenomic *de novo* assembly of an aquatic representative of the verrucomicrobial class *Spartobacteria*. *mBio*, **4**.
- Hiraishi A y Ueda Y. (1994). Rhodoplanes Gen-Nov, A New Genus of Phototrophic Bacteria Including Rhodopseudomonas-Rosea As Rhodoplanes-Roseus Comb-Nov and Rhodoplanes-Elegans Sp-Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**: 665-673.
- Hong PY et al. (2013). Monitoring the perturbation of soil and groundwater microbial communities due to pig production activities. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**: 2620-2629.

Horwath W (2015). Chapter 12 - Carbon Cycling: The Dynamics and Formation of Organic Matter en Paul EA (Eds) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. Pp 339-382. Academic Press, Boston.

Hueso S, García C y Hernández T. (2012). Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **50**: 167-173.

Huse SM et al. (2014). VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures. *BMC Bioinformatics*, **15**.

IDAE (Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía). (2007). Biomasa: Digestores anaerobios.

Idowu OJ et al. (2008). Farmer-oriented assessment of soil quality using field, laboratory, and VNIR spectroscopy methods. *Plant and Soil*, **307**: 243-253.

Insam H. (1997). Substrate utilization tests in microbial ecology - A preface to the special issue of the Journal of Microbiological Methods. *Journal of Microbiological Methods*, **30**: 1-2.

Insam H y Domsch KH. (1988). Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microbial Ecology*, **15**: 177-188.

Insam H y Haselwandter K. (1989). Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia*, **79**: 174-178.

Iovieno P et al. (2009). Effect of organic and mineral fertilizers on soil respiration and enzyme activities of two Mediterranean horticultural soils. *Biology and Fertility of Soils*, **45**: 555-561.

IUSS Working Group WRB (2007). *World reference base for soil resources 2006. A framework for international classification, correlation and communication*. FAO (Ed.) Rome, Italy.

Iwagami SG, Yang KQ y Davies J. (2000). Characterization of the protocatechuic acid catabolic gene cluster from *Streptomyces* sp strain 2065. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 1499-1508.

Iwai CB, Oo AN y Topark-ngarm B. (2012). Soil property and microbial activity in natural salt affected soils in an alternating wet-dry tropical climate. *Geoderma*, **189-190**: 144-152.

Jangid K et al. (2008). Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**: 2843-2853.

Janssen PH. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 1719-1728.

Jenkins C, Kedar V y Fuerst J. (2002). Gene discovery within the *Planctomycete* division of the domain bacteria using sequence tags from genomic DNA libraries. *Genome Biology*, **3**: 1-11.

Jenkinson DS y Oades JM. (1979). Method for Measuring Adenosine-Triphosphate in Soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **11**: 193-199.

Jenkinson DS y Powlson DS. (1976). Effects of Biocidal Treatments on Metabolism in Soil .5. Method for Measuring Soil Biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, **8**: 209-213.

- Jha P et al. (2012). Soil and residue carbon mineralization as affected by soil aggregate size. *Soil & Tillage Research*, **121**: 57-62.
- Jiménez P et al. (2007). Effect of differently post-treated dewatered sewage sludge on  $\beta$ -glucosidase activity, microbial biomass carbon, basal respiration and carbohydrates contents of soils from limestone quarries. *Biology and Fertility of Soils*, **44**: 393-398.
- Johansen A et al. (2013). Effects of digestate from anaerobically digested cattle slurry and plant materials on soil microbial community and emission of CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O. *Applied Soil Ecology*, **63**: 36-44.
- Jones DL. (1998). Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant and Soil*, **205**: 25-44.
- Jones RT et al. (2009). A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME Journal*, **3**: 442-453.
- Jorge-Mardomingo I. (2014). *Evolución de los componentes de carbono, nitrógeno y propiedades edáficas de un suelo agrícola mediterráneo tras la aplicación de altas dosis de Residuos Orgánicos Biodegradables*. Tesis Doctoral. Dept. Edafología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- Jorge-Mardomingo I et al. (2013). Seasonal changes in microbial activity in a semiarid soil after application of a high dose of different organic amendments. *Geoderma*, **206**: 40-48.
- Joux F, Bertrand JC, De Wit R, Grossi V, Intertaglia L, Lebaron P, Michotey V, Normand P, Peyret P, Raimbault P, Tamburini C y Urios L (2015). *Methods for Studying Microorganisms in the Environment* en Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P y Sime-Ngando T+ (Eds) *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Pp 757-829. Springer Netherlands.
- Kallistova A et al. (2014). Microbial composition of the activated sludge of Moscow wastewater treatment plants. *Microbiology*, **83**: 699-708.
- Kandeler E (2015). *Chapter 7 - Physiological and Biochemical Methods for Studying Soil Biota and Their Functions* en Paul EA (Eds) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. Pp 187-222. Academic Press, Boston.
- Kaschuk G, Alberton O y Hungria M. (2010). Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. *Soil Biology & Biochemistry*, **42**: 1-13.
- Katterer T, Borjesson G y Kirchmann H. (2014). Changes in organic carbon in topsoil and subsoil and microbial community composition caused by repeated additions of organic amendments and N fertilisation in a long-term field experiment in Sweden. *Agriculture Ecosystems & Environment*, **189**: 110-118.
- Kayikcioglu HH. (2013). Effects of composts from agroindustrial wastes on microbial activity of a typic xerofluent soil under Mediterranean conditions, SE Turkey. *Geomicrobiology Journal*, **30**: 228-236.
- Kennedy AC y Smith KL. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, **170**: 75-86.
- Kennedy AC y Stubbs TL. (2006). Soil microbial communities as indicators of soil health. *Annals of Arid Zone*, **45**: 287-286.

Kertesz MA y Frossard E (2015). Chapter 16 - Biological Cycling of Inorganic Nutrients and Metals in Soils and Their Role in Soil Biogeochemistry en Paul EA (Eds) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. Pp 471-503. Academic Press, Boston.

Killham K. (1985). A physiological determination of the impact of environmental stress on the activity of microbial biomass. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, **38**: 283-294.

Killham K y Prosser JI (2015). Chapter 3 - The Bacteria and Archaea en Paul EA (Eds) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. Pp 41-76. Academic Press, Boston.

Kimura M, Jia ZJ, Nakayama N y Asakawa S. (2008). Ecology of viruses in soils: Past, present and future perspectives. *Soil Science & Plant Nutrition*, **54**: 1-32.

Kirk JL et al. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, **58**: 169-188.

Kirkby CA et al. (2014). Nutrient availability limits carbon sequestration in arable soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **68**: 402-409.

Köberl M, Müller H, Ramadan EM y Berg G. (2011). Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. *PLoS ONE*, **6**.

Kodama Y y Watanabe K. (2004). *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 2297-2300.

Kramer C y Gleixner G. (2008). Soil organic matter in soil depth profiles: Distinct carbon preferences of microbial groups during carbon transformation. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**: 425-433.

Kuzyakov Y, Friedel JK y Stahr K. (2000). Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology & Biochemistry*, **32**: 1485-1498.

Kuzyakov Y y Bol R. (2006). Sources and mechanisms of priming effect induced in two grassland soils amended with slurry and sugar. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**: 747-758.

Lagomarsino A, Grego S y Kandeler E. (2012). Soil organic carbon distribution drives microbial activity and functional diversity in particle and aggregate-size fractions. *Pedobiologia*, **55**: 101-110.

Lal R. (2004b). Agricultural activities and the global carbon cycle. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **70**: 103-116.

Lal R. (2011). Sequestering carbon in soils of agro-ecosystems. *Food Policy*, **36**: S33-S39.

Lal R. (2004a). Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*, **304**: 1623-1627.

Lal R. (2007). Carbon management in agricultural soils. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, **12**: 303-322.

Lal R. (2006). Enhancing crop yields in the developing countries through restoration of the soil organic carbon pool in agricultural lands. *Land Degradation & Development*, **17**: 197-209.

- Lal R. (2008). Soils and sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **28**: 57-64.
- Lalor BM, Cookson WR y Murphy DV. (2007). Comparison of two methods that assess soil community level physiological profiles in a forest ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**: 454-462.
- Lambais MR y do Carmo JB. (2008). Impacts of biosolids amendments on the microbiota of tropical soils. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, **32**: 1129-1138.
- Lange M et al. (2015). Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nature Communications*, **6**.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R y Fierer N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 5111-5120.
- Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA y Fierer N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**: 2407-2415.
- Lavelle P y Spain AV (2003). *Soil ecology*. Kluwer Academic Publishers, New York.
- Lerch T, Coucheney E y Herrmann A. (2013). Sensitivity of soil microbial catabolic profiles to a gradient of carbon inputs: Does the soil organic matter Matter? *Soil Biology & Biochemistry*, **57**: 911-915.
- Li F et al. (2013). Changes in soil microbial biomass and functional diversity with a nitrogen gradient in soil columns. *Applied Soil Ecology*, **64**: 1-6.
- Li J et al. (2008). Effects of long-term combined application of organic and mineral fertilizers on microbial biomass, soil enzyme activities and soil fertility. *Agricultural Sciences in China*, **7**: 336-343.
- Li XR et al. (2014). Analysis of microbial diversity by pyrosequencing the small-subunit ribosomal RNA without PCR amplification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**: 3777-3789.
- Lin Q y Brookes PC. (1999). Comparison of substrate induced respiration, selective inhibition and biovolume measurements of microbial biomass and its community structure in unamended, ryegrass-amended, fumigated and pesticide-treated soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **31**: 1999-2014.
- Ling LL et al. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, **517**: 455-459.
- Lücker S et al. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**: 13479-13484.
- Lugato E et al. (2010). Distribution of organic and humic carbon in wet-sieved aggregates of different soils under long-term fertilization experiment. *Geoderma*, **157**: 80-85.
- Luo Y y Zhou X (2006). *Soil respiration and the environment*. Elsevier Academic Press, USA.
- Mader P et al. (2002). Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*, **296**: 1694-1697.

- Maier RM, Pepper IL y Gerba CP (2009). *Environmental microbiology*. Academic Press, Elsevier.
- Majumder B, Ruehlmann J y Kuzyakov Y. (2010). Effects of aggregation processes on distribution of aggregate size fractions and organic C content of a long-term fertilized soil. *European Journal of Soil Biology*, **46**: 365-370.
- Mantovi P, Baldoni G y Toderi G. (2005). Reuse of liquid, dewatered, and composted sewage sludge on agricultural land: effects of long-term application on soil and crop. *Water Research*, **39**: 289-296.
- Manzoni S et al. (2014). A theoretical analysis of microbial eco-physiological and diffusion limitations to carbon cycling in drying soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **73**: 69-83.
- Manzoni S, Schimel JP y Porporato A. (2011). Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis. *Ecology*, **93**: 930-938.
- Marschner P, Kandeler E y Marschner B. (2003). Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, **35**: 453-461.
- Martínez-Blanco J et al. (2013). Compost benefits for agriculture evaluated by life cycle assessment. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **33**: 721-732.
- Martínez-García M et al. (2012). Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: an unexpected contribution of *Verrucomicrobia*. *PLoS ONE*, **7**: e35314.
- Marwati U, Funasaka K, Toyota K y Katayama A. (2003). Functional characterization of soil microbial communities based on the utilization pattern of aromatic compounds. *Soil Science and Plant Nutrition*, **49**: 143-147.
- Matches JR, Liston J y Curran D. (1974). *Clostridium perfringens* in the environment. *Applied Microbiology*, **28**: 655-660.
- Mattana S et al. (2014). Sewage sludge processing determines its impact on soil microbial community structure and function. *Applied Soil Ecology*, **75**: 150-161.
- McGill BJ, Enquist BJ, Weiher E y Westoby M. (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**: 178-185.
- Melero S, Porrás JCR, Herencia JF y Madejon E. (2006). Chemical and biochemical properties in a silty loam soil under conventional and organic management. *Soil & Tillage Research*, **90**: 162-170.
- Mijangos I, Pérez R, Albizu I y Garbisu C. (2006). Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**: 100-106.
- Miura Y, Watanabe Y y Okabe S. (2007). Significance of *Chloroflexi* in performance of submerged membrane bioreactors (MBR) treating municipal wastewater. *Environmental Science & Technology*, **41**: 7787-7794.
- Montemurro F, Convertini G y Ferri D. (2004). Mill wastewater and olive pomace compost as amendments for rye-grass. *Agronomie*, **24**: 481-486.
- Montemurro F, Maiorana M, Convertini G y Ferri D. (2007). Alternative sugar beet production using shallow tillage and municipal solid waste fertiliser. *Agronomy for Sustainable Development*, **27**: 129-137.

Morris SJ y Blackwood CB (2015). *Chapter 10 - The Ecology of the Soil Biota and their Function* en Paul EA (Eds) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. Pp 273-309. Academic Press, Boston.

Moscatelli MC et al. (2005). Soil microbial indices as bioindicators of environmental changes in a poplar plantation. *Ecological Indicators*, **5**: 171-179.

Murphy D.V, Stockdale E.A, Brookes P.C y Goulding K.W.T (2007). *Impact of microorganisms on chemical transformation in soil* en Abbott L.K. y Murphy D.V (Eds) *Soil biological fertility – A key to sustainable land use in agriculture*. Pp -. Springer.

Myrold DD, Zeglin LH y Jansson JK. (2014). The Potential of Metagenomic Approaches for Understanding Soil Microbial Processes. *Soil Science Society of America Journal*, **78**: 3-10.

Nadal, Ignacio. (2010). *Evolución de los perfiles metabólicos de las poblaciones microbianas en un suelo mediterráneo tras la aplicación de lodos de depuradora*. Diploma de estudios avanzados Dept. Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Naether A et al. (2012). Environmental factors affect acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 7398-7406.

Nakatani AS et al. (2011). Changes in the genetic structure of bacteria and microbial activity in an agricultural soil amended with tannery sludge. *Soil Biology & Biochemistry*, **43**: 106-114.

Nannipieri P et al. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, **54**: 655-670.

Nannipieri P, Kandeler E y Ruggiero P (2002). *Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil* en Burns RG y Dick RP (Eds) *Enzymes in the environment*. Pp -. CRC Press, New York.

Navarro-García F, Casermeiro MÁ y Schimel JP. (2012). When structure means conservation: Effect of aggregate structure in controlling microbial responses to rewetting events. *Soil Biology & Biochemistry*, **44**: 1-8.

Ndegwa PM y Thompson SA. (2001). Integrating composting and vermicomposting in the treatment and bioconversion of biosolids. *Bioresource Technology*, **76**: 107-112.

Nemergut DR et al. (2008). The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: implications for carbon and nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, **10**: 3093-3105.

Nemergut DR et al. (2010). Plot-scale manipulations of organic matter inputs to soils correlate with shifts in microbial community composition in a lowland tropical rain forest. *Soil Biology & Biochemistry*, **42**: 2153-2160.

Newton RJ et al. (2015). Sewage reflects the microbiomes of human populations. *mBio*, **6**: e02574.

Nicolás C et al. (2014). Soil aggregation in a semiarid soil amended with composted and non-composted sewage sludge-A field experiment. *Geoderma*, **219**: 24-31.

Niederberger TD et al. (2015). Microbial community composition of transiently wetted Antarctic Dry Valley soils. *Frontiers in Microbiology*, **6**.

- Nielsen S et al. (2014). Comparative analysis of the microbial communities in agricultural soil amended with enhanced biochars or traditional fertilisers. *Agriculture Ecosystems & Environment*, **191**: 73-82.
- Nielsen U, Ayres E, Wall D y Bardgett R. (2011). Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity-function relationships. *European Journal of Soil Science*, **62**: 105-116.
- Niepceron M et al. (2013). *Gammaproteobacteria* as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils. *Environmental Pollution*, **180**: 199-205.
- Normand P, Duran R, Le Roux X, Morris C y Poggiale JC (2015). *Biodiversity and Microbial Ecosystems Functioning* en Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P y Sime-Ngando T (Eds) *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Pp 261-291. Springer Netherlands.
- Nwachuku N y Gerba CP. (2004). Emerging waterborne pathogens: can we kill them all? *Current Opinion in Biotechnology*, **15**: 175-180.
- Ojeda G, Alcañiz JM y Ortiz O. (2003). Runoff and losses by erosion in soils amended with sewage sludge. *Land Degradation & Development*, **14**: 563-573.
- Ojeda G, Tarrasón D, Ortiz O y Alcañiz JM. (2006). Nitrogen losses in runoff waters from a loamy soil treated with sewage sludge. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **117**: 49-56.
- Okamura K, Kanbe T y Hiraishi A. (2009). *Rhodoplanes serenus* sp nov., a purple non-sulfur bacterium isolated from pond water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**: 531-535.
- Oren A y Steinberger Y. (2008). Coping with artifacts induced by CaCO<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O equilibria in substrate utilization profiling of calcareous soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**: 2569-2577.
- Orwin KH, Wardle DA y Greenfield LG. (2006). Ecological consequences of carbon substrate identity and diversity in a laboratory study. *Ecology*, **87**: 580-593.
- Ouattara AS et al. (2003). *Bosea minatitlanensis* sp nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 1247-1251.
- Paetz A y Wilke B-M (2005). *Soil sampling and storage* en Margesin R y Schinner F (Eds) *Manual for soil analysis: monitoring and assessing soil bioremediation*. Pp 1-45. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Pailler A et al. (2014). Forest soil microbial functional patterns and response to a drought and warming event: Key role of climate-plant-soil interactions at a regional scale. *Soil Biology & Biochemistry*, **70**: 1-4.
- Pankhurst CE, Yu S, Hawke BG y Harch BD. (2001). Capacity of fatty acid profiles and substrate utilization patterns to describe differences in soil microbial communities associated with increased salinity or alkalinity at three locations in South Australia. *Biology and Fertility of Soils*, **33**: 204-217.
- Park SJ et al. (2014). Characterization of the fecal microbiome in different swine groups by high-throughput sequencing. *Anaerobe*, **28**: 157-162.

- Partanen P et al. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology*, **10**.
- Pascual I et al. (2007). Effect of water deficit on microbial characteristics in soil amended with sewage sludge or inorganic fertilizer under laboratory conditions. *Bioresource Technology*, **98**: 29-37.
- Pascual JA, García C, Hernández T y Ayuso M. (1997). Changes in the microbial activity of an arid soil amended with urban organic wastes. *Biology and Fertility of Soils*, **24**: 429-434.
- Pascual JA, Hernández T, García C y Ayuso M. (1998). Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: Laboratory experiment. *Bioresource Technology*, **64**: 131-138.
- Paul EA (2015). *Chapter 1 - Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry: An Exciting Present and Great Future Built on Basic Knowledge and Unifying Concepts* en Paul EA (Eds) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. Pp 1-14. Academic Press, Boston.
- Pavan SA, Bettiol W y Cerri CC. (2005). Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. *Applied Soil Ecology*, **30**: 65-77.
- Pedra F, Polo A, Ribeiro A y Domingues H. (2007). Effects of municipal solid waste compost and sewage sludge on mineralization of soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**: 1375-1382.
- Pepper IL y Gerba CP (2005). *Environmental microbiology: a laboratory manual*. Elsevier Academic Press, London, UK.
- Pérez-Piqueres A, Edel-Hermann V, Alabouvette C y Steinberg C. (2006). Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**: 460-470.
- Petersen SO et al. (2003). Recycling of sewage sludge and household compost to arable land: fate and effects of organic contaminants, and impact on soil fertility. *Soil & Tillage Research*, **72**: 139-152.
- Pezzolla D et al. (2013). Short-term variations in labile organic C and microbial biomass activity and structure after organic amendment of arable soils. *Soil Science*, **178**: 474-485.
- Philippot L et al. (2010). The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nature Reviews Microbiology*, **8**: 523-529.
- Philippot L et al. (2009). Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environmental Microbiology*, **11**: 3096-3104.
- Pimentel D et al. (1997). Economic and Environmental Benefits of Biodiversity. *Bioscience*, **47**: 747-757.
- Poggio L et al. (2008). Introducing a method of human health risk evaluation for planning and soil quality management of heavy metal-polluted soils—An example from Grugliasco (Italy). *Landscape and Urban Planning*, **88**: 64-72.
- Porta J, Lopez-Acevedo M y Roquero C (2003). *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Ediciones Mundi-prensa (Ed.) Madrid.
- Poulsen PHB et al. (2012). Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial - Prokaryotic diversity investigated by pyrosequencing. *Soil Biology & Biochemistry*.

- Poulsen PHB, Magid J, Luxhøi J y de Neergaard A. (2013). Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial – Waste imprint on soil microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry*, **57**: 794-802.
- Powell JR, Welsh A y Hallin S. (2015). Microbial functional diversity enhances predictive models linking environmental parameters to ecosystem properties. *Ecology*.
- Preston S et al. (2001). The role played by microorganisms in the biogenesis of soil cracks: importance of substrate quantity and quality. *Soil Biology & Biochemistry*, **33**: 1851-1858.
- Qiao JT et al. (2013). Molecular characterization of bacterial and archaeal communities in a full-scale anaerobic reactor treating corn straw. *Bioresource Technology*, **143**: 512-518.
- Qin S et al. (2010). Soil organic carbon, nutrients and relevant enzyme activities in particle-size fractions under conservational versus traditional agricultural management. *Applied Soil Ecology*, **45**: 152-159.
- Qiu S, McComb A, Bell R y Davis J. (2005). Response of soil microbial activity to temperature, moisture, and litter leaching on a wetland transect during seasonal refilling. *Wetlands Ecology and Management*, **13**: 43-54.
- Rachid CT et al. (2013). Effect of Sugarcane Burning or Green Harvest Methods on the Brazilian Cerrado Soil Bacterial Community Structure. *PLoS ONE*, **8**.
- Ramdani N, Hamou A, Lousdad A y Al-Douri Y. (2015). Physicochemical characterization of sewage sludge and green waste for agricultural utilization. *Environmental Technology*, **36**.
- Ramirez KS, Craine JM y Fierer N. (2012). Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change Biology*, **18**: 1918-1927.
- Rauch W y Becker W. (2000). Waste sludge disposal in extreme alpine environments. *Waste Management and Research*, **18**: 33-40.
- Rey A y Jarvis P. (2006). Modelling the effect of temperature on carbon mineralization rates across a network of European forest sites (FORCAST). *Global Change Biology*, **12**: 1894-1908.
- Rhind SM et al. (2013). Short- and long-term temporal changes in soil concentrations of selected endocrine disrupting compounds (EDCs) following single or multiple applications of sewage sludge to pastures. *Environmental Pollution*, **181**: 262-270.
- Riber L et al. (2014). Exploring the immediate and long-term impact on bacterial communities in soil amended with animal and urban organic waste fertilizers using pyrosequencing and screening for horizontal transfer of antibiotic resistance. *Fems Microbiology Ecology*, **90**: 206-224.
- Rietz DN y Haynes RJ. (2003). Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry*, **35**: 845-854.
- Rillig MC y Mummey DL. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, **171**: 41-53.
- Ritz K y Young IM. (2004). Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist*, **18**: 52-59.
- Rivière D et al. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME Journal*, **3**: 700-714.

- Roesch LFW et al. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME Journal*, **1**: 283-290.
- Roig N et al. (2012). Long-term amendment of Spanish soils with sewage sludge: effects on soil functioning. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **158**: 41-48.
- Ros M, Hernández MT y García C. (2003a). Bioremediation of soil degraded by sewage sludge: Effects on soil properties and erosion losses. *Environmental Management*, **31**: 741-747.
- Ros M et al. (2006a). Long-term effects of compost amendment of soil on functional and structural diversity and microbial activity. *Soil Use and Management*, **22**: 209-218.
- Ros M, Knapp BA, Peintner U y Insam H. (2011). Short communication. Response of bacterial community composition to long-term applications of different composts in agricultural soils. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **9**: 338-343.
- Ros M et al. (2006b). Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**: 3443-3452.
- Ros M, Hernández MT y García C. (2003b). Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biology & Biochemistry*, **35**: 463-469.
- Rousk J, Demoling LA y Baath E. (2009). Contrasting short-term antibiotic effects on respiration and bacterial growth compromises the validity of the selective respiratory inhibition technique to distinguish fungi and bacteria. *Microbial Ecology*, **58**: 75-85.
- Rousk J et al. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, **4**: 1340-1351.
- Said-Pullicino D, Gigliotti G y Vella AJ. (2004). Environmental fate of triasulfuron in soils amended with municipal waste compost. *Journal of Environmental Quality*, **33**: 1743-1751.
- Saison C et al. (2006). Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology*, **8**: 247-257.
- Sánchez O et al. (2011). Molecular characterization of activated sludge from a seawater-processing wastewater treatment plant. *Microbial Biotechnology*, **4**: 628-642.
- Santibáñez C, Ginocchio R y Teresa Varnero M. (2007). Evaluation of nitrate leaching from mine tailings amended with biosolids under Mediterranean type climate conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**: 1333-1340.
- Sardinha M, Müller T, Schmeisky H y Joergensen RG. (2003). Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. *Applied Soil Ecology*, **23**: 237-244.
- Saul-Tcherkas V y Steinberger Y. (2009). Substrate utilization patterns of desert soil microbial communities in response to xeric and mesic conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, **41**: 1882-1893.
- Saviozzi A, Vanni G y Cardelli R. (2014). Carbon mineralization kinetics in soils under urban environment. *Applied Soil Ecology*, **73**: 64-69.
- Schimel J, Balsler TC y Wallenstein M. (2007a). Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, **88**: 1386-1394.

- Schimel JP y Bennett J. (2004). Nitrogen mineralization: Challenges of a changing paradigm. *Ecology*, **85**: 591-602.
- Schimel JP et al. (1999). Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga. *Soil Biology & Biochemistry*, **31**: 831-838.
- Schimel JP y Weintraub MN. (2003). The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology & Biochemistry*, **35**: 549-563.
- Schimel J, Balsler TC y Wallenstein M. (2007b). Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, **88**: 1386-1394.
- Schjøning P et al. (2011). Relating soil microbial activity to water content and tillage-induced differences in soil structure. *Geoderma*, **163**: 256-264.
- Schloss PD et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 7537-7541.
- Schmidt MA et al. (2013). Soil microbial communities respond differently to three chemically defined polyphenols. *Plant Physiology and Biochemistry*, **72**: 190-197.
- Schoenholtz SH, Miegroet HV y Burger JA. (2000). A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. *Forest Ecology and Management*, **138**: 335-356.
- Schwartz E et al. (2014). Characterization of growing bacterial populations in McMurdo Dry Valley soils through stable isotope probing with <sup>18</sup>O-water. *Fems Microbiology Ecology*, **89**: 415-425.
- Sciubba L, Cavani L, Marzadori C y Ciavatta C. (2013). Effect of biosolids from municipal sewage sludge composted with rice husk on soil functionality. *Biology and Fertility of Soils*, **49**: 597-608.
- Sciubba L et al. (2014). Changes in the functional properties of a sandy loam soil amended with biosolids at different application rates. *Geoderma*, **221**: 40-49.
- SEC2010. (2010). Commission staff working document: Accompanying the Communication from the Commission On future steps in biowaste management in the European Union.
- Secretaría de Estado de Cambio Climático y Gobierno de España. (2009). Plan Nacional Integrado de Residuos (PNIR) 2007-2015. *BOE*, **49**: 19893-20016.
- Senechkin I et al. (2010). Isolation and partial characterization of bacterial strains on low organic carbon medium from soils fertilized with different organic amendments. *Microbial Ecology*, **60**: 829-839.
- Shade A et al. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology*, **3**.
- Sharma NK y Philip L. (2015). Treatment of phenolics, aromatic hydrocarbons, and cyanide-bearing wastewater in individual and combined anaerobic, aerobic, and anoxic bioreactors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **175**: 300-322.

Sharma SK et al. (2010). Microbial community structure and diversity as indicators for evaluating soil quality. *Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture*, **5**: 317-358.

Sheik CS et al. (2011). Effect of warming and drought on grassland microbial communities. *ISME Journal*, **5**: 1692-1700.

Shokralla SHAD, Spall JL, Gibson JF y Hajibabaei MEHR. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, **21**: 1794-1805.

Siles JA et al. (2014). Microbial diversity of a mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment. *PLoS ONE*, **9**.

Singh B y Singh K. (2014). Microbial degradation of herbicides. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-17.

Singh BK, Bardgett RD, Smith P y Reay DS. (2010). Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nature Reviews Microbiology*, **8**: 779-790.

Singh BK et al. (2014). Loss of microbial diversity in soils is coincident with reductions in some specialized functions. *Environmental Microbiology*, **16**: 2408-2420.

Singh BK, Walker A, Morgan JA y Wright DJ. (2004). Biodegradation of Chlorpyrifos by Enterobacter Strain B-14 and Its Use in Bioremediation of Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 4855-4863.

Singh RP y Agrawal M. (2008). Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, **28**: 347-358.

Six J, Bossuyt H, Degryze S y Deneff K. (2004). A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil & Tillage Research*, **79**: 7-31.

Six J, Frey SD, Thiet RK y Batten KM. (2006). Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, **70**: 555-569.

Six J, Paustian K, Elliott ET y Combrink C. (2000). Soil structure and organic matter: I. Distribution of aggregate-size classes and aggregate-associated carbon. *Soil Science Society of America Journal*, **64**: 681-689.

Smit E et al. (2001). Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2284-2291.

Smith MTE y Tibbett M. (2004). Nitrogen dynamics under *Lolium perenne* after a single application of three different sewage sludge types from the same treatment stream. *Bioresource Technology*, **91**: 233-241.

Smith SR. (2009). A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environment International*, **35**: 142-156.

Snaird J et al. (1997). Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 2884-2896.

Sneath PHA y Sokal RR (1973). *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W H Freeman Limited, San Francisco, USA.

Sofo A et al. (2014). Soil microbial diversity and activity in a Mediterranean olive orchard using sustainable agricultural practices. *Soil Use and Management*, **30**: 160-167.

Spain AM, Krumholz LR y Elshahed MS. (2009). Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. *ISME Journal*, **3**: 992-1000.

Sradnick A et al. (2013). Changes in functional diversity of the soil microbial community in a heterogeneous sandy soil after long-term fertilization with cattle manure and mineral fertilizer. *Applied Soil Ecology*, **63**: 23-28.

Sradnick A, Oltmanns M, Raupp J y Joergensen RG. (2014). Microbial residue indices down the soil profile after long-term addition of farmyard manure and mineral fertilizer to a sandy soil. *Geoderma*, **226-227**: 79-84.

Srivastava V, Ismail S, Singh P y Singh R. (2015). Urban solid waste management in the developing world with emphasis on India: challenges and opportunities. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, **14**: 317-337.

Stackelberg PE et al. (2004). Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of The Total Environment*, **329**: 99-113.

Stampi S, De Luca G, Varoli O y Zanetti F. (1999). Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic campylobacters and Arcobacter in sewage sludge. *Zentralblatt fur Hygiene und Umweltmedizin*, **202**: 19-27.

Suseela V, Conant RT, Wallenstein MD y Dukes JS. (2012). Effects of soil moisture on the temperature sensitivity of heterotrophic respiration vary seasonally in an old-field climate change experiment. *Global Change Biology*, **18**: 336-348.

Susilo FX, Neutel AM, Noordwijk Mv, Hairiah K, Brown G y Swift MJ (2004). *Soil biodiversity and food webs en Below-ground interactions in tropical agroecosystems: concepts and models with multiple plant components*. Pp 285-307. CABI Publishing, Wallingford.

Swallow MJB y Quideau SA. (2015). A Method for Determining Community Level Physiological Profiles of Organic Soil Horizons. *Soil Science Society of America Journal*, **79**: 536-542.

Swanson MM et al. (2009). Viruses in soils: morphological diversity and abundance in the rhizosphere. *Annals of Applied Biology*, **155**: 51-60.

Tamanini CR, Vargas Motta AC, Andreoli CV y Doetzer BH. (2008). Land reclamation recovery with the sewage sludge use. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **51**: 843-855.

Tarrasón D, Ojeda G, Ortiz O y Alcañiz JM. (2014). Can organic amendments be useful in transforming a Mediterranean shrubland into a dehesa? *Restoration Ecology*, **22**: 486-494.

Tarrasón D, Ortiz O y Alcañiz JM. (2007). A multi-criteria evaluation of organic amendments used to transform an unproductive shrubland into a Mediterranean dehesa. *Journal of Environmental Management*, **82**: 446-456.

- Tarrasón D, Ojeda G, Ortiz O y Alcañiz JM. (2010). Effects of different types of sludge on soil microbial properties: a field experiment on degraded Mediterranean soils. *Pedosphere*, **20**: 681-691.
- Taylor JP, Wilson B, Mills MS y Burns RG. (2002). Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology & Biochemistry*, **34**: 387-401.
- Tejada M, García C, González JL y Hernández MT. (2006). Organic amendment based on fresh and composted beet vinasse: Influence on soil properties and wheat yield. *Soil Science Society of America Journal*, **70**: 900-908.
- Tejada M y González JL. (2007). Influence of organic amendments on soil structure and soil loss under simulated rain. *Soil & Tillage Research*, **93**: 197-205.
- Tejada M, Hernández MT y García C. (2009). Soil restoration using composted plant residues: effects on soil properties. *Soil & Tillage Research*, **102**: 109-117.
- Tejada M. (2009). Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere*, **76**: 365-373.
- Tempest DW y Neijssel OM. (1992). Physiological and energetic aspects of bacterial metabolite overproduction. *FEMS Microbiology Letters*, **100**: 169-176.
- Theodorakopoulos N et al. (2013). Exploration of *Deinococcus-Thermus* molecular diversity by novel group-specific PCR primers. *Microbiologyopen*, **2**: 862-872.
- Thirukkumaran CM y Parkinson D. (2000). Microbial respiration, biomass, metabolic quotient and litter decomposition in a lodgepole pine forest floor amended with nitrogen and phosphorous fertilizers. *Soil Biology & Biochemistry*, **32**: 59-66.
- Thorn RG y Lynch MD (2007). *Fungi and eukaryotic algae* en Paul EA (Eds) *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Pp 145-162. Elsevier, Oxford, UK.
- Thuy TD et al. (2014). Influence of buffalo manure, compost, vermicompost and biochar amendments on bacterial and viral communities in soil and adjacent aquatic systems. *Applied Soil Ecology*, **73**: 78-86.
- Tilman D et al. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, **418**: 671-677.
- Torres IF, Bastida F, Hernández T y García C. (2015). The effects of fresh and stabilized pruning wastes on the biomass, structure and activity of the soil microbial community in a semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, **89**: 1-9.
- Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA y Ovreas L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, **64**: 53-62.
- Torsvik V y Øvreås L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, **5**: 240-245.
- Treseder K et al. (2012). Integrating microbial ecology into ecosystem models: challenges and priorities. *Biogeochemistry*, **109**: 7-18.
- Tringe SG et al. (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, **308**: 554-557.

- Ushio M et al. (2014). High-throughput sequencing shows inconsistent results with a microscope-based analysis of the soil prokaryotic community. *Soil Biology & Biochemistry*, **76**: 53-56.
- Val-Moraes S, Marcondes J, Carareto Alves L y Lemos E. (2011). Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**: 1-7.
- van der Heijden MG, Bardgett RD y van Straalen NM. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol.Lett.*, **11**: 296-310.
- van Elsas JD et al. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**: 1159-1164.
- van Hees PAW et al. (2005). The carbon we do not see-the impact of low molecular weight compounds on carbon dynamics and respiration in forest soils: a review. *Soil Biology & Biochemistry*, **37**: 1-13.
- Vance ED, Brookes PC y Jenkinson DS. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology & Biochemistry*, **19**: 703-707.
- Vasileiadis S et al. (2013). Soil microbial diversity patterns of a lowland spring environment. *Fems Microbiology Ecology*, **86**: 172-184.
- Venkatesan AK y Halden RU. (2014). Wastewater Treatment Plants as Chemical Observatories to Forecast Ecological and Human Health Risks of Manmade Chemicals. *Scientific Reports*, **4**.
- Verchot LV, Dutaur L, Shepherd KD y Albrecht A. (2011). Organic matter stabilization in soil aggregates: Understanding the biogeochemical mechanisms that determine the fate of carbon inputs in soils. *Geoderma*, **161**: 182-193.
- Veum K et al. (2014). Biological indicators of soil quality and soil organic matter characteristics in an agricultural management continuum. *Biogeochemistry*, **117**: 81-99.
- Vierheilig J et al. (2012). High abundance of genetic Bacteroidetes markers for total fecal pollution in pristine alpine soils suggests lack in specificity for feces. *Journal of Microbiological Methods*, **88**: 433-435.
- Villar MC, Petrikova V, Díaz-Raviña M y Carballas T. (2004). Changes in soil microbial biomass and aggregate stability following burning and soil rehabilitation. *Geoderma*, **122**: 73-82.
- Voroney RP y Heck RJ (2015). *Chapter 2 - The Soil Habitat* en Paul EA (Eds) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. Pp 15-39. Academic Press, Boston.
- Wagner S, Cattle SR y Scholten T. (2007). Soil-aggregate formation as influenced by clay content and organic-matter amendment. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **170**: 173-180.
- Wakelin SA et al. (2008). Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**: 803-813.
- Wakelin S et al. (2013). Application of MicroResp™ for soil ecotoxicology. *Environmental Pollution*, **179**: 177-184.

- Wallenstein M, Allison S, Ernakovich J, Steinweg JM y Sinsabaugh R (2011). *Controls on the temperature sensitivity of soil enzymes: a key driver of in situ enzyme activity rates* en Shukla G y Varma A (Eds) *Soil Enzymology*. Pp 245-258. Springer Berlin Heidelberg.
- Wang B et al. (2012a). Microbial community changes along a land-use gradient of desert soil origin. *Pedosphere*, **22**: 593-603.
- Wang E, Cruse RM, Chen X y Daigh A. (2012b). Effects of moisture condition and freeze/thaw cycles on surface soil aggregate size distribution and stability. *Canadian Journal of Soil Science*, **92**: 529-536.
- Ward NL et al. (2009). Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 2046-2056.
- Wardle DA (1995). *Impacts of Disturbance on Detritus Food Webs in Agro-Ecosystems of Contrasting Tillage and Weed Management Practices* en and MB (Eds) *Advances in Ecological Research*. Pp 105-185. Academic Press.
- Watson CA et al. (2002). Managing soil fertility in organic farming systems. *Soil Use and Management*, **18**: 239-247.
- Webb CT et al. (2010). A structured and dynamic framework to advance traits-based theory and prediction in ecology. *Ecology Letters*, **13**: 267-283.
- West AW y Sparling GP. (1986). Modifications to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of differing water contents. *Journal of Microbiological Methods*, **5**: 177-189.
- White RE (2013). *Principles and practice of soil science: the soil as a natural resource*. John Wiley & Sons.
- Wieder WR, Bonan GB y Allison SD. (2013). Global soil carbon projections are improved by modelling microbial processes. *Nature Climate Change*, **3**: 909-912.
- Wong MH. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, **50**: 775-780.
- Wu X et al. (2014). Responses of soil microbial community to different concentration of fomesafen. *Journal of Hazardous Materials*, **273**: 155-164.
- Yang YH, Yao J, Hu S y Qi Y. (2000). Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: A study with RAPD marker. *Microbial Ecology*, **39**: 72-79.
- Yoon DN et al. (2010). Isolation, characterization, and abundance of filamentous members of *Caldilineae* in activated sludge. *Journal of Microbiology*, **48**: 275-283.
- Zak DR et al. (2003). Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? *Ecology*, **84**: 2042-2050.
- Zak JC, Willig MR, Moorhead DL y Wildman HG. (1994). Functional Diversity of Microbial Communities - A Quantitative Approach. *Soil Biology & Biochemistry*, **26**: 1101-1108.
- Zerzghi H, Gerba CP, Brooks JP y Pepper IL. (2010). Long-Term Effects of Land Application of Class B Biosolids on the Soil Microbial Populations, Pathogens, and Activity. *Journal of Environmental Quality*, **39**: 402-408.

Zhang C et al. (2006). Structure and function of microbial communities during the early stages of revegetation of barren soils in the vicinity of a Pb/Zn Smelter. *Geoderma*, **136**: 555-565.

Zhang H et al. (2003). *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 1155-1163.

Zhang Q y Zak JC. (1998). Effects of water and nitrogen amendment on soil microbial biomass and fine root production in a semi-arid environment in West Texas. *Soil Biology & Biochemistry*, **30**: 39-45.

Zhang X et al. (2009). Identification of soil heavy metal sources from anthropogenic activities and pollution assessment of Fuyang County, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, **154**: 439-449.

Zhao J et al. (2014). Responses of Bacterial Communities in Arable Soils in a Rice-Wheat Cropping System to Different Fertilizer Regimes and Sampling Times. *PLoS ONE*, **9**.

Zhao M, Zhou J y Kalbitz K. (2008). Carbon mineralization and properties of water-extractable organic carbon in soils of the south Loess Plateau in China. *European Journal of Soil Biology*, **44**: 158-165.

Zhen Z et al. (2014). Effects of Manure Compost Application on Soil Microbial Community Diversity and Soil Microenvironments in a Temperate Cropland in China. *PLoS ONE*, **9**.

Zuloaga O et al. (2012). Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Analytica Chimica Acta*, **736**: 7-29.

## **8 Anexos**



## ANEXO 1. Evolución detallada de los factores climáticos.



**Tabla 49. Datos climáticos de las parcelas durante el periodo de estudio.**

Los datos se obtuvieron de la propia estación meteorológica de la finca experimental (código 3195, dependiente de la AEMET). Las flechas señalan el número de muestreo y la estación del año.



## ANEXO 2. Perfiles metabólicos.

		S0		B0	
Á.Cít		6,20	0,35	8,01	0,92
Á.Mál	*	14,93	1,23	10,66	0,19
Á.Oxá	**	12,80	0,34	8,82	0,57
Á.Pro	***	14,78	0,63	2,77	0,15
Ala	*	6,75	0,54	8,41	0,24
Arg	**	3,18	0,37	6,92	0,57
GABA		3,88	0,44	4,93	0,16
Lys		0,61	0,24	1,41	0,19
Ara	*	4,99	0,24	6,65	0,46
Fru	*	6,86	0,25	8,73	0,40
Gal		7,25	0,22	8,19	0,34
Glu	**	5,29	0,30	9,29	0,39
NAG		5,14	0,29	6,92	0,66
Treh	*	6,73	0,23	8,29	0,40

		S1		B1	
Á.Cít		12,36	0,57	12,51	0,35
Á.Mál	***	18,63	0,73	8,96	0,41
Á.Oxá		16,70	0,57	17,13	0,97
Á.Pro	***	26,03	0,77	9,74	0,18
Ala		4,69	0,32	7,61	1,12
Arg		1,80	0,03	3,33	1,52
GABA	*	0,76	0,10	2,67	0,49
Lys	**	1,81	0,08	0,88	0,10
Ara	*	0,81	0,10	4,20	0,62
Fru		2,40	0,12	4,36	1,32
Gal	*	2,82	0,26	7,83	1,64
Glu	**	3,46	0,36	6,68	0,17
NAG		4,95	0,06	5,45	0,80
Treh	**	3,65	0,35	8,64	0,85

		S2		B2	
Á.Cít	**	18,54	1,11	11,94	0,28
Á.Mál	*	19,54	0,64	10,72	2,03
Á.Oxá		13,05	0,45	14,99	0,97
Á.Pro	**	12,77	0,32	9,31	0,39
Ala		4,32	0,18	7,87	1,60
Arg		2,79	0,23	4,46	0,56
GABA		1,23	0,14	2,56	0,53
Lys	**	1,76	0,10	0,84	0,11
Ara	**	1,27	0,21	4,00	0,46
Fru	*	3,55	0,12	4,77	0,25
Gal		6,86	0,66	7,55	0,18
Glu	**	4,39	0,27	6,08	0,15
NAG		6,94	0,14	6,70	0,33
Treh		6,75	0,36	8,21	0,56

		S3		B3	
Á.Cít	*	11,63	0,56	7,72	0,78
Á.Mál		9,95	0,43	10,33	0,19
Á.Oxá		8,23	0,45	8,92	0,38
Á.Pro		4,65	0,62	3,10	0,19
Ala	**	7,36	0,16	8,47	0,15
Arg		7,01	0,74	6,88	0,49
GABA		5,20	0,31	5,34	0,21
Lys	***	4,10	0,15	1,43	0,18
Ara		5,67	0,09	6,71	0,46
Fru	*	6,55	0,34	8,71	0,44
Gal		8,10	0,24	8,38	0,19
Glu	*	7,36	0,40	9,33	0,29
NAG		6,18	0,34	6,48	0,50
Treh		8,01	0,12	8,19	0,39

		S4		B4	
Á.Cít	*	10,67	0,29	7,75	0,76
Á.Mál	*	13,41	1,08	10,37	0,18
Á.Oxá		10,30	0,55	8,95	0,34
Á.Pro	**	6,98	0,60	3,11	0,20
Ala		7,69	0,30	8,50	0,12
Arg		7,47	0,34	6,90	0,47
GABA		5,27	0,35	4,98	0,23
Lys	**	4,75	0,43	1,43	0,19
Ara		5,82	0,36	6,74	0,48
Fru	***	5,20	0,45	9,30	0,11
Gal	*	7,08	0,29	8,41	0,21
Glu	***	0,73	0,01	9,49	0,43
NAG	*	8,17	0,23	5,79	0,47
Treh		9,19	0,35	8,26	0,44

		S5		B5	
Á.Cít	*	8,41	0,56	5,78	0,18
Á.Mál	**	17,35	0,63	11,24	0,58
Á.Oxá	*	12,84	0,73	9,72	0,42
Á.Pro	***	11,17	0,68	4,90	0,21
Ala	**	5,37	0,24	7,97	0,26
Arg	***	1,51	0,10	7,27	0,26
GABA	**	1,97	0,44	4,97	0,27
Lys		0,59	0,16	0,73	0,09
Ara	*	4,28	0,63	6,97	0,15
Fru		7,27	1,05	8,20	0,10
Gal		7,58	0,84	9,51	0,40
Glu	*	7,21	0,52	9,38	0,14
NAG	*	6,76	0,25	5,22	0,40
Treh		7,68	0,48	8,14	0,23

		S6		B6	
Á.Cít	***	16,40	1,02	6,41	0,51
Á.Mál	***	24,55	0,89	4,26	0,36
Á.Oxá	***	16,14	0,71	4,10	0,46
Á.Pro		5,94	0,06	6,03	0,58
Ala		4,68	1,53	4,96	0,86
Arg	***	1,79	0,05	10,31	0,36
GABA		8,20	8,07	10,89	0,61
Lys		2,10	1,59	5,28	0,68
Ara		8,18	7,68	8,83	0,63
Fru	*	2,01	0,28	4,70	0,81
Gal		6,36	0,35	7,81	1,26
Glu	**	4,22	1,01	9,87	0,58
NAG	*	2,25	0,29	4,07	0,57
Treh	*	5,85	1,30	12,47	1,17

		S7		B7	
Á.Cít	**	17,40	1,65	7,16	0,53
Á.Mál		16,78	1,94	11,75	2,53
Á.Oxá		13,73	1,27	13,05	2,67
Á.Pro		8,81	2,04	14,55	1,45
Ala		5,73	0,92	6,48	0,16
Arg		0,31	0,16	1,29	0,40
GABA	***	5,58	0,24	1,13	0,20
Lys		2,86	0,66	2,52	0,35
Ara		4,48	1,09	6,33	0,31
Fru		6,71	0,11	6,90	0,98
Gal		5,81	0,35	5,82	0,47
Glu	**	0,82	0,27	13,86	2,41
NAG		5,44	1,22	2,64	1,42
Treh		7,01	0,06	6,53	0,90

		S8		B8	
Á.Cít		13,78	2,90	9,48	0,45
Á.Mál	**	31,94	3,94	5,68	0,67
Á.Oxá		15,46	4,12	4,05	0,23
Á.Pro		6,77	1,11	4,39	0,36
Ala		7,53	1,59	7,11	1,68
Arg		3,85	0,51	1,66	0,69
GABA		4,67	1,65	8,44	0,55
Lys	*	0,60	0,07	4,19	0,71
Ara	**	3,82	1,16	16,92	1,71
Fru		3,27	1,23	5,38	0,24
Gal		10,40	2,24	6,53	0,15
Glu	*	2,42	0,49	6,75	1,35
NAG	**	2,27	0,36	10,08	1,44
Treh		8,65	2,13	9,36	1,36

		S9		B9	
Á.Cít	***	25,57	2,07	1,87	0,58
Á.Mál	**	29,47	2,19	8,55	1,29
Á.Oxá	***	8,55	0,35	1,02	0,27
Á.Pro	*	7,24	0,70	3,09	0,43
Ala	**	2,04	0,07	9,01	1,13
Arg	*	0,82	0,21	11,21	1,42
GABA		0,57	0,11	6,06	2,58
Lys	***	1,37	0,20	13,02	0,84
Ara	*	2,44	0,12	3,55	0,31
Fru		3,55	0,08	3,37	0,16
Gal	**	5,16	0,29	9,04	0,46
Glu		4,48	0,09	6,66	1,00
NAG		7,48	1,09	9,96	0,45
Treh	**	7,97	0,97	13,58	0,69

		S10		B10	
Á.Cít		13,73	2,84	20,38	1,39
Á.Mál		20,87	2,20	18,06	0,63
Á.Oxá		17,33	0,05	12,19	1,84
Á.Pro	**	20,24	1,49	8,56	0,56
Ala		5,73	0,79	5,08	0,10
Arg		1,66	0,25	5,11	1,28
GABA		2,16	0,39	1,12	0,65
Lys		0,69	0,06	0,77	0,21
Ara		2,84	0,36	3,06	0,61
Fru	*	6,27	0,44	3,09	0,58
Gal		6,13	0,18	5,66	0,59
Glu	**	5,40	0,59	0,96	0,23
NAG	***	3,95	0,37	7,93	0,20
Treh	**	5,71	0,28	8,03	0,15

**Tabla 50. Perfiles metabólicos de suelo control (suelos S) y suelo tratado con basura compostada (suelos B).**

Cada tabla corresponde a un muestreo, del 0 al 10, donde se presentan las medias (n=3) de las tasas porcentuales de consumo con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar se representa en las columnas adyacentes (color blanco). Los grados de significación de las diferencias entre las tasas porcentuales de consumo se indican con asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) correspondientes a  $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ;  $P<0,001$ ; respectivamente.

		S2		A0	
Á.Cít	**	18,54	1,11	10,02	0,40
Á.Mál	***	19,54	0,64	11,40	0,31
Á.Oxá	*	13,05	0,45	11,06	0,19
Á.Pro	***	12,77	0,32	5,76	0,15
Ala	*	4,32	0,18	6,86	0,38
Arg		2,79	0,23	3,36	0,33
GABA	*	1,23	0,14	4,64	0,86
Lys		1,76	0,10	2,05	0,86
Ara	**	1,27	0,21	4,06	0,42
Fru	***	3,55	0,12	7,48	0,28
Gal		6,86	0,66	7,57	0,27
Glu	***	4,39	0,27	9,75	0,50
NAG		6,94	0,14	7,54	0,22
Treh	*	6,75	0,36	8,44	0,19

		S3		A1	
Á.Cít		11,63	0,56	9,09	1,52
Á.Mál		9,95	0,43	12,50	1,07
Á.Oxá		8,23	0,45	9,55	0,24
Á.Pro	**	4,65	0,62	14,08	0,94
Ala		7,36	0,16	7,38	0,21
Arg	*	7,01	0,74	4,84	0,17
GABA		5,20	0,31	4,75	0,53
Lys	***	4,10	0,15	0,97	0,07
Ara		5,67	0,09	5,22	0,62
Fru		6,55	0,34	5,59	0,13
Gal		8,10	0,24	6,84	1,23
Glu		7,36	0,40	6,11	0,77
NAG		6,18	0,34	5,33	0,56
Treh		8,01	0,12	7,74	0,70

		S4		A2	
Á.Cít		10,67	0,29	10,60	0,65
Á.Mál		13,41	1,08	12,35	1,26
Á.Oxá		10,30	0,55	8,80	0,15
Á.Pro		6,98	0,60	8,31	0,73
Ala	*	7,69	0,30	6,51	0,18
Arg		7,47	0,34	5,97	0,33
GABA		5,27	0,35	3,96	0,36
Lys	*	4,75	0,43	1,93	0,78
Ara		5,82	0,36	5,76	0,27
Fru		5,20	0,45	6,33	0,12
Gal		7,08	0,29	7,43	0,51
Glu	**	0,73	0,01	5,86	0,40
NAG		8,17	0,23	7,53	0,22
Treh		9,19	0,35	8,66	0,41

		S5		A3	
Á.Cít	**	8,41	0,56	11,86	0,24
Á.Mál	*	17,35	0,63	13,85	0,62
Á.Oxá		12,84	0,73	10,73	0,22
Á.Pro	*	11,17	0,68	8,25	0,32
Ala	**	5,37	0,24	8,74	0,34
Arg	*	1,51	0,10	3,03	0,51
GABA		1,97	0,44	3,79	0,54
Lys	*	0,59	0,16	2,61	0,48
Ara		4,28	0,63	4,01	0,39
Fru		7,27	1,05	5,64	0,20
Gal		7,58	0,84	5,39	0,30
Glu		7,21	0,52	7,06	0,87
NAG		6,76	0,25	6,59	0,54
Treh		7,68	0,48	8,45	0,53

		S6		A4	
Á.Cít		16,40	1,02	14,90	0,78
Á.Mál	***	24,55	0,89	8,25	1,37
Á.Oxá	***	16,14	0,71	2,32	0,51
Á.Pro	*	5,94	0,06	12,21	1,02
Ala		4,68	1,53	9,83	1,40
Arg		1,79	0,05	3,02	1,18
GABA		8,20	8,07	7,78	1,22
Lys		2,10	1,59	2,52	0,37
Ara		8,18	7,68	9,11	1,44
Fru	**	2,01	0,28	7,04	0,59
Gal		6,36	0,35	5,96	0,73
Glu		4,22	1,01	7,89	2,32
NAG	*	2,25	0,29	3,94	0,39
Treh		5,85	1,30	5,24	0,98

		S7		A5	
Á.Cít	**	17,40	1,65	5,94	1,61
Á.Mál		16,78	1,94	19,44	4,39
Á.Oxá	*	13,73	1,27	7,52	0,51
Á.Pro		8,81	2,04	3,41	0,85
Ala		5,73	0,92	3,74	1,36
Arg	**	0,31	0,16	1,92	0,13
GABA	**	5,58	0,24	3,04	0,40
Lys		2,86	0,66	2,27	1,32
Ara		4,48	1,09	2,84	1,31
Fru		6,71	0,11	6,52	2,24
Gal		5,81	0,35	16,94	5,47
Glu		0,82	0,27	8,23	2,85
NAG		5,44	1,22	3,36	1,42
Treh	*	7,01	0,06	14,82	1,66

		S8		A6	
Á.Cít		13,78	2,90	8,20	2,98
Á.Mál	*	31,94	3,94	15,56	2,79
Á.Oxá		15,46	4,12	13,14	4,56
Á.Pro	*	6,77	1,11	2,84	0,78
Ala		7,53	1,59	5,36	1,29
Arg		3,85	0,51	6,40	1,29
GABA		4,67	1,65	6,32	0,38
Lys		0,60	0,07	4,29	1,05
Ara		3,82	1,16	5,02	1,02
Fru		3,27	1,23	7,79	3,53
Gal		10,40	2,24	4,38	0,52
Glu	***	2,42	0,49	9,29	0,51
NAG		2,27	0,36	5,19	2,41
Treh		8,65	2,13	6,22	1,95

		S9		A7	
Á.Cít	**	25,57	2,07	9,28	2,12
Á.Mál	**	29,47	2,19	9,80	0,85
Á.Oxá		8,55	0,35	5,10	1,37
Á.Pro		7,24	0,70	3,98	1,52
Ala	*	2,04	0,07	5,84	1,34
Arg		0,82	0,21	3,72	1,18
GABA	**	0,57	0,11	12,74	1,34
Lys		1,37	0,20	5,62	1,67
Ara		2,44	0,12	12,33	4,06
Fru		3,55	0,08	6,54	1,45
Gal		5,16	0,29	6,43	1,58
Glu	*	4,48	0,09	8,92	0,83
NAG		7,48	1,09	6,22	2,18
Treh	*	7,97	0,97	3,48	0,86

		S10		A8	
Á.Cít		13,73	2,84	17,28	1,61
Á.Mál	*	20,87	2,20	13,19	1,21
Á.Oxá		17,33	0,05	10,80	2,94
Á.Pro	*	20,24	1,49	9,69	2,19
Ala		5,73	0,79	6,12	1,79
Arg		1,66	0,25	1,86	0,39
GABA	**	2,16	0,39	5,04	0,32
Lys	**	0,69	0,06	3,46	0,34
Ara		2,84	0,36	4,57	0,59
Fru	*	6,27	0,44	3,83	0,32
Gal	**	6,13	0,18	7,38	0,11
Glu		5,40	0,59	6,04	1,08
NAG		3,95	0,37	3,58	1,63
Treh		5,71	0,28	7,17	0,97

**Tabla 51. Perfiles metabólicos de suelo control (suelo S) y suelo tratado con LAE (suelo A).**

Cada tabla corresponde a un muestreo, del 0 al 8 en el que el primer suelo control corresponde a S2, donde se presentan las medias (n=3) de las tasas porcentuales de consumo con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar se representa en las columnas adyacentes (color blanco). Los grados de significación de las diferencias entre las tasas porcentuales de consumo se indican con asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) correspondientes a  $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ;  $P<0,001$ ; respectivamente.

		S2		N0	
Á.Cít	**	18,54	1,11	10,04	0,29
Á.Mál	***	19,54	0,64	9,90	0,16
Á.Oxá	***	13,05	0,45	8,50	0,11
Á.Pro	***	12,77	0,32	5,88	0,34
Ala	***	4,32	0,18	7,76	0,06
Arg	***	2,79	0,23	4,91	0,07
GABA	**	1,23	0,14	5,64	0,55
Lys	***	1,76	0,10	3,27	0,06
Ara	***	1,27	0,21	6,52	0,23
Fru	***	3,55	0,12	7,56	0,28
Gal		6,86	0,66	7,38	0,22
Glu	*	4,39	0,27	7,49	0,77
NAG	**	6,94	0,14	7,96	0,04
Treh		6,75	0,36	7,20	0,25

		S3		N1	
Á.Cít	**	11,63	0,56	8,16	0,13
Á.Mál		9,95	0,43	9,43	0,40
Á.Oxá		8,23	0,45	8,54	0,27
Á.Pro		4,65	0,62	5,31	0,58
Ala	*	7,36	0,16	8,62	0,34
Arg		7,01	0,74	8,33	0,18
GABA		5,20	0,31	6,13	0,37
Lys	*	4,10	0,15	5,62	0,30
Ara		5,67	0,09	5,99	0,31
Fru		6,55	0,34	6,55	0,39
Gal		8,10	0,24	7,46	0,11
Glu	*	7,36	0,40	3,64	0,73
NAG	*	6,18	0,34	7,76	0,33
Treh	*	8,01	0,12	8,48	0,05

		S4		N2	
Á.Cít		10,67	0,29	13,09	1,35
Á.Mál		13,41	1,08	11,15	2,02
Á.Oxá		10,30	0,55	10,17	1,24
Á.Pro		6,98	0,60	8,23	1,49
Ala		7,69	0,30	6,67	0,58
Arg	**	7,47	0,34	4,68	0,28
GABA		5,27	0,35	4,45	0,66
Lys		4,75	0,43	3,93	0,43
Ara	*	5,82	0,36	4,67	0,10
Fru		5,20	0,45	6,46	0,37
Gal		7,08	0,29	7,08	0,43
Glu	**	0,73	0,01	4,86	0,41
NAG	*	8,17	0,23	6,95	0,22
Treh		9,19	0,35	7,61	0,79

		S5		N3	
Á.Cít		8,41	0,56	8,25	0,25
Á.Mál	**	17,35	0,63	13,17	0,24
Á.Oxá		12,84	0,73	11,33	0,33
Á.Pro	**	11,17	0,68	7,71	0,16
Ala	*	5,37	0,24	6,56	0,25
Arg	**	1,51	0,10	4,51	0,34
GABA	**	1,97	0,44	4,19	0,11
Lys	*	0,59	0,16	2,39	0,48
Ara		4,28	0,63	5,18	0,13
Fru		7,27	1,05	7,89	0,51
Gal		7,58	0,84	6,96	0,26
Glu		7,21	0,52	8,03	0,20
NAG		6,76	0,25	6,18	0,12
Treh		7,68	0,48	7,64	0,28

		S6		N4	
Á.Cít	**	16,40	1,02	6,71	1,39
Á.Mál	***	24,55	0,89	4,96	1,37
Á.Oxá	***	16,14	0,71	3,45	0,45
Á.Pro		5,94	0,06	5,49	1,01
Ala	*	4,68	1,53	11,54	1,26
Arg		1,79	0,05	4,47	0,66
GABA		8,20	8,07	1,39	1,11
Lys		2,10	1,59	0,96	0,14
Ara		8,18	7,68	4,08	1,03
Fru	*	2,01	0,28	9,23	2,08
Gal	*	6,36	0,35	8,77	0,45
Glu	**	4,22	1,01	26,84	3,77
NAG		2,25	0,29	4,00	0,66
Treh		5,85	1,30	8,10	2,89

		S7		N5	
Á.Cít		17,40	1,65	8,02	3,94
Á.Mál	*	16,78	1,94	7,72	0,82
Á.Oxá	*	13,73	1,27	6,53	1,87
Á.Pro		8,81	2,04	9,64	2,26
Ala	**	5,73	0,92	12,99	0,97
Arg	*	0,31	0,16	2,62	0,43
GABA		5,58	0,24	5,73	1,20
Lys		2,86	0,66	1,26	0,44
Ara		4,48	1,09	8,10	2,35
Fru		6,71	0,11	8,52	2,19
Gal		5,81	0,35	8,91	2,57
Glu	**	0,82	0,27	5,89	0,92
NAG		5,44	1,22	3,32	0,83
Treh		7,01	0,06	10,76	3,32

		S8		N6	
Á.Cít		13,78	2,90	19,15	2,92
Á.Mál		31,94	3,94	21,37	2,10
Á.Oxá		15,46	4,12	11,12	2,04
Á.Pro		6,77	1,11	3,89	1,07
Ala		7,53	1,59	3,82	0,51
Arg	*	3,85	0,51	1,31	0,33
GABA		4,67	1,65	1,50	0,37
Lys		0,60	0,07	1,40	0,49
Ara		3,82	1,16	3,41	0,99
Fru		3,27	1,23	7,76	1,71
Gal		10,40	2,24	5,81	1,07
Glu	*	2,42	0,49	8,22	1,30
NAG		2,27	0,36	3,17	0,73
Treh		8,65	2,13	8,07	0,50

		S9		N7	
Á.Cít	**	25,57	2,07	7,83	0,80
Á.Mál	***	29,47	2,19	9,47	0,50
Á.Oxá		8,55	0,35	7,87	1,13
Á.Pro		7,24	0,70	8,81	1,15
Ala	**	2,04	0,07	7,71	0,90
Arg		0,82	0,21	7,97	2,70
GABA		0,57	0,11	0,58	0,23
Lys		1,37	0,20	2,05	0,65
Ara		2,44	0,12	2,75	1,27
Fru		3,55	0,08	2,20	0,88
Gal	*	5,16	0,29	12,10	1,12
Glu		4,48	0,09	2,16	0,83
NAG	*	7,48	1,09	13,01	0,56
Treh	*	7,97	0,97	15,50	1,63

		S10		N8	
Á.Cít		13,73	2,84	17,49	2,32
Á.Mál	**	20,87	2,20	5,50	0,64
Á.Oxá	**	17,33	0,05	6,85	0,91
Á.Pro	*	20,24	1,49	6,79	3,75
Ala		5,73	0,79	2,95	0,66
Arg	**	1,66	0,25	17,61	2,05
GABA		2,16	0,39	2,34	1,15
Lys	*	0,69	0,06	3,57	0,98
Ara		2,84	0,36	1,41	0,38
Fru		6,27	0,44	2,94	1,19
Gal		6,13	0,18	6,10	3,22
Glu		5,40	0,59	3,32	1,03
NAG	***	3,95	0,37	15,04	1,12
Treh		5,71	0,28	8,10	2,06

**Tabla 52. Perfiles metabólicos de suelo control (suelo S) y suelo tratado con LANAE (suelo N).**

Cada tabla corresponde a un muestreo, del 0 al 8 en el que el primer suelo control corresponde a S2, donde se presentan las medias (n=3) de las tasas porcentuales de consumo con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar se representa en las columnas adyacentes (color blanco). Los grados de significación de las diferencias entre las tasas porcentuales de consumo se indican con asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) correspondientes a  $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ;  $P<0,001$ ; respectivamente.

## ANEXO 3. Composición de las poblaciones bacterianas.

Filo		S0		B0	
Acidobacteria		41,77	1,26	42,21	0,97
Actinobacteria		2,57	0,56	4,16	0,72
Bacteroidetes	**	1,04	0,18	0,25	0,10
Chloroflexi	*	0,12	0,02	0,03	0,02
Cyanobacteria		0,00	0,00	0,00	0,00
Deinococcus-Thermus		0,06	0,03	0,19	0,05
Firmicutes	***	11,22	0,67	1,35	0,22
Gemmatimonadetes	***	5,55	0,54	13,89	0,39
Nitrospira		0,65	0,16	0,33	0,09
Planctomycetes		3,64	0,37	4,86	0,69
Proteobacteria		31,66	1,26	31,49	0,62
Verrucomicrobia		1,67	0,41	1,20	0,36

Filo		S1		B1	
Acidobacteria	***	32,04	0,79	16,06	0,71
Actinobacteria		1,86	0,22	1,39	0,30
Bacteroidetes		3,05	0,47	2,10	0,44
Chloroflexi		0,06	0,04	0,09	0,08
Cyanobacteria	***	0,31	0,04	0,00	0,00
Deinococcus-Thermus		0,21	0,13	0,09	0,07
Firmicutes	**	3,41	0,16	1,90	0,22
Gemmatimonadetes	***	9,46	0,79	3,53	0,23
Nitrospira		0,16	0,06	0,21	0,03
Planctomycetes	***	9,83	0,36	0,56	0,12
Proteobacteria	***	37,32	1,12	69,76	1,13
Verrucomicrobia	*	2,13	0,58	4,26	0,32

Filo		S2		B2	
Acidobacteria	***	40,66	0,86	24,83	0,74
Actinobacteria		2,62	0,35	3,06	0,55
Bacteroidetes	*	0,79	0,12	2,05	0,35
Chloroflexi		0,25	0,09	0,22	0,08
Cyanobacteria		0,02	0,02	0,05	0,02
Deinococcus-Thermus		0,34	0,12	0,59	0,16
Firmicutes		3,03	0,11	2,76	0,23
Gemmatimonadetes		7,16	0,86	4,87	0,60
Nitrospira		0,36	0,10	0,25	0,10
Planctomycetes		1,86	0,46	1,05	0,18
Proteobacteria	***	39,11	0,59	54,21	1,74
Verrucomicrobia		3,66	0,50	5,98	1,33

Filo		S3		B3	
Acidobacteria		13,80	1,69	14,83	0,56
Actinobacteria		6,46	0,24	5,36	0,53
Bacteroidetes	***	3,07	0,57	9,87	0,73
Chloroflexi		0,44	0,11	0,17	0,04
Cyanobacteria		0,77	0,19	0,66	0,21
Deinococcus-Thermus		0,05	0,05	0,32	0,20
Firmicutes	*	7,11	1,13	2,87	0,33
Gemmatimonadetes		2,01	0,57	2,26	0,17
Nitrospira		0,07	0,05	0,18	0,02
Planctomycetes		13,47	1,44	10,74	0,74
Proteobacteria	*	50,94	0,40	49,17	0,41
Verrucomicrobia	**	1,68	0,37	3,53	0,32

Filo		S4		B4	
Acidobacteria		11,20	1,08	10,47	1,21
Actinobacteria		7,75	1,04	6,57	0,64
Bacteroidetes		2,84	0,45	3,14	0,52
Chloroflexi		0,32	0,14	0,60	0,12
Cyanobacteria	**	1,82	0,35	0,06	0,03
Deinococcus-Thermus		0,05	0,02	0,07	0,03
Firmicutes		6,38	0,91	7,30	1,15
Gemmatimonadetes		1,72	0,16	2,00	0,22
Nitrospira		0,02	0,02	0,18	0,09
Planctomycetes	***	25,47	0,96	13,35	1,10
Proteobacteria	***	41,62	1,39	53,46	0,83
Verrucomicrobia	**	0,81	0,17	2,74	0,35

Filo		S5		B5	
Acidobacteria	*	31,95	0,78	21,67	3,86
Actinobacteria	*	1,34	0,17	2,55	0,33
Bacteroidetes	*	2,12	0,80	5,62	1,18
Chloroflexi		0,09	0,09	0,06	0,06
Cyanobacteria		0,30	0,14	0,00	0,00
Deinococcus-Thermus		0,04	0,04	0,09	0,07
Firmicutes		4,94	0,46	4,66	1,20
Gemmatimonadetes		4,87	0,52	5,60	0,65
Nitrospira		0,00	0,00	0,60	0,33
Planctomycetes		5,36	0,48	8,67	1,48
Proteobacteria		47,55	1,17	46,28	1,79
Verrucomicrobia	*	1,30	0,40	4,00	0,73

Filo		S6		B6	
Acidobacteria	**	14,54	0,91	22,29	1,12
Actinobacteria		4,10	0,82	3,60	0,45
Bacteroidetes	**	1,53	0,09	3,10	0,34
Chloroflexi		0,49	0,21	0,18	0,07
Cyanobacteria	***	1,48	0,11	0,00	0,00
Deinococcus-Thermus		0,00	0,00	0,10	0,07
Firmicutes	***	13,13	0,53	5,30	0,38
Gemmatimonadetes	***	0,56	0,09	3,37	0,33
Nitrospira		0,14	0,10	0,17	0,05
Planctomycetes		10,51	0,50	10,64	0,78
Proteobacteria		52,91	1,45	47,91	1,70
Verrucomicrobia	***	0,48	0,15	3,22	0,43

Filo		S7		B7	
Acidobacteria	***	8,74	0,51	16,58	0,54
Actinobacteria	**	6,72	0,75	3,13	0,27
Bacteroidetes	***	0,53	0,12	5,16	0,74
Chloroflexi	*	0,71	0,13	0,29	0,06
Cyanobacteria	***	2,71	0,11	0,03	0,02
Deinococcus-Thermus	*	0,00	0,00	0,09	0,04
Firmicutes		7,22	0,47	6,26	0,38
Gemmatimonadetes	***	0,33	0,14	1,60	0,12
Nitrospira		0,01	0,01	0,17	0,08
Planctomycetes		14,40	0,91	16,08	0,29
Proteobacteria	***	58,36	0,39	47,93	1,01
Verrucomicrobia	**	0,22	0,11	2,59	0,51

**I**

Filo		S8		B8	
<i>Acidobacteria</i>	***	29,28	0,60	21,62	1,06
<i>Actinobacteria</i>		2,03	0,48	2,50	0,39
<i>Bacteroidetes</i>	***	3,36	0,10	0,36	0,07
<i>Chloroflexi</i>	**	0,04	0,03	0,62	0,13
<i>Cyanobacteria</i>		0,06	0,03	0,00	0,00
<i>Deinococcus-Thermus</i>		0,14	0,05	0,03	0,02
<i>Firmicutes</i>	*	4,48	0,22	6,86	0,66
<i>Gemmatimonadetes</i>	*	6,87	0,49	4,17	0,94
<i>Nitrospira</i>		0,34	0,04	0,45	0,09
<i>Planctomycetes</i>	***	7,33	0,83	2,05	0,18
<i>Proteobacteria</i>	***	42,48	1,13	58,87	1,07
<i>Verrucomicrobia</i>		3,57	0,70	2,42	0,23

**J**

Filo		S9		B9	
<i>Acidobacteria</i>		19,06	2,81	19,82	1,94
<i>Actinobacteria</i>	***	6,17	0,39	2,27	0,29
<i>Bacteroidetes</i>		0,97	0,19	0,58	0,30
<i>Chloroflexi</i>		0,18	0,09	0,36	0,08
<i>Cyanobacteria</i>		0,17	0,09	0,00	0,00
<i>Deinococcus-Thermus</i>		0,28	0,13	0,17	0,06
<i>Firmicutes</i>		10,94	2,54	14,30	1,42
<i>Gemmatimonadetes</i>		2,80	0,95	2,58	0,26
<i>Nitrospira</i>		0,13	0,11	0,22	0,08
<i>Planctomycetes</i>	*	3,83	0,46	1,60	0,67
<i>Proteobacteria</i>		54,15	2,34	56,36	2,21
<i>Verrucomicrobia</i>		1,26	0,33	1,58	0,41

**K**

Filo		S10		B10	
<i>Acidobacteria</i>	*	50,55	0,43	46,13	1,27
<i>Actinobacteria</i>		0,38	0,09	0,97	0,35
<i>Bacteroidetes</i>	**	4,03	0,61	0,71	0,18
<i>Chloroflexi</i>		0,04	0,02	0,11	0,06
<i>Cyanobacteria</i>		0,32	0,12	0,19	0,03
<i>Deinococcus-Thermus</i>		0,23	0,11	0,23	0,11
<i>Firmicutes</i>		2,29	0,28	2,10	0,06
<i>Gemmatimonadetes</i>		5,41	0,31	7,09	0,62
<i>Nitrospira</i>		0,46	0,12	0,67	0,12
<i>Planctomycetes</i>		1,68	0,21	2,18	0,38
<i>Proteobacteria</i>	*	32,85	0,53	37,09	1,06
<i>Verrucomicrobia</i>		1,64	0,17	2,53	0,46

**Tabla 53. Composición de los filos bacterianos de suelo control (suelo S) y suelo tratado con basura compostada (suelo B) en cada uno de los muestreos.**

Cada tabla (A-K) corresponde a un muestreo, del 0 al 10, donde se presentan las medias (n=4) de los valores de abundancia porcentual con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar se representa en las columnas adyacentes (color blanco). Los grados de significación de las diferencias entre las tasas porcentuales de consumo se indican con asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) correspondientes a  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$ ; respectivamente.

A					B					C					D								
Clase		S0		B0		Clase		S1		B1		Clase		S2		B2		Clase		S3		B3	
Gp1		0,48	0,12	0,29	0,11	Gp1		0,23	0,12	0,14	0,09	Gp1	**	0,76	0,12	0,19	0,07	Gp1		0,29	0,24	0,00	0,00
Gp10		1,32	0,30	0,74	0,24	Gp10	**	0,99	0,21	0,10	0,04	Gp10		0,90	0,12	0,83	0,18	Gp10	***	0,16	0,09	2,06	0,23
Gp11		0,00	0,00	0,11	0,05	Gp11		0,05	0,03	0,01	0,01	Gp15		0,00	0,00	0,01	0,01	Gp16		0,07	0,07	0,00	0,00
Gp16		0,00	0,00	0,01	0,01	Gp15		0,04	0,03	0,00	0,00	Gp17	*	1,43	0,38	0,22	0,07	Gp17		0,08	0,03	0,04	0,02
Gp17	**	1,60	0,30	3,08	0,22	Gp17	***	1,97	0,20	0,47	0,11	Gp18		0,01	0,01	0,00	0,00	Gp25		0,06	0,06	0,01	0,01
Gp18		0,00	0,00	0,02	0,02	Gp18		0,01	0,01	0,00	0,00	Gp21		0,08	0,08	0,00	0,00	Gp3	*	3,62	0,83	1,34	0,22
Gp19		0,00	0,00	0,02	0,01	Gp19		0,00	0,00	0,02	0,02	Gp22		0,04	0,04	0,00	0,00	Gp4		1,13	0,44	2,04	0,48
Gp2		0,01	0,01	0,02	0,01	Gp2		0,02	0,02	0,01	0,01	Gp25		0,35	0,23	0,02	0,01	Gp5		0,08	0,06	0,04	0,02
Gp22		0,01	0,01	0,06	0,04	Gp22		0,08	0,05	0,00	0,00	Gp3	*	0,60	0,16	1,16	0,09	Gp6		7,82	1,11	7,53	0,48
Gp25		0,34	0,15	0,25	0,07	Gp25		0,23	0,10	0,00	0,00	Gp4		4,82	0,68	4,94	0,58	Gp7	*	0,40	0,04	1,65	0,39
Gp3	*	1,45	0,26	0,46	0,11	Gp3		0,76	0,36	0,34	0,10	Gp5	**	1,20	0,15	0,40	0,10	Gp9		0,03	0,03	0,00	0,00
Gp4	**	3,26	0,38	0,89	0,19	Gp4		3,67	0,37	3,72	0,23	Gp6	***	28,30	1,76	14,64	0,28	Actinobacteria		6,46	0,24	5,36	0,53
Gp5	*	1,39	0,20	0,51	0,17	Gp5		1,18	0,31	0,53	0,05	Gp7	*	1,66	0,23	2,39	0,05	Flavobacteria	*	0,09	0,03	0,64	0,18
Gp6	*	29,73	1,36	33,85	0,57	Gp6	***	20,68	0,78	9,72	0,37	Gp9	*	0,16	0,06	0,00	0,00	Sphingobacteria	***	2,39	0,54	8,18	0,75
Gp7		1,50	0,24	0,99	0,15	Gp7		1,46	0,29	0,87	0,24	Actinobacteria		2,62	0,35	3,06	0,55	Anaerolineae		0,11	0,08	0,02	0,02
Gp9		0,24	0,04	0,48	0,19	Gp9		0,26	0,06	0,07	0,06	Flavobacteria		0,00	0,00	0,11	0,09	Caldilineae	***	0,17	0,02	0,00	0,00
Actinobacteria		2,57	0,56	4,16	0,72	Actinobacteria		1,86	0,22	1,39	0,30	Sphingobacteria	*	0,69	0,11	1,58	0,29	Chloroflexi		0,01	0,01	0,00	0,00
Sphingobacteria	**	0,91	0,15	0,11	0,08	Flavobacteria	*	0,00	0,00	0,54	0,17	Anaerolineae		0,06	0,04	0,02	0,01	Cyanobacteria		0,77	0,19	0,66	0,21
Anaerolineae		0,01	0,01	0,00	0,00	Sphingobacteria	*	2,66	0,25	1,43	0,28	Caldilineae		0,07	0,07	0,01	0,01	Deinococci		0,05	0,05	0,32	0,20
Caldilineae		0,02	0,02	0,00	0,00	Anaerolineae		0,03	0,03	0,00	0,00	Chloroflexi		0,00	0,00	0,14	0,07	Bacilli	*	6,30	0,97	2,65	0,32
Deinococci		0,06	0,03	0,19	0,05	Chloroflexi		0,00	0,00	0,08	0,08	Cyanobacteria		0,02	0,02	0,05	0,02	Clostridia	*	0,57	0,15	0,12	0,01
Bacilli	***	7,85	0,65	0,22	0,02	Thermomicrobia		0,03	0,02	0,00	0,00	Deinococci		0,34	0,12	0,59	0,16	Gemmatimonadetes		2,01	0,57	2,26	0,17
Clostridia	**	2,75	0,29	0,82	0,16	Cyanobacteria	***	0,31	0,04	0,00	0,00	Bacilli	*	1,31	0,23	2,13	0,10	Nitrospira		0,07	0,05	0,18	0,02
Gemmatimonadetes	***	5,55	0,54	13,89	0,39	Deinococci		0,21	0,13	0,09	0,07	Clostridia	**	1,07	0,07	0,47	0,13	Planctomycetacia		13,47	1,44	10,74	0,74
Nitrospira		0,65	0,16	0,33	0,09	Bacilli		1,43	0,23	1,29	0,25	Gemmatimonadetes		7,16	0,86	4,87	0,60	Alphaproteobacteria		19,02	0,95	20,71	0,85
Planctomycetacia		3,64	0,37	4,86	0,69	Clostridia	*	1,07	0,16	0,47	0,09	Nitrospira		0,36	0,10	0,25	0,10	Betaproteobacteria		13,98	0,74	14,84	1,15
Alphaproteobacteria		22,85	1,31	23,88	0,30	Gemmatimonadetes	***	9,46	0,79	3,53	0,23	Planctomycetacia		1,86	0,46	1,05	0,18	Deltaproteobacteria		5,96	0,56	4,18	0,68
Betaproteobacteria		3,17	0,11	3,32	0,39	Nitrospira		0,16	0,06	0,21	0,03	Alphaproteobacteria	*	31,59	0,28	40,12	2,35	Gammaproteobacteria		8,27	0,64	6,92	1,19
Deltaproteobacteria	**	1,64	0,13	0,94	0,13	Planctomycetacia	***	9,83	0,36	0,56	0,12	Betaproteobacteria	**	2,47	0,44	6,79	0,86	Opitutae		0,47	0,20	0,63	0,15
Gammaproteobacteria		1,74	0,24	1,07	0,29	Alphaproteobacteria	***	26,01	0,43	52,03	1,26	Deltaproteobacteria	*	1,51	0,24	2,53	0,29	Spartobacteria	*	0,12	0,10	0,51	0,11
Opitutae		0,33	0,09	0,19	0,09	Betaproteobacteria	**	2,78	0,35	10,54	1,26	Gammaproteobacteria	*	1,20	0,21	3,24	0,53	Subdivision3		0,96	0,28	1,76	0,28
Spartobacteria		0,28	0,15	0,09	0,06	Deltaproteobacteria	***	2,55	0,15	0,79	0,13	Opitutae		1,10	0,48	1,31	0,30	Verrucomicrobiae	**	0,01	0,01	0,27	0,05
Subdivision3		0,92	0,27	0,68	0,13	Gammaproteobacteria	**	2,75	0,15	5,30	0,61	Spartobacteria		0,23	0,11	1,33	0,45						
						Opitutae		0,59	0,11	0,88	0,37	Subdivision3		1,54	0,30	1,66	0,52						
						Spartobacteria	***	0,13	0,06	1,10	0,13	Verrucomicrobiae	***	0,09	0,04	1,11	0,16						
						Subdivision3		0,97	0,30	0,72	0,16												
						Verrucomicrobiae	***	0,07	0,05	1,23	0,16												

**E**

Clase		S4		B4	
Gp1		0,03	0,02	0,02	0,02
Gp10	*	0,05	0,03	0,95	0,31
Gp17		0,23	0,06	0,12	0,05
Gp25		0,04	0,03	0,08	0,06
Gp3	***	2,93	0,29	0,78	0,10
Gp4		1,02	0,12	1,38	0,30
Gp5		0,22	0,16	0,05	0,03
Gp6		5,79	0,77	6,45	0,71
Gp7		0,39	0,13	0,58	0,26
Gp9		0,18	0,11	0,00	0,00
Actinobacteria		7,75	1,04	6,57	0,64
Flavobacteria		0,00	0,00	0,06	0,06
Sphingobacteria		2,45	0,56	2,66	0,55
Anaerolineae		0,12	0,06	0,06	0,03
Caldilineae		0,11	0,05	0,24	0,11
Chloroflexi		0,01	0,01	0,05	0,05
Thermomicrobia		0,01	0,01	0,02	0,02
Cyanobacteria	**	1,82	0,35	0,06	0,03
Deinococci		0,05	0,02	0,07	0,03
Bacilli		5,60	0,89	6,92	1,09
Clostridia		0,40	0,09	0,25	0,07
Gemmatimonadetes		1,72	0,16	2,00	0,22
Nitrospira		0,02	0,02	0,18	0,09
Planctomycetacia	***	25,47	0,96	13,35	1,10
Alphaproteobacteria	**	18,10	1,07	29,81	1,81
Betaproteobacteria		10,13	0,34	12,83	1,09
Deltaproteobacteria		4,75	0,59	3,62	0,72
Gammaproteobacteria		5,83	0,40	5,62	0,58
Opirituae	*	0,07	0,03	0,60	0,17
Spartobacteria	*	0,03	0,03	0,52	0,13
Subdivision3		0,47	0,20	0,67	0,19
Verrucomicrobiae	**	0,02	0,02	0,35	0,07

**F**

Clase		S5		B5	
Gp1	**	1,15	0,27	0,00	0,00
Gp10		0,47	0,26	0,81	0,22
Gp11		0,02	0,02	0,00	0,00
Gp16		0,00	0,00	0,01	0,01
Gp17	*	1,53	0,40	0,23	0,16
Gp18		0,02	0,02	0,00	0,00
Gp2		0,02	0,02	0,00	0,00
Gp22		0,04	0,04	0,00	0,00
Gp25		0,78	0,24	0,16	0,13
Gp3		0,41	0,13	1,13	0,37
Gp4		4,27	0,38	4,87	0,70
Gp5	**	2,18	0,30	0,28	0,15
Gp6		19,51	1,14	13,36	2,82
Gp7		0,83	0,12	0,80	0,17
Gp9		0,33	0,17	0,00	0,00
Actinobacteria	*	1,34	0,17	2,55	0,33
Flavobacteria		0,99	0,38	0,55	0,23
Sphingobacteria	*	1,09	0,42	3,62	0,70
Anaerolineae		0,02	0,02	0,01	0,01
Caldilineae		0,04	0,04	0,01	0,01
Thermomicrobia		0,00	0,00	0,01	0,01
Cyanobacteria		0,30	0,14	0,00	0,00
Deinococci		0,04	0,04	0,09	0,07
Bacilli		3,83	0,74	4,05	1,15
Clostridia		0,61	0,18	0,21	0,10
Gemmatimonadetes		4,87	0,52	5,60	0,65
Nitrospira		0,00	0,00	0,60	0,33
Planctomycetacia		5,36	0,48	8,67	1,48
Alphaproteobacteria	*	14,09	0,84	24,03	3,18
Betaproteobacteria		8,65	0,63	9,30	2,04
Deltaproteobacteria		3,16	0,57	4,26	0,99
Gammaproteobacteria	**	18,13	0,64	7,38	2,35
Opirituae		0,20	0,12	0,99	0,33
Spartobacteria		0,21	0,16	0,53	0,10
Subdivision3		0,72	0,27	1,60	0,46
Verrucomicrobiae		0,08	0,08	0,44	0,16

**G**

Clase		S6		B6	
Gp1		0,25	0,08	0,11	0,03
Gp10	**	0,12	0,04	0,75	0,13
Gp15		0,00	0,00	0,03	0,03
Gp17		0,08	0,04	0,12	0,07
Gp18		0,03	0,03	0,00	0,00
Gp25		0,06	0,06	0,04	0,04
Gp3	***	7,49	0,48	2,41	0,37
Gp4	***	0,63	0,11	2,11	0,17
Gp5		0,45	0,09	0,48	0,16
Gp6	***	4,83	0,50	15,10	1,15
Gp7	*	0,35	0,13	1,05	0,19
Gp9		0,09	0,09	0,00	0,00
Actinobacteria		4,10	0,82	3,60	0,45
Flavobacteria	**	0,02	0,02	0,27	0,05
Sphingobacteria	*	1,13	0,19	1,90	0,16
Anaerolineae		0,06	0,04	0,07	0,03
Caldilineae		0,06	0,04	0,01	0,01
Chloroflexi		0,12	0,11	0,00	0,00
Thermomicrobia		0,01	0,01	0,00	0,00
Cyanobacteria	***	1,48	0,11	0,00	0,00
Deinococci		0,00	0,00	0,10	0,07
Bacilli	***	11,55	0,78	4,48	0,36
Clostridia		1,03	0,36	0,50	0,10
Gemmatimonadetes	***	0,56	0,09	3,37	0,33
Nitrospira		0,14	0,10	0,17	0,05
Planctomycetacia		10,51	0,50	10,64	0,78
Alphaproteobacteria	**	14,58	1,24	20,23	0,86
Betaproteobacteria	**	18,75	0,64	11,25	1,08
Deltaproteobacteria	*	6,75	0,27	5,36	0,39
Gammaproteobacteria		7,83	0,33	7,71	0,41
Opirituae		0,08	0,03	0,57	0,22
Spartobacteria		0,04	0,03	0,26	0,12
Subdivision3	**	0,29	0,09	1,98	0,41
Verrucomicrobiae		0,03	0,03	0,24	0,10

**H**

Clase		S7		B7	
Gp1		0,02	0,02	0,09	0,06
Gp10	***	0,31	0,12	1,98	0,10
Gp17		0,09	0,05	0,03	0,03
Gp25		0,03	0,03	0,00	0,00
Gp3	***	5,24	0,49	1,49	0,15
Gp4		0,69	0,20	1,92	0,47
Gp5		0,01	0,01	0,07	0,04
Gp6	***	2,28	0,13	10,30	0,55
Gp7	**	0,06	0,03	0,61	0,12
Actinobacteria	**	6,72	0,75	3,13	0,27
Flavobacteria		0,00	0,00	0,08	0,06
Sphingobacteria	**	0,50	0,15	4,21	0,61
Anaerolineae	*	0,15	0,05	0,03	0,02
Caldilineae		0,17	0,11	0,11	0,02
Chloroflexi		0,00	0,00	0,01	0,01
Thermomicrobia		0,05	0,05	0,00	0,00
Cyanobacteria	***	2,71	0,11	0,03	0,02
Deinococci	*	0,00	0,00	0,09	0,04
Bacilli		6,44	0,51	5,71	0,32
Clostridia		0,44	0,09	0,35	0,07
Gemmatimonadetes	***	0,33	0,14	1,60	0,12
Nitrospira		0,01	0,01	0,17	0,08
Planctomycetacia		14,40	0,91	16,08	0,29
Alphaproteobacteria	***	17,44	0,56	22,63	0,42
Betaproteobacteria	***	17,77	0,42	10,38	0,93
Deltaproteobacteria	*	8,67	0,61	6,77	0,40
Gammaproteobacteria	***	10,53	0,69	5,13	0,59
Opirituae	*	0,02	0,02	0,62	0,17
Spartobacteria		0,04	0,02	0,34	0,17
Subdivision3	***	0,13	0,06	1,25	0,13
Verrucomicrobiae		0,00	0,00	0,08	0,05

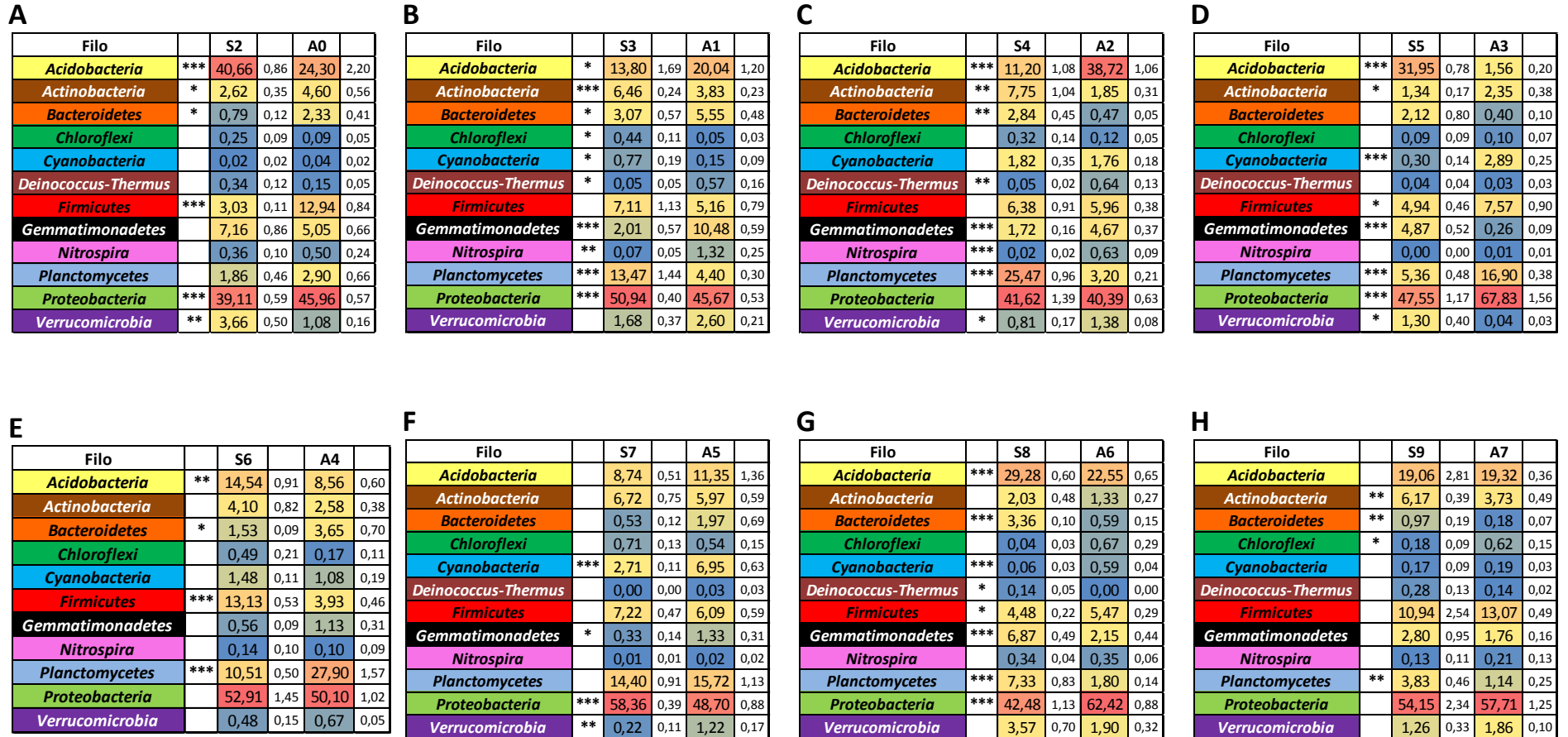
Clase		S8		B8	
Gp1		0,31	0,11	0,12	0,08
Gp10		1,66	0,14	2,16	0,24
Gp15		0,01	0,01	0,00	0,00
Gp16		0,00	0,00	0,01	0,01
Gp17		0,45	0,06	0,35	0,18
Gp2		0,01	0,01	0,00	0,00
Gp25		0,12	0,03	0,03	0,02
Gp3		0,81	0,11	2,10	0,72
Gp4		2,36	0,14	2,23	0,11
Gp5		0,52	0,11	0,31	0,09
Gp6	***	21,70	0,62	12,67	0,38
Gp7		1,01	0,14	1,48	0,31
Gp9		0,03	0,01	0,01	0,01
Actinobacteria		2,03	0,48	2,50	0,39
Flavobacteria	*	0,04	0,01	0,00	0,00
Sphingobacteria	***	3,30	0,09	0,23	0,08
Anaerolineae	**	0,00	0,00	0,11	0,02
Caldilineae		0,03	0,03	0,07	0,07
Chloroflexi		0,00	0,00	0,01	0,01
Thermomicrobia		0,00	0,00	0,01	0,01
Cyanobacteria		0,06	0,03	0,00	0,00
Deinococci		0,14	0,05	0,03	0,02
Bacilli	**	2,23	0,23	6,52	0,73
Clostridia	***	1,93	0,17	0,13	0,04
Gemmatimonadetes	*	6,87	0,49	4,17	0,94
Nitrospira		0,34	0,04	0,45	0,09
Planctomycetacia	***	7,33	0,83	2,05	0,18
Alphaproteobacteria	**	36,25	1,27	29,52	1,21
Betaproteobacteria	***	1,41	0,11	13,70	1,08
Deltaproteobacteria	**	2,20	0,47	5,79	0,47
Gammaproteobacteria	***	0,83	0,14	6,86	0,44
Opitutae		1,05	0,39	0,46	0,15
Spartobacteria		0,32	0,12	0,08	0,02
Subdivision3		1,37	0,20	1,31	0,07
Verrucomicrobiae		0,18	0,10	0,15	0,09

Clase		S9		B9	
Gp1		0,10	0,04	0,00	0,00
Gp10	*	1,55	0,21	0,73	0,13
Gp11		0,00	0,00	0,02	0,02
Gp16		0,00	0,00	0,02	0,02
Gp17		0,94	0,42	0,26	0,04
Gp25		0,10	0,07	0,00	0,00
Gp3		1,28	0,26	2,11	0,43
Gp4		1,39	0,23	1,41	0,25
Gp5		0,20	0,07	0,38	0,06
Gp6		11,91	2,42	12,96	1,78
Gp7		1,45	0,35	1,61	0,43
Gp9		0,00	0,00	0,15	0,13
Actinobacteria	***	6,17	0,39	2,27	0,29
Flavobacteria		0,00	0,00	0,01	0,01
Sphingobacteria	**	0,88	0,17	0,14	0,04
Anaerolineae		0,00	0,00	0,02	0,02
Caldilineae		0,04	0,03	0,15	0,10
Chloroflexi		0,04	0,04	0,03	0,02
Cyanobacteria		0,17	0,09	0,00	0,00
Deinococci		0,28	0,13	0,17	0,06
Bacilli		10,12	2,58	13,35	1,28
Clostridia		0,62	0,01	0,71	0,17
Gemmatimonadetes		2,80	0,95	2,58	0,26
Nitrospira		0,13	0,11	0,22	0,08
Planctomycetacia	*	3,83	0,46	1,60	0,67
Alphaproteobacteria		35,26	2,00	33,16	1,00
Betaproteobacteria	*	4,82	1,21	10,50	1,07
Deltaproteobacteria		6,52	1,81	4,84	0,73
Gammaproteobacteria		2,33	0,61	4,10	0,86
Opitutae	*	0,31	0,05	0,55	0,06
Spartobacteria		0,07	0,07	0,08	0,04
Subdivision3		0,64	0,33	0,83	0,33
Verrucomicrobiae		0,04	0,03	0,07	0,04

Clase		S10		B10	
Gp1		0,13	0,06	0,15	0,04
Gp10		0,53	0,15	0,91	0,38
Gp17		0,45	0,14	0,12	0,05
Gp18		0,00	0,00	0,02	0,02
Gp2		0,00	0,00	0,12	0,08
Gp25		0,16	0,05	0,09	0,04
Gp3		1,02	0,16	2,70	0,73
Gp4		4,95	0,77	4,54	0,57
Gp5		0,26	0,12	0,58	0,28
Gp6		39,65	1,18	35,16	2,00
Gp7		2,31	0,38	1,93	0,31
Gp9		0,09	0,07	0,06	0,05
Actinobacteria		0,72	0,43	0,63	0,07
Sphingobacteria		3,22	1,08	1,32	0,67
Anaerolineae		0,02	0,02	0,01	0,01
Chloroflexi		0,00	0,00	0,03	0,03
Cyanobacteria		0,29	0,13	0,22	0,03
Deinococci		0,23	0,11	0,23	0,11
Bacilli		1,27	0,23	1,77	0,08
Clostridia		0,45	0,16	0,31	0,20
Gemmatimonadetes		6,17	0,76	6,34	0,61
Nitrospira		0,55	0,16	0,59	0,11
Planctomycetacia	*	1,44	0,05	2,42	0,26
Alphaproteobacteria		18,76	0,58	21,36	1,25
Betaproteobacteria		6,75	0,40	7,32	0,85
Deltaproteobacteria		2,41	0,45	2,97	0,55
Gammaproteobacteria		2,38	0,47	2,89	0,69
Opitutae		0,42	0,11	0,82	0,22
Spartobacteria		0,06	0,02	0,18	0,06
Subdivision3		1,01	0,14	1,00	0,24
Verrucomicrobiae		0,02	0,02	0,11	0,06

Tabla 54. Composición de las clases bacterianas del suelo control (suelo S) y suelo tratado con basura compostada (suelo B) en cada uno de los muestreos.

Cada tabla (A-K) corresponde a un muestreo, del 0 al 10, donde se presentan las medias (n=4) de los valores de abundancia porcentual con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar se representa en las columnas adyacentes (color blanco). Los grados de significación de las diferencias entre las tasas porcentuales de consumo se indican con asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) correspondientes a  $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ;  $P<0,001$ ; respectivamente.



Filo		S10		A8	
<i>Acidobacteria</i>	***	50,55	0,43	35,53	1,53
<i>Actinobacteria</i>	**	0,38	0,09	2,24	0,33
<i>Bacteroidetes</i>	**	4,03	0,61	0,96	0,12
<i>Chloroflexi</i>		0,04	0,02	0,03	0,02
<i>Cyanobacteria</i>	*	0,32	0,12	0,03	0,03
<i>Deinococcus-Thermus</i>		0,23	0,11	0,08	0,04
<i>Firmicutes</i>	***	2,29	0,28	6,67	0,67
<i>Gemmatimonadetes</i>		5,41	0,31	6,00	0,81
<i>Nitrospira</i>		0,46	0,12	0,26	0,12
<i>Planctomycetes</i>	*	1,68	0,21	4,45	0,76
<i>Proteobacteria</i>	***	32,85	0,53	41,61	1,04
<i>Verrucomicrobia</i>		1,64	0,17	1,93	0,38

**Tabla 55. Composición de los filos bacterianos de suelo control (suelo S) y suelo tratado con lodo aerobio (suelo A) en cada uno de los muestreos.**

Cada tabla (A-I) corresponde a un muestreo, del 0 al 8 en el que el primer suelo control corresponde a S2, donde se presentan las medias (n=4) de los valores de abundancia porcentual con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar se representa en las columnas adyacentes (color blanco). Los grados de significación de las diferencias entre las tasas porcentuales de consumo se indican con asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) correspondientes a  $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ;  $P<0,001$ ; respectivamente.

**A**

Clase		S2		A0	
Gp1	**	0,76	0,12	0,16	0,06
Gp10		0,90	0,12	0,58	0,07
Gp17		1,43	0,38	0,76	0,26
Gp25		0,35	0,23	0,12	0,06
Gp3		0,60	0,16	0,48	0,12
Gp4		4,82	0,68	5,13	0,78
Gp5	**	1,20	0,15	0,27	0,10
Gp6	**	28,30	1,76	14,91	1,57
Gp7		1,66	0,23	1,73	0,15
Gp9		0,16	0,06	0,04	0,02
Actinobacteria	*	2,62	0,35	4,60	0,56
Bacteroidia		0,00	0,00	0,09	0,05
Flavobacteria		0,00	0,00	0,05	0,03
Sphingobacteria	*	0,69	0,11	1,57	0,14
Anaerolineae		0,06	0,04	0,01	0,01
Caldilineae		0,07	0,07	0,06	0,04
Cyanobacteria		0,02	0,02	0,04	0,02
Deinococci		0,34	0,12	0,15	0,05
Bacilli	***	1,31	0,23	7,16	0,93
Clostridia	***	1,07	0,07	5,41	0,24
Gemmatimonadetes		7,16	0,86	5,05	0,66
Nitrospira		0,36	0,10	0,50	0,24
Planctomycetacia		1,86	0,46	2,90	0,66
Alphaproteobacteria	**	31,59	0,28	35,92	0,78
Betaproteobacteria		2,47	0,44	3,69	0,60
Deltaproteobacteria		1,51	0,24	1,64	0,34
Gammaproteobacteria	*	1,20	0,21	3,23	0,56
Opitutae		1,10	0,48	0,36	0,11
Spartobacteria		0,23	0,11	0,23	0,04
Subdivision3	**	1,54	0,30	0,36	0,07
Verrucomicrobiae		0,09	0,04	0,04	0,02

**B**

Clase		S3		A1	
Gp1		0,29	0,24	0,36	0,15
Gp10	***	0,16	0,09	0,98	0,07
Gp15		0,00	0,00	0,02	0,02
Gp16		0,07	0,07	0,00	0,00
Gp17		0,08	0,03	0,35	0,19
Gp22		0,00	0,00	0,02	0,02
Gp25		0,06	0,06	0,07	0,04
Gp3	*	3,62	0,83	0,68	0,18
Gp4	**	1,13	0,44	3,50	0,29
Gp5		0,08	0,06	0,38	0,14
Gp6	*	7,82	1,11	12,21	0,64
Gp7	*	0,40	0,04	1,29	0,25
Gp9		0,03	0,03	0,05	0,05
Actinobacteria	***	6,46	0,24	3,83	0,23
Flavobacteria		0,09	0,03	0,04	0,02
Sphingobacteria	**	2,39	0,54	4,97	0,31
Anaerolineae		0,11	0,08	0,03	0,02
Caldilineae	***	0,17	0,02	0,01	0,01
Cyanobacteria	*	0,77	0,19	0,15	0,09
Deinococci	*	0,05	0,05	0,57	0,16
Bacilli	**	6,30	0,97	1,97	0,43
Clostridia	**	0,57	0,15	2,31	0,27
Gemmatimonadetes	***	2,01	0,57	10,48	0,59
Nitrospira	**	0,07	0,05	1,32	0,25
Planctomycetacia	***	13,47	1,44	4,40	0,30
Alphaproteobacteria	***	19,02	0,95	35,12	0,58
Betaproteobacteria	***	13,98	0,74	2,48	0,36
Deltaproteobacteria	***	5,96	0,56	1,46	0,23
Gammaproteobacteria	**	8,27	0,64	5,52	0,30
Opitutae		0,47	0,20	0,30	0,07
Spartobacteria	*	0,12	0,10	0,58	0,12
Subdivision3		0,96	0,28	1,40	0,10
Verrucomicrobiae		0,01	0,01	0,01	0,01

**C**

Clase		S4		A2	
Gp1	*	0,03	0,02	0,45	0,12
Gp10	***	0,05	0,03	0,78	0,10
Gp11	*	0,00	0,00	0,04	0,02
Gp17	*	0,23	0,06	1,05	0,23
Gp18		0,00	0,00	0,04	0,04
Gp19		0,00	0,00	0,02	0,02
Gp22		0,00	0,00	0,04	0,03
Gp25		0,04	0,03	0,67	0,34
Gp3	***	2,93	0,29	0,79	0,17
Gp4	***	1,02	0,12	4,61	0,47
Gp5		0,22	0,16	0,48	0,12
Gp6	***	5,79	0,77	27,44	0,96
Gp7	**	0,39	0,13	1,75	0,21
Gp9		0,18	0,11	0,17	0,04
Actinobacteria	**	7,75	1,04	1,85	0,31
Sphingobacteria	*	2,45	0,56	0,44	0,04
Anaerolineae		0,12	0,06	0,03	0,02
Caldilineae		0,11	0,05	0,02	0,02
Thermomicrobia		0,01	0,01	0,01	0,01
Cyanobacteria		1,82	0,35	1,76	0,18
Deinococci	**	0,05	0,02	0,64	0,13
Bacilli		5,60	0,89	4,32	0,16
Clostridia	*	0,40	0,09	0,99	0,21
Gemmatimonadetes	***	1,72	0,16	4,67	0,37
Nitrospira	***	0,02	0,02	0,63	0,09
Planctomycetacia	***	25,47	0,96	3,20	0,21
Alphaproteobacteria	***	18,10	1,07	32,27	0,83
Betaproteobacteria	***	10,13	0,34	2,46	0,53
Deltaproteobacteria	**	4,75	0,59	1,72	0,23
Gammaproteobacteria	**	5,83	0,40	2,01	0,26
Opitutae	*	0,07	0,03	0,24	0,05
Spartobacteria		0,03	0,03	0,08	0,02
Subdivision3		0,47	0,20	0,95	0,13
Verrucomicrobiae		0,02	0,02	0,01	0,01

**D**

Clase		S5		A3	
Gp1	**	1,15	0,27	0,01	0,01
Gp10		0,47	0,26	0,00	0,00
Gp11		0,02	0,02	0,00	0,00
Gp17	**	1,53	0,40	0,00	0,00
Gp18		0,02	0,02	0,00	0,00
Gp2		0,02	0,02	0,00	0,00
Gp22		0,04	0,04	0,00	0,00
Gp25	*	0,78	0,24	0,00	0,00
Gp3		0,41	0,13	0,94	0,18
Gp4	***	4,27	0,38	0,08	0,05
Gp5	***	2,18	0,30	0,01	0,01
Gp6	***	19,51	1,14	0,51	0,10
Gp7	***	0,83	0,12	0,00	0,00
Gp9		0,33	0,17	0,00	0,00
Actinobacteria	*	1,34	0,17	2,35	0,38
Flavobacteria	*	0,99	0,38	0,00	0,00
Sphingobacteria		1,09	0,42	0,33	0,07
Anaerolineae		0,02	0,02	0,03	0,03
Caldilineae		0,04	0,04	0,00	0,00
Cyanobacteria	***	0,30	0,14	2,89	0,25
Deinococci		0,04	0,04	0,03	0,03
Bacilli	*	3,83	0,74	7,25	0,95
Clostridia		0,61	0,18	0,20	0,08
Erysipelotrichi		0,00	0,00	0,06	0,06
Gemmatimonadetes	***	4,87	0,52	0,26	0,09
Planctomycetacia	***	5,36	0,48	16,90	0,38
Alphaproteobacteria	**	14,09	0,84	8,71	0,53
Betaproteobacteria	***	8,65	0,63	14,95	0,63
Deltaproteobacteria		3,16	0,57	1,81	0,30
Gammaproteobacteria	***	18,13	0,64	41,05	2,64
Opitutae		0,20	0,12	0,00	0,00
Spartobacteria		0,21	0,16	0,00	0,00
Subdivision3	*	0,72	0,27	0,04	0,03
Verrucomicrobiae		0,08	0,08	0,00	0,00

**E**

Clase		S6		A4	
Gp1	*	0,25	0,08	0,02	0,02
Gp10		0,12	0,04	0,28	0,06
Gp11		0,00	0,00	0,04	0,04
Gp17		0,08	0,04	0,35	0,22
Gp18		0,03	0,03	0,00	0,00
Gp25		0,06	0,06	0,03	0,03
Gp3	***	7,49	0,48	2,79	0,34
Gp4		0,63	0,11	0,75	0,28
Gp5		0,45	0,09	0,24	0,11
Gp6		4,83	0,50	3,80	0,18
Gp7		0,35	0,13	0,19	0,09
Gp9		0,09	0,09	0,00	0,00
Actinobacteria		4,10	0,82	2,58	0,38
Flavobacteria	*	0,02	0,02	0,36	0,09
Sphingobacteria	*	1,13	0,19	2,89	0,69
Anaerolineae		0,06	0,04	0,04	0,04
Caldilineae		0,06	0,04	0,01	0,01
Chloroflexi		0,12	0,11	0,07	0,04
Cyanobacteria		1,48	0,11	1,08	0,19
Bacilli	***	11,55	0,78	3,25	0,31
Clostridia		1,03	0,36	0,50	0,20
Gemmatimonadetes		0,56	0,09	1,13	0,31
Nitrospira		0,14	0,10	0,10	0,09
Planctomycetacia	***	10,51	0,50	27,90	1,57
Alphaproteobacteria		14,58	1,24	11,39	0,64
Betaproteobacteria	**	18,75	0,64	13,56	0,60
Deltaproteobacteria		6,75	0,27	5,36	0,71
Gammaproteobacteria	***	7,83	0,33	17,61	1,03
Opitutae		0,08	0,03	0,16	0,07
Spartobacteria		0,04	0,03	0,00	0,00
Subdivision3		0,29	0,09	0,36	0,08
Verrucomicrobiae		0,03	0,03	0,03	0,03

**F**

Clase		S7		A5	
Gp1		0,02	0,02	0,10	0,05
Gp10		0,31	0,12	0,61	0,18
Gp17		0,09	0,05	0,11	0,05
Gp25		0,03	0,03	0,08	0,06
Gp3	**	5,24	0,49	2,04	0,39
Gp4		0,69	0,20	1,36	0,48
Gp5		0,01	0,01	0,27	0,12
Gp6	**	2,28	0,13	6,02	0,91
Gp7	**	0,06	0,03	0,63	0,12
Gp9		0,00	0,00	0,02	0,02
Actinobacteria		6,72	0,75	5,96	0,59
Flavobacteria		0,00	0,00	0,07	0,06
Sphingobacteria		0,50	0,15	1,42	0,47
Anaerolineae		0,15	0,05	0,08	0,07
Caldilineae		0,17	0,11	0,10	0,07
Thermomicrobia		0,05	0,05	0,00	0,00
Cyanobacteria	***	2,71	0,11	6,95	0,63
Deinococci		0,00	0,00	0,03	0,03
Bacilli		6,44	0,51	4,87	0,71
Clostridia	*	0,44	0,09	1,00	0,17
Gemmatimonadetes	*	0,33	0,14	1,33	0,31
Nitrospira		0,01	0,01	0,02	0,02
Planctomycetacia		14,40	0,91	15,72	1,13
Alphaproteobacteria	*	17,44	0,56	20,54	0,93
Betaproteobacteria	***	17,77	0,42	10,76	0,56
Deltaproteobacteria	**	8,67	0,61	5,18	0,51
Gammaproteobacteria		10,53	0,69	9,95	0,67
Opitutae		0,02	0,02	0,18	0,11
Spartobacteria	*	0,04	0,02	0,25	0,07
Subdivision3	*	0,13	0,06	0,56	0,12
Subdivision5		0,00	0,00	0,00	0,00
Verrucomicrobiae		0,00	0,00	0,04	0,04

**G**

Clase		S8		A6	
Gp1		0,31	0,11	0,17	0,13
Gp10	**	1,66	0,14	0,72	0,11
Gp17	*	0,45	0,06	0,19	0,05
Gp25		0,12	0,03	0,11	0,07
Gp3	***	0,81	0,11	2,65	0,28
Gp4		2,36	0,14	2,53	0,46
Gp5		0,52	0,11	0,21	0,09
Gp6	***	21,70	0,62	15,24	0,41
Gp7		1,01	0,14	0,60	0,15
Gp9		0,03	0,01	0,01	0,01
Actinobacteria		2,03	0,48	1,33	0,27
Flavobacteria	*	0,04	0,01	0,00	0,00
Sphingobacteria	***	3,30	0,09	0,56	0,14
Anaerolineae		0,00	0,00	0,02	0,02
Caldilineae		0,03	0,03	0,25	0,23
Chloroflexi		0,00	0,00	0,04	0,04
Thermomicrobia		0,00	0,00	0,11	0,09
Cyanobacteria	***	0,06	0,03	0,59	0,04
Deinococci	*	0,14	0,05	0,00	0,00
Bacilli		2,23	0,23	3,77	0,75
Clostridia		1,93	0,17	1,30	0,44
Gemmatimonadetes	***	6,87	0,49	2,15	0,44
Nitrospira		0,34	0,04	0,35	0,06
Planctomycetacia	***	7,33	0,83	1,80	0,14
Alphaproteobacteria		36,25	1,27	32,45	1,68
Betaproteobacteria	***	1,41	0,11	13,62	1,14
Deltaproteobacteria	*	2,20	0,47	5,15	0,68
Gammaproteobacteria	***	0,83	0,14	9,62	0,67
Opitutae		1,05	0,39	0,68	0,12
Spartobacteria		0,32	0,12	0,07	0,06
Subdivision3		1,37	0,20	0,95	0,24
Verrucomicrobiae		0,18	0,10	0,05	0,02

**H**

Clase		S9		A7	
Gp1		0,10	0,04	0,08	0,03
Gp10	**	1,55	0,21	0,31	0,07
Gp11		0,00	0,00	0,03	0,02
Gp17		0,94	0,42	0,62	0,17
Gp18		0,00	0,00	0,16	0,14
Gp25		0,10	0,07	0,13	0,09
Gp3	**	1,28	0,26	3,45	0,32
Gp4		1,39	0,23	1,66	0,30
Gp5		0,20	0,07	0,18	0,06
Gp6		11,91	2,42	11,68	0,35
Gp7		1,45	0,35	0,90	0,25
Gp9		0,00	0,00	0,03	0,02
Actinobacteria	**	6,17	0,39	3,73	0,49
Sphingobacteria	**	0,88	0,17	0,14	0,07
Anaerolineae		0,00	0,00	0,06	0,05
Caldilineae		0,04	0,03	0,08	0,03
Chloroflexi		0,04	0,04	0,05	0,02
Thermomicrobia	*	0,00	0,00	0,04	0,01
Cyanobacteria		0,17	0,09	0,19	0,03
Deinococci		0,28	0,13	0,14	0,02
Bacilli		10,12	2,58	10,62	0,34
Clostridia	**	0,62	0,01	2,12	0,27
Gemmatimonadetes		2,80	0,95	1,76	0,16
Nitrospira		0,13	0,11	0,21	0,13
Planctomycetacia	**	3,83	0,46	1,14	0,25
Alphaproteobacteria		35,26	2,00	31,74	0,84
Betaproteobacteria	**	4,82	1,21	12,65	0,83
Deltaproteobacteria		6,52	1,81	5,36	0,72
Gammaproteobacteria	**	2,33	0,61	5,89	0,29
Opitutae		0,31	0,05	0,59	0,17
Spartobacteria		0,07	0,07	0,09	0,06
Subdivision3		0,64	0,33	0,77	0,11
Subdivision5		0,00	0,00	0,00	0,00
Verrucomicrobiae		0,04	0,03	0,24	0,21

Clase		S10		A8	
Gp1		0,07	0,03	0,35	0,27
Gp10	***	0,41	0,08	1,05	0,06
Gp15		0,00	0,00	0,02	0,02
Gp17		0,44	0,14	0,82	0,49
Gp18		0,02	0,02	0,00	0,00
Gp22		0,00	0,00	0,06	0,06
Gp25		0,17	0,04	0,33	0,07
Gp3		1,38	0,38	0,70	0,11
Gp4	*	5,13	0,82	2,30	0,31
Gp5		0,51	0,28	0,78	0,38
Gp6	***	39,90	0,94	26,52	1,08
Gp7		1,83	0,25	2,12	0,60
Gp9		0,07	0,07	0,28	0,10
Actinobacteria	**	0,38	0,09	2,24	0,33
Flavobacteria		0,00	0,00	0,04	0,04
Sphingobacteria	**	3,90	0,62	0,87	0,16
Anaerolineae		0,02	0,02	0,00	0,00
Cyanobacteria	*	0,32	0,12	0,03	0,03
Deinococci		0,23	0,11	0,08	0,04
Bacilli		1,38	0,24	2,88	0,65
Clostridia	***	0,67	0,10	3,47	0,45
Gemmatimonadetes		5,41	0,31	6,00	0,81
Nitrospira		0,46	0,12	0,26	0,12
Planctomycetacia	*	1,68	0,21	4,45	0,76
Alphaproteobacteria	***	18,92	0,72	27,54	0,62
Betaproteobacteria		6,91	0,37	6,62	0,67
Deltaproteobacteria		2,16	0,45	1,90	0,36
Gammaproteobacteria		1,91	0,27	2,84	0,52
Opitutae		0,36	0,09	0,73	0,25
Spartobacteria		0,06	0,02	0,08	0,04
Subdivision3		1,00	0,13	0,90	0,26
Verrucomicrobiae		0,03	0,02	0,12	0,03

**Tabla 56. Composición de las clases bacterianas de suelo control (suelo S) y suelo tratado con lodo aerobio (suelo A) en cada uno de los muestreos.**

Cada tabla (A-I) corresponde a un muestreo, del 0 al 8 en el que el primer suelo control corresponde a S2, donde se presentan las medias (n=4) de los valores de abundancia porcentual con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar se representa en las columnas adyacentes (color blanco). Los grados de significación de las diferencias entre las tasas porcentuales de consumo se indican con asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) correspondientes a  $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ;  $P<0,001$ ; respectivamente.

Filos		S2		N0	
Acidobacteria	***	40,66	0,86	19,10	1,24
Actinobacteria	*	2,62	0,35	1,41	0,27
Bacteroidetes		0,79	0,12	1,13	0,28
Chloroflexi	**	0,25	0,09	2,93	0,49
Cyanobacteria		0,02	0,02	0,14	0,06
Deinococcus-Thermus		0,34	0,12	0,07	0,03
Firmicutes	***	3,03	0,11	19,79	0,37
Gemmatimonadetes	**	7,16	0,86	2,32	0,26
Nitrospira		0,36	0,10	0,25	0,14
Planctomycetes		1,86	0,46	1,00	0,28
Proteobacteria	***	39,11	0,59	50,14	0,64
Synergistetes	*	0,00	0,00	0,72	0,24
Verrucomicrobia	**	3,66	0,50	0,96	0,17

Filos		S3		N1	
Acidobacteria	**	13,80	1,69	6,07	0,52
Actinobacteria		6,46	0,24	6,28	0,68
Bacteroidetes		3,07	0,57	1,95	0,46
Chloroflexi		0,44	0,11	0,67	0,13
Cyanobacteria	**	0,77	0,19	0,00	0,00
Deinococcus-Thermus	*	0,05	0,05	0,37	0,08
Firmicutes	***	7,11	1,13	37,18	2,80
Gemmatimonadetes		2,01	0,57	3,29	0,46
Nitrospira		0,07	0,05	0,17	0,02
Planctomycetes	***	13,47	1,44	0,75	0,28
Proteobacteria	**	50,94	0,40	42,26	2,02
Synergistetes		0,00	0,00	0,08	0,05
Verrucomicrobia		1,68	0,37	0,83	0,14

Filos		S4		N2	
Acidobacteria	***	11,20	1,08	20,55	0,49
Actinobacteria	**	7,75	1,04	3,22	0,39
Bacteroidetes	**	2,84	0,45	0,27	0,11
Chloroflexi		0,32	0,14	0,19	0,08
Cyanobacteria	**	1,82	0,35	0,00	0,00
Deinococcus-Thermus	***	0,05	0,02	0,62	0,06
Firmicutes	***	6,38	0,91	16,53	1,06
Gemmatimonadetes	*	1,72	0,16	4,34	0,76
Nitrospira	*	0,02	0,02	1,08	0,35
Planctomycetes	***	25,47	0,96	2,16	0,30
Proteobacteria	**	41,62	1,39	49,44	1,39
Verrucomicrobia		0,81	0,17	1,56	0,29

Filos		S5		N3	
Acidobacteria	***	31,95	0,78	10,47	0,73
Actinobacteria	***	1,34	0,17	4,95	0,52
Bacteroidetes		2,12	0,80	2,06	0,14
Chloroflexi		0,09	0,09	0,31	0,12
Cyanobacteria		0,30	0,14	0,10	0,02
Deinococcus-Thermus		0,04	0,04	0,09	0,05
Firmicutes	*	4,94	0,46	6,36	0,32
Gemmatimonadetes	*	4,87	0,52	2,26	0,53
Nitrospira	**	0,00	0,00	0,14	0,03
Planctomycetes	***	5,36	0,48	27,67	2,05
Proteobacteria		47,55	1,17	44,71	1,17
Verrucomicrobia		1,30	0,40	0,80	0,16

Filos		S6		N4	
Acidobacteria	***	14,54	0,91	7,91	0,30
Actinobacteria		4,10	0,82	2,15	0,25
Bacteroidetes	*	1,53	0,09	2,09	0,12
Chloroflexi		0,49	0,21	0,15	0,07
Cyanobacteria	***	1,48	0,11	0,24	0,10
Deinococcus-Thermus	***	0,00	0,00	0,10	0,01
Firmicutes	***	13,13	0,53	3,34	0,35
Gemmatimonadetes	*	0,56	0,09	1,04	0,14
Nitrospira		0,14	0,10	0,16	0,03
Planctomycetes	***	10,51	0,50	4,83	0,53
Proteobacteria	***	52,91	1,45	76,75	0,25
Verrucomicrobia		0,48	0,15	1,17	0,26

Filos		S7		N5	
Acidobacteria	**	8,74	0,51	14,07	0,86
Actinobacteria		6,72	0,75	4,87	0,38
Bacteroidetes	***	0,53	0,12	3,40	0,44
Chloroflexi		0,71	0,13	0,77	0,22
Cyanobacteria	***	2,71	0,11	0,24	0,10
Deinococcus-Thermus		0,00	0,00	0,07	0,04
Firmicutes		7,22	0,47	7,60	0,71
Gemmatimonadetes	**	0,33	0,14	1,73	0,29
Nitrospira		0,01	0,01	0,65	0,36
Planctomycetes	**	14,40	0,91	18,32	0,20
Proteobacteria	***	58,36	0,39	46,66	1,54
Verrucomicrobia	**	0,22	0,11	1,56	0,33

Filos		S8		N6	
Acidobacteria	***	29,28	0,60	23,29	0,68
Actinobacteria		2,03	0,48	1,82	0,26
Bacteroidetes	***	3,36	0,10	0,88	0,22
Chloroflexi	*	0,04	0,03	0,22	0,06
Cyanobacteria		0,06	0,03	0,17	0,12
Deinococcus-Thermus		0,14	0,05	0,31	0,09
Firmicutes	***	4,48	0,22	8,30	0,30
Gemmatimonadetes	***	6,87	0,49	3,70	0,19
Nitrospira		0,34	0,04	0,37	0,18
Planctomycetes	**	7,33	0,83	2,14	0,57
Proteobacteria	***	42,48	1,13	56,83	2,08
Verrucomicrobia		3,57	0,70	1,95	0,10

Filos		S9		N7	
Acidobacteria		19,06	2,81	24,00	1,47
Actinobacteria	**	6,17	0,39	3,48	0,52
Bacteroidetes		0,97	0,19	0,59	0,04
Chloroflexi		0,18	0,09	0,51	0,16
Cyanobacteria		0,17	0,09	0,60	0,23
Deinococcus-Thermus		0,28	0,13	0,79	0,25
Firmicutes		10,94	2,54	10,47	0,78
Gemmatimonadetes		2,80	0,95	4,96	0,29
Nitrospira	*	0,13	0,11	0,61	0,07
Planctomycetes		3,83	0,46	2,73	0,56
Proteobacteria	*	54,15	2,34	47,35	0,61
Verrucomicrobia	*	1,26	0,33	3,85	0,85

Filos		S10		N8	
<i>Acidobacteria</i>	***	50,55	0,43	36,30	0,86
<i>Actinobacteria</i>	**	0,38	0,09	1,53	0,17
<i>Bacteroidetes</i>	**	4,03	0,61	1,59	0,19
<i>Chloroflexi</i>		0,04	0,02	0,11	0,11
<i>Cyanobacteria</i>		0,32	0,12	0,06	0,02
<i>Deinococcus-Thermus</i>		0,23	0,11	0,20	0,09
<i>Firmicutes</i>	***	2,29	0,28	9,05	0,70
<i>Gemmatimonadetes</i>		5,41	0,31	4,76	0,72
<i>Nitrospira</i>		0,46	0,12	0,28	0,09
<i>Planctomycetes</i>		1,68	0,21	2,04	0,38
<i>Proteobacteria</i>	***	32,85	0,53	41,52	0,70
<i>Verrucomicrobia</i>		1,64	0,17	2,43	0,90

**Tabla 57. Composición de los filos bacterianos de suelo control (suelo S) y suelo tratado con lodo anaerobio (suelo N) en cada uno de los muestreos.**

Cada tabla (A-I) corresponde a un muestreo, del 0 al 8 en el que el primer suelo control corresponde a S2, donde se presentan las medias (n=4) de los valores de abundancia porcentual con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar se representa en las columnas adyacentes (color blanco). Los grados de significación de las diferencias entre las tasas porcentuales de consumo se indican con asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) correspondientes a  $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ;  $P<0,001$ ; respectivamente.

**A**

Clase		S2		N0	
Gp1	**	0,76	0,12	0,07	0,05
Gp10	**	0,90	0,12	0,24	0,11
Gp17		1,43	0,38	0,42	0,19
Gp25		0,35	0,23	0,14	0,12
Gp3		0,60	0,16	0,69	0,14
Gp4	**	4,82	0,68	1,22	0,16
Gp5	**	1,20	0,15	0,43	0,10
Gp6	***	28,30	1,76	12,74	1,22
Gp7	*	1,66	0,23	2,61	0,22
Gp9		0,16	0,06	0,23	0,07
Actinobacteria	*	2,62	0,35	1,41	0,27
Bacteroidia	*	0,00	0,00	0,11	0,03
Sphingobacteria	**	0,69	0,11	0,11	0,07
Anaerolineae	**	0,06	0,04	2,91	0,50
Caldilineae		0,07	0,07	0,00	0,00
Cyanobacteria		0,02	0,02	0,14	0,06
Deinococci		0,34	0,12	0,07	0,03
Bacilli	**	1,31	0,23	3,89	0,57
Clostridia	***	1,07	0,07	15,00	0,44
Erysipelotrichi	**	0,00	0,00	0,23	0,05
Gemmatimonadetes	**	7,16	0,86	2,32	0,26
Nitrospira		0,36	0,10	0,25	0,14
Planctomycetacia		1,86	0,46	1,00	0,28
Alphaproteobacteria	***	31,59	0,28	23,33	1,21
Betaproteobacteria	***	2,47	0,44	11,58	1,17
Deltaproteobacteria	**	1,51	0,24	3,51	0,45
Epsilonproteobacteria	***	0,00	0,00	2,37	0,37
Gammaproteobacteria	***	1,20	0,21	8,48	0,38
Synergistia	*	0,00	0,00	0,72	0,24
Opitutae		1,10	0,48	0,32	0,06
Spartobacteria		0,23	0,11	0,08	0,03
Subdivision3	*	1,54	0,30	0,43	0,07
Verrucomicrobiae		0,09	0,04	0,01	0,01

**B**

Clase		S3		N1	
Gp10		0,16	0,09	0,15	0,07
Gp17		0,08	0,03	0,00	0,00
Gp18	*	0,00	0,00	0,05	0,02
Gp4		1,13	0,44	0,33	0,08
Gp5		0,08	0,06	0,03	0,02
Gp6	*	7,82	1,11	3,67	0,33
Gp7		0,40	0,04	0,34	0,15
Gp9		0,03	0,03	0,00	0,00
Actinobacteria		6,46	0,24	6,28	0,68
Bacteroidia		0,00	0,00	0,04	0,02
Flavobacteria		0,09	0,03	0,03	0,03
Sphingobacteria		2,39	0,54	1,23	0,27
Anaerolineae		0,11	0,08	0,54	0,16
Caldilineae	**	0,17	0,02	0,03	0,02
Cyanobacteria	**	0,77	0,19	0,00	0,00
Deinococci	*	0,05	0,05	0,37	0,08
Bacilli	**	6,30	0,97	25,59	3,39
Clostridia	***	0,57	0,15	11,32	0,85
Erysipelotrichi		0,00	0,00	0,10	0,06
Gemmatimonadetes		2,01	0,57	3,29	0,46
Nitrospira		0,07	0,05	0,17	0,02
Planctomycetacia	***	13,47	1,44	0,75	0,28
Alphaproteobacteria	***	19,02	0,95	27,55	0,32
Betaproteobacteria	*	13,98	0,74	7,61	1,68
Deltaproteobacteria	***	5,96	0,56	0,80	0,09
Epsilonproteobacteria		0,00	0,00	0,12	0,06
Gammaproteobacteria	*	8,27	0,64	5,69	0,55
Spartobacteria		0,12	0,10	0,07	0,04
Subdivision3		0,96	0,28	0,69	0,13
Subdivision5		0,00	0,00	0,03	0,03

**C**

Clase		S4		N2	
Gp10	*	0,05	0,03	0,44	0,10
Gp4	**	1,02	0,12	2,03	0,18
Gp5		0,22	0,16	0,16	0,04
Gp6	***	5,79	0,77	15,55	0,54
Gp7		0,39	0,13	0,44	0,04
Gp9		0,18	0,11	0,04	0,01
Actinobacteria	**	7,75	1,04	3,22	0,39
Anaerolineae		0,12	0,06	0,03	0,03
Caldilineae		0,11	0,05	0,02	0,02
Cyanobacteria	**	1,82	0,35	0,00	0,00
Deinococci	***	0,05	0,02	0,62	0,06
Bacilli	*	5,60	0,89	2,57	0,25
Clostridia	***	0,40	0,09	13,74	1,33
Gemmatimonadetes	*	1,72	0,16	4,34	0,76
Nitrospira	*	0,02	0,02	1,08	0,35
Alphaproteobacteria	***	18,10	1,07	40,11	0,75
Betaproteobacteria	***	10,13	0,34	1,87	0,19
Deltaproteobacteria	**	4,75	0,59	1,30	0,20
Spartobacteria		0,03	0,03	0,14	0,12
Subdivision3	*	0,47	0,20	1,25	0,18

**D**

Clase		S5		N3	
Gp1	**	1,15	0,27	0,04	0,04
Gp10		0,47	0,26	0,18	0,08
Gp11		0,02	0,02	0,00	0,00
Gp17	*	1,53	0,40	0,22	0,05
Gp18		0,02	0,02	0,02	0,02
Gp2		0,02	0,02	0,00	0,00
Gp22		0,04	0,04	0,00	0,00
Gp25	*	0,78	0,24	0,00	0,00
Gp3	**	0,41	0,13	1,66	0,25
Gp4	***	4,27	0,38	1,03	0,21
Gp5	***	2,18	0,30	0,19	0,08
Gp6	***	19,51	1,14	6,49	0,93
Gp7		0,83	0,12	0,54	0,12
Gp9		0,33	0,17	0,01	0,01
Actinobacteria	***	1,34	0,17	4,95	0,52
Flavobacteria	*	0,99	0,38	0,01	0,01
Sphingobacteria		1,09	0,42	1,28	0,29
Anaerolineae		0,02	0,02	0,02	0,02
Caldilineae		0,04	0,04	0,09	0,07
Cyanobacteria		0,30	0,14	0,10	0,02
Deinococci		0,04	0,04	0,09	0,05
Bacilli		3,83	0,74	4,53	0,24
Clostridia	*	0,61	0,18	1,67	0,22
Gemmatimonadetes	*	4,87	0,52	2,26	0,53
Nitrospira	**	0,00	0,00	0,14	0,03
Planctomycetacia	***	5,36	0,48	27,67	2,05
Alphaproteobacteria	*	14,09	0,84	17,97	0,67
Betaproteobacteria		8,65	0,63	8,19	0,75
Deltaproteobacteria		3,16	0,57	3,58	0,12
Gammaproteobacteria	***	18,13	0,64	12,11	0,49
Opitutae		0,20	0,12	0,09	0,07
Spartobacteria		0,21	0,16	0,10	0,05
Subdivision3		0,72	0,27	0,59	0,12
Verrucomicrobiae		0,08	0,08	0,01	0,01

**E**

Clase		S6		N4	
Gp1		0,25	0,08	0,12	0,08
Gp10		0,12	0,04	0,18	0,12
Gp11		0,00	0,00	0,05	0,03
Gp17		0,08	0,04	0,02	0,02
Gp18		0,03	0,03	0,00	0,00
Gp25		0,06	0,06	0,07	0,05
Gp3	***	7,49	0,48	1,06	0,14
Gp4		0,63	0,11	0,82	0,31
Gp5		0,45	0,09	0,21	0,06
Gp6		4,83	0,50	5,23	0,60
Gp7		0,35	0,13	0,13	0,08
Gp9		0,09	0,09	0,00	0,00
Actinobacteria		4,10	0,82	2,15	0,25
Flavobacteria		0,02	0,02	0,19	0,08
Sphingobacteria		1,13	0,19	1,61	0,11
Anaerolineae		0,06	0,04	0,03	0,03
Caldilineae		0,06	0,04	0,05	0,05
Chloroflexi		0,12	0,11	0,01	0,01
Cyanobacteria	***	1,48	0,11	0,24	0,10
Deinococci	***	0,00	0,00	0,10	0,01
Bacilli	***	11,55	0,78	1,55	0,25
Clostridia		1,03	0,36	1,63	0,17
Gemmatimonadetes	*	0,56	0,09	1,04	0,14
Nitrospira		0,14	0,10	0,16	0,03
Planctomycetacia	***	10,51	0,50	4,83	0,53
Alphaproteobacteria	*	14,58	1,24	19,61	0,89
Betaproteobacteria	***	18,75	0,64	29,67	1,24
Deltaproteobacteria	***	6,75	0,27	1,39	0,24
Gammaproteobacteria	***	7,83	0,33	25,01	1,24
Opitutae		0,08	0,03	0,06	0,04
Spartobacteria		0,04	0,03	0,01	0,01
Subdivision3	*	0,29	0,09	1,02	0,21
Verrucomicrobiae		0,03	0,03	0,01	0,01

**F**

Clase		S7		N5	
Gp1		0,02	0,02	0,09	0,05
Gp10	*	0,31	0,12	0,88	0,17
Gp15		0,00	0,00	0,26	0,26
Gp17		0,09	0,05	0,24	0,09
Gp25		0,03	0,03	0,20	0,13
Gp3	***	5,24	0,49	1,44	0,21
Gp4		0,69	0,20	0,97	0,23
Gp5		0,01	0,01	0,15	0,07
Gp6	***	2,28	0,13	9,24	1,03
Gp7	*	0,06	0,03	0,51	0,14
Gp9		0,00	0,00	0,04	0,04
Actinobacteria		6,72	0,75	4,87	0,38
Sphingobacteria	*	0,50	0,15	1,99	0,45
Anaerolineae		0,15	0,05	0,03	0,03
Caldilineae		0,17	0,11	0,00	0,00
Thermomicrobia		0,05	0,05	0,14	0,14
Cyanobacteria	***	2,71	0,11	0,24	0,10
Deinococci		0,00	0,00	0,07	0,04
Bacilli	**	6,44	0,51	3,48	0,33
Clostridia	***	0,44	0,09	3,88	0,46
Gemmatimonadetes	**	0,33	0,14	1,73	0,29
Nitrospira		0,01	0,01	0,65	0,36
Planctomycetacia	**	14,40	0,91	18,32	0,20
Alphaproteobacteria	**	17,44	0,56	23,20	0,81
Betaproteobacteria	***	17,77	0,42	8,36	0,27
Deltaproteobacteria	***	8,67	0,61	3,49	0,40
Gammaproteobacteria		10,53	0,69	8,81	0,97
Opitutae		0,02	0,02	0,15	0,07
Spartobacteria		0,04	0,02	0,11	0,06
Subdivision3	*	0,13	0,06	1,00	0,25

**G**

Clase		S8		N6	
Gp1		0,31	0,11	0,08	0,04
Gp10		1,66	0,14	2,14	0,24
Gp17	**	0,45	0,06	0,09	0,04
Gp25		0,12	0,03	0,20	0,14
Gp3		0,81	0,11	1,69	0,58
Gp4		2,36	0,14	2,20	0,33
Gp5	*	0,52	0,11	0,11	0,07
Gp6	***	21,70	0,62	15,20	0,17
Gp7		1,01	0,14	1,47	0,27
Gp9		0,03	0,01	0,00	0,00
Actinobacteria		2,03	0,48	1,82	0,26
Flavobacteria	*	0,04	0,01	0,00	0,00
Sphingobacteria	***	3,30	0,09	0,65	0,15
Anaerolineae		0,00	0,00	0,02	0,02
Caldilineae		0,03	0,03	0,03	0,03
Chloroflexi		0,00	0,00	0,02	0,02
Thermomicrobia		0,00	0,00	0,03	0,02
Cyanobacteria		0,06	0,03	0,17	0,12
Deinococci		0,14	0,05	0,31	0,09
Bacilli		2,23	0,23	2,51	0,25
Clostridia	***	1,93	0,17	5,44	0,21
Gemmatimonadetes	***	6,87	0,49	3,70	0,19
Nitrospira		0,34	0,04	0,37	0,18
Planctomycetacia	**	7,33	0,83	2,14	0,57
Alphaproteobacteria	**	36,25	1,27	49,17	2,68
Betaproteobacteria		1,41	0,11	2,20	0,70
Deltaproteobacteria		2,20	0,47	2,15	0,30
Gammaproteobacteria		0,83	0,14	1,68	0,34
Opitutae		1,05	0,39	0,19	0,08
Spartobacteria		0,32	0,12	0,07	0,04
Subdivision3		1,37	0,20	1,45	0,11
Verrucomicrobiae		0,18	0,10	0,03	0,02

**H**

Clase		S9		N7	
Gp1		0,10	0,04	0,12	0,11
Gp10	*	1,55	0,21	2,52	0,22
Gp15		0,00	0,00	0,03	0,03
Gp17		0,94	0,42	0,33	0,11
Gp25		0,10	0,07	0,38	0,31
Gp3		1,28	0,26	1,43	0,34
Gp4		1,39	0,23	2,01	0,22
Gp5		0,20	0,07	0,30	0,10
Gp6		11,91	2,42	15,78	1,06
Gp7		1,45	0,35	0,87	0,19
Gp9		0,00	0,00	0,09	0,06
Actinobacteria	**	6,17	0,39	3,48	0,52
Flavobacteria		0,00	0,00	0,03	0,03
Sphingobacteria		0,88	0,17	0,46	0,05
Anaerolineae		0,00	0,00	0,07	0,04
Caldilineae		0,04	0,03	0,16	0,12
Chloroflexi		0,04	0,04	0,00	0,00
Thermomicrobia		0,00	0,00	0,10	0,05
Cyanobacteria		0,17	0,09	0,60	0,23
Deinococci		0,28	0,13	0,79	0,25
Bacilli	*	10,12	2,58	2,73	0,25
Clostridia	***	0,62	0,01	7,47	0,55
Gemmatimonadetes	**	2,80	0,95	4,96	0,29
Nitrospira	*	0,13	0,11	0,61	0,07
Planctomycetacia		3,83	0,46	2,73	0,56
Alphaproteobacteria		35,26	2,00	38,69	1,46
Betaproteobacteria		4,82	1,21	2,97	0,67
Deltaproteobacteria	*	6,52	1,81	1,90	0,27
Gammaproteobacteria		2,33	0,61	2,03	0,49
Opitutae		0,31	0,05	0,74	0,37
Spartobacteria		0,07	0,07	0,14	0,05
Subdivision3	*	0,64	0,33	2,23	0,55
Verrucomicrobiae	*	0,04	0,03	0,47	0,12

Clase		S10		N8	
Gp1		0,07	0,03	0,04	0,04
Gp10	***	0,41	0,08	3,54	0,39
Gp11		0,00	0,00	0,06	0,05
Gp17		0,44	0,14	0,80	0,18
Gp18		0,02	0,02	0,05	0,03
Gp2		0,00	0,00	0,02	0,02
Gp22		0,00	0,00	0,08	0,07
Gp25	*	0,17	0,04	0,03	0,02
Gp3		1,38	0,38	0,86	0,14
Gp4		5,13	0,82	3,66	0,24
Gp5		0,51	0,28	0,55	0,14
Gp6	***	39,90	0,94	25,31	0,36
Gp7	*	1,83	0,25	0,93	0,19
Gp9		0,07	0,07	0,14	0,04
Actinobacteria	**	0,38	0,09	1,53	0,17
Flavobacteria		0,00	0,00	0,02	0,02
Sphingobacteria	**	3,90	0,62	1,45	0,18
Anaerolineae		0,02	0,02	0,00	0,00
Caldilineae		0,00	0,00	0,02	0,02
Cyanobacteria		0,32	0,12	0,06	0,02
Deinococci		0,23	0,11	0,20	0,09
Bacilli		1,38	0,24	1,70	0,34
Clostridia	***	0,67	0,10	6,86	0,64
Gemmatimonadetes		5,41	0,31	4,76	0,72
Nitrospira		0,46	0,12	0,28	0,09
Planctomycetacia		1,68	0,21	2,04	0,38
Alphaproteobacteria	***	18,92	0,72	34,10	0,95
Betaproteobacteria	***	6,91	0,37	2,56	0,59
Deltaproteobacteria		2,16	0,45	1,29	0,22
Gammaproteobacteria		1,91	0,27	1,91	0,17
Opitutae	*	0,36	0,09	1,16	0,23
Spartobacteria		0,06	0,02	0,16	0,15
Subdivision3		1,00	0,13	0,79	0,36
Verrucomicrobiae		0,03	0,02	0,24	0,15

**Tabla 58. Composición de las clases bacterianas de suelo control (suelo S) y suelo tratado con lodo anaerobio (suelo N) en cada uno de los muestreos.**

Cada tabla (A-I) corresponde a un muestreo, del 0 al 8 en el que el primer suelo control corresponde a S2, donde se presentan las medias (n=4) de los valores de abundancia porcentual con un gradiente de color (de menor a mayor: azules, amarillos y rojos). El error estándar se representa en las columnas adyacentes (color blanco). Los grados de significación de las diferencias entre las tasas porcentuales de consumo se indican con asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) correspondientes a  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$ ; respectivamente.



## ANEXO 4. Análisis de correlaciones

	C <sub>org</sub>	Lp1	Lp2	R	C <sub>sol</sub>	P	pH	Conductividad	N Total	Amonio	Nitrito	Estabilidad agregado	Porosidad	WHC	Humedad suelo	Temp. media	Humedad atmosférica	Precipitación
Á. protocatéquico	-0,40	-0,38	-0,40	-0,28	-0,16	-0,13	0,23	-0,18	-0,24	-0,03	-0,12	-0,37	-0,69	-0,20	0,22	0,01	0,12	0,02
Á. cítrico	-0,32	-0,32	-0,32	-0,32	-0,23	-0,13	0,26	-0,16	-0,41	-0,17	-0,04	-0,33	-0,20	0,32	-0,02	0,02	0,12	0,10
Á. oxálico	-0,26	-0,20	-0,13	-0,18	-0,04	-0,08	0,13	-0,10	-0,16	0,03	0,01	-0,49	-0,63	0,01	0,09	0,03	0,03	0,16
Á. málico	-0,51	-0,23	-0,36	-0,44	-0,27	-0,16	0,39	-0,20	-0,42	-0,12	0,09	-0,62	-0,53	-0,07	-0,14	-0,06	0,01	-0,03
Arginina	0,28	0,11	0,05	0,20	0,10	0,04	-0,22	0,19	0,16	-0,08	-0,21	0,51	0,49	0,44	0,21	-0,09	0,09	-0,08
Alanina	0,27	0,10	0,25	0,31	0,25	0,15	-0,21	0,16	0,30	0,08	-0,06	0,23	0,33	-0,29	-0,04	0,11	-0,15	-0,02
GABA	0,07	0,12	0,12	0,01	0,02	0,10	0,01	0,07	0,09	0,03	0,04	0,10	0,39	-0,23	-0,16	0,09	-0,13	-0,11
Lisina	0,05	0,07	0,00	0,02	-0,09	0,04	-0,04	0,14	0,04	-0,08	-0,05	0,15	0,29	0,03	0,05	-0,08	0,08	-0,09
Trehalosa	0,26	0,34	0,27	0,20	0,07	0,07	-0,23	0,07	0,15	0,00	0,09	0,59	0,53	0,21	-0,08	-0,01	-0,05	-0,08
NAG	0,14	0,14	0,07	0,13	-0,03	0,12	-0,24	0,17	0,15	0,05	-0,04	0,21	0,20	0,52	0,39	-0,34	0,38	0,14
Galactosa	0,17	0,22	0,21	0,12	0,06	0,07	-0,16	0,04	0,06	0,06	0,02	0,12	0,44	0,03	-0,11	0,08	-0,11	-0,01
Arabinosa	0,28	0,26	0,24	0,19	0,13	0,01	-0,05	0,10	0,19	0,02	0,33	0,22	0,47	-0,28	-0,29	0,10	-0,21	-0,16
Fructosa	0,34	0,26	0,41	0,30	0,37	0,17	-0,34	0,23	0,31	0,24	0,07	0,12	0,44	-0,09	-0,21	0,14	-0,32	-0,01
Glucosa	0,37	0,06	0,22	0,29	0,15	0,08	0,01	-0,07	0,22	0,12	-0,03	0,19	0,38	-0,25	-0,13	0,06	-0,11	0,01
RB	0,47	0,29	0,48	0,43	0,48	0,36	-0,53	0,28	0,55	0,51	-0,04	0,09	0,44	0,01	0,14	0,02	0,18	0,41
Biomasa	0,64	0,37	0,62	0,65	0,48	0,40	-0,64	0,32	0,78	0,59	-0,18	0,26	0,40	-0,13	0,32	-0,08	0,22	0,46

Tabla 59. Matriz de correlaciones de *Pearson* de las variables edáficas y ambientales frente a las tasas de consumo, respiración basal y biomasa microbiana.

Coefficientes *r* de *Pearson*, el nivel de significación  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ ; se representan respectivamente en verde, amarillo y naranja.



	C <sub>org</sub>	Lp1	C <sub>sol</sub>	P	pH	Conductividad	C/N	N Total	Amonio	Nitrato	WHC	T. media	Humedad atmosférica	Precipitación
<i>Acidobacteria</i>	-0,16	-0,11	0,09	-0,20	0,26	-0,07	0,14	-0,20	0,00	0,01	0,52	-0,23	0,43	0,14
<i>Actinobacteria</i>	0,04	-0,06	0,07	0,26	-0,20	0,21	0,11	0,04	-0,01	0,04	-0,43	0,25	-0,28	-0,08
<i>Bacteroidetes</i>	0,28	0,01	-0,01	0,24	-0,11	-0,04	-0,15	0,21	0,05	0,02	-0,19	0,43	-0,47	-0,11
<i>Chloroflexi</i>	0,22	0,07	0,10	0,14	-0,35	0,06	-0,06	0,26	0,34	-0,11	-0,01	0,14	0,02	0,38
<i>Cyanobacteria</i>	-0,18	-0,02	-0,11	-0,06	-0,05	-0,11	0,02	-0,24	-0,05	-0,05	-0,31	0,20	-0,33	-0,15
<i>Deinococcus-Thermus</i>	-0,02	0,14	0,08	0,12	-0,43	0,44	0,40	0,17	-0,01	0,55	0,39	-0,04	0,14	0,02
<i>Firmicutes</i>	0,10	-0,01	0,12	0,44	-0,38	0,60	0,48	0,32	0,29	0,43	0,05	0,05	0,01	0,09
<i>Gemmatimonadetes</i>	-0,10	0,09	0,43	0,03	0,04	0,20	0,20	0,14	0,21	0,33	0,17	-0,11	0,30	0,10
<i>Nitrospira</i>	0,02	0,41	0,05	0,18	-0,35	0,26	0,23	0,23	0,23	0,50	0,58	0,10	-0,14	-0,08
<i>Planctomycetes</i>	-0,11	-0,08	-0,15	-0,15	0,07	-0,25	-0,25	-0,19	-0,19	-0,25	-0,47	0,11	-0,42	-0,27
<i>Proteobacteria</i>	0,15	0,15	-0,20	-0,02	-0,02	-0,18	-0,35	0,07	-0,11	-0,21	-0,31	0,03	-0,15	-0,06
<i>Synergistetes</i>	0,73	0,00	0,26	0,45	-0,39	-0,07	-0,24	0,74	0,98	-0,15	-0,26	0,00	0,50	
<i>Verrucomicrobia</i>	0,28	0,15	-0,06	-0,11	-0,07	-0,14	-0,21	0,20	-0,13	-0,11	0,02	0,00	0,20	0,29

Tabla 60. Matriz de correlaciones de *Pearson* de las variables edáficas y ambientales frente a la abundancia relativa de los filos bacterianos. Coeficientes *r* de *Pearson*, el nivel de significación  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ ; se representan respectivamente en verde, amarillo y naranja.

	C <sub>org</sub>	Lp1	Lp2	R	C <sub>sol</sub>	P	pH	Conductividad	C/N	N Total	Amonio	Nitrito	Nitrato	Estabilidad agregado	Porosidad	WHC	Humedad suelo	T. media	Humedad atmosférica	Precipitación
Gp1	-0,40	-0,18	-0,33	-0,25	0,04	-0,09	0,39	-0,03	0,17	-0,23	0,03	0,06	0,12	-0,55	-0,50	-0,25	0,07	-0,07	0,11	0,22
Gp10	0,20	0,24	0,05	0,10	-0,01	-0,08	-0,08	-0,02	0,01	0,04	-0,09	0,35	-0,06	0,18	0,00	0,53	-0,27	0,06	0,02	-0,09
Gp17	-0,43	-0,12	-0,22	-0,39	0,38	-0,40	0,35	-0,03	-0,01	-0,42	-0,07	-0,12	-0,22	-0,67	-0,24	-0,24	0,23	-0,40	0,52	0,06
Gp11	-0,26	-0,15	-0,18	-0,41	0,65	-0,28	0,31	0,45	0,44	-0,45	-0,12	0,19	0,32	-0,22	0,56	-0,18	-0,07	-0,29	0,37	-0,16
Gp16	-0,25	0,21	-0,12	-0,27	-0,41	-0,11	0,37	-0,21	0,01	-0,41	0,03	0,32	0,13				0,10	-0,49	0,10	-0,19
Gp17	0,35	-0,36	-0,09	-0,03	0,26	0,23	-0,01	0,53	0,62	0,12	0,35	0,36	0,37	-1,00	-0,77	0,93	0,47	-0,22	0,59	0,32
Gp18	-0,10	-0,10	-0,04	-0,04	0,00	0,26	-0,05	0,10	0,04	0,07	0,25	-0,18	-0,02	-0,33	0,13	0,24	0,31	-0,18	0,37	0,27
Gp19	-0,48	0,17	0,29	-0,50	0,84	-0,53	0,22	0,58							-0,04	-0,32	0,12	-0,23	0,48	-0,15
Gp2	-0,06	0,14	-0,24	0,23	-0,10	-0,10	0,06	-0,14	-0,10	-0,39	-0,37	-0,10	-0,01	0,32	0,02	0,92	0,15	0,00	0,09	-0,12
Gp22	-0,32	-0,22	-0,18	-0,33	0,53	-0,14	0,26	0,41	0,65	-0,48	-0,03	0,11	0,38	-0,59	0,13	0,34	0,01	-0,13	0,22	-0,16
Gp25	-0,22	-0,16	-0,30	-0,36	0,09	-0,07	-0,06	0,19	0,44	-0,22	0,13	0,41	0,35	-0,70	-0,05	0,28	0,04	-0,16	0,20	-0,01
Gp3	-0,18	-0,18	-0,20	-0,27	-0,30	-0,19	0,29	-0,23	-0,16	-0,31	-0,28	-0,06	-0,25	-0,06	0,09	-0,17	-0,33	0,21	-0,24	-0,22
Gp4	0,09	0,04	0,06	0,09	-0,11	0,12	0,01	-0,10	0,01	0,16	0,27	0,15	0,08	-0,15	-0,37	0,29	0,29	-0,15	0,27	0,35
Gp5	-0,42	-0,13	-0,36	-0,30	-0,10	-0,23	0,47	-0,20	-0,02	-0,24	-0,05	-0,03	-0,08	-0,49	-0,76	-0,39	0,27	-0,33	0,31	0,13
Gp6	-0,12	-0,09	-0,22	-0,18	0,15	-0,22	0,22	-0,02	0,17	-0,19	-0,03	0,16	0,03	-0,13	-0,07	0,55	0,13	-0,24	0,42	0,09
Gp7	0,19	0,03	0,08	0,23	0,07	0,19	-0,11	-0,06	-0,06	0,31	0,35	0,09	0,00	-0,02	-0,13	0,39	0,27	-0,09	0,46	0,51
Gp9	-0,11	0,04	0,01	-0,15	0,54	-0,12	0,10	0,14	0,18	-0,18	0,17	0,02	0,07	-0,49	0,31	0,33	0,13	-0,24	0,46	0,05

Tabla 61. Matriz de correlaciones de *Pearson* de las variables edáficas y ambientales frente a la abundancia relativa de las clases bacterianas (I).

Coefficientes *r* de *Pearson*, el nivel de significación  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ ; se representan respectivamente en verde, amarillo y naranja.

	C <sub>org</sub>	Lp1	Lp2	R	C <sub>sol</sub>	P	pH	Conductividad	C/N	N Total	Amonio	Nitrato	Estabilidad agregado	Porosidad	WHC	Humedad suelo	T. media	Humedad atmosférica	Precipitación
<i>Actinobacteria</i>	0,07	-0,04	0,15	0,06	0,09	0,25	-0,21	0,21	0,10	0,06	-0,01	0,04	-0,20	0,18	-0,42	-0,11	0,25	-0,28	-0,08
<i>Bacteroidia</i>	0,78	0,01	0,73	0,67	0,38	0,78	-0,46	0,23	-0,06	0,81	0,87	-0,02	-0,36	-0,09	-0,11	0,45	0,08	0,41	0,95
<i>Flavobacteria</i>	0,34	-0,13	0,14	0,18	-0,09	-0,08	0,13	-0,23	-0,33	0,12	-0,15	-0,18	0,39	-0,30	-0,74	0,19	0,05	-0,14	-0,10
<i>Sphingobacteria</i>	0,21	-0,03	0,03	0,22	-0,05	0,19	-0,06	-0,06	-0,10	0,12	-0,01	0,03	-0,01	-0,01	-0,08	-0,11	0,45	-0,46	-0,15
<i>Anaerolineae</i>	0,21	-0,08	0,13	0,32	0,13	0,22	-0,35	0,08	-0,04	0,37	0,47	-0,03	-0,09	-0,02	-0,04	0,23	0,04	0,20	0,53
<i>Chloroflexi</i>	0,02	0,13	0,08	0,08	-0,11	-0,19	0,00	-0,15	-0,19	0,07	-0,21	-0,15	0,34	-0,45	-0,16	0,23	-0,17	0,43	0,32
<i>Thermomicrobia</i>	-0,15	0,24	-0,02	-0,15	-0,13	-0,29	0,17	-0,10	0,00	-0,21	-0,23	-0,14				-0,56	0,01	-0,09	-0,17
<i>Cyanobacteria</i>	-0,18	-0,02	-0,01	-0,26	-0,11	-0,06	-0,05	-0,11	0,02	-0,24	-0,05	-0,05	-0,23	0,01	-0,31	-0,24	0,20	-0,33	-0,15
<i>Deinococci</i>	-0,01	0,14	-0,10	0,16	0,08	0,12	-0,43	0,44	0,39	0,18	-0,01	0,54	0,37	0,11	0,38	0,21	-0,04	0,15	0,02
<i>Bacilli</i>	-0,01	-0,10	0,01	0,09	0,00	0,31	-0,08	0,40	0,35	0,11	0,02	0,28	-0,28	-0,10	-0,21	0,08	0,02	-0,09	-0,11
<i>Clostridia</i>	0,20	0,12	0,14	0,30	0,19	0,36	-0,53	0,51	0,36	0,39	0,41	0,36	-0,04	0,12	0,25	0,16	0,05	0,11	0,27
<i>Erysipelotrichi</i>	0,75	-0,18	0,74	0,91	0,64	0,84	-0,54	0,37	0,21	0,84	0,91	0,26	-0,93	-0,95	-0,26	0,39	0,33	0,16	0,82
<i>Gemmatimonadetes</i>	-0,08	0,10	0,05	0,07	0,44	0,03	0,03	0,20	0,19	0,15	0,20	0,33	-0,17	-0,08	0,17	0,14	-0,11	0,30	0,10
<i>Nitrospira</i>	0,03	0,42	0,15	0,22	0,06	0,18	-0,35	0,26	0,22	0,23	0,22	0,49	-0,10	0,11	0,58	-0,02	0,10	-0,14	-0,08
<i>Planctomycetacia</i>	-0,09	-0,07	-0,05	-0,20	-0,14	-0,15	0,06	-0,25	-0,26	-0,18	-0,19	-0,25	0,12	0,14	-0,47	-0,17	0,12	-0,42	-0,27
<i>Alphaproteobacteria</i>	0,19	0,33	0,22	0,24	0,13	0,10	-0,31	0,25	0,23	0,28	0,19	0,27	-0,01	-0,26	0,09	0,04	-0,06	0,32	0,19
<i>Betaproteobacteria</i>	0,17	-0,13	0,07	0,09	-0,15	-0,07	0,19	-0,26	-0,36	-0,05	-0,20	-0,33	0,27	0,34	-0,26	-0,19	0,20	-0,31	-0,16
<i>Deltaproteobacteria</i>	0,02	-0,03	0,03	-0,13	-0,30	-0,18	0,22	-0,36	-0,33	-0,22	-0,23	-0,42	0,18	0,21	-0,26	-0,37	0,22	-0,33	-0,21
<i>Epsilonproteobacteria</i>	0,73	0,00	0,60	0,62	0,25	0,45	-0,38	-0,07	-0,24	0,73	0,98	-0,16	-0,93	-0,95	-0,26	0,43	-0,01	0,51	1,00
<i>Gammaproteobacteria</i>	-0,08	-0,04	0,01	-0,04	-0,17	-0,02	0,09	-0,21	-0,29	-0,06	-0,13	-0,15	0,32	0,34	-0,35	0,02	-0,08	-0,29	-0,14
<i>Synergistia</i>	0,73	0,00	0,61	0,62	0,26	0,45	-0,39	-0,07	-0,24	0,74	0,98	-0,15	-0,93	-0,95	-0,26	0,44	0,00	0,50	1,00
<i>Opitutae</i>	0,26	0,20	0,15	0,13	-0,29	-0,16	0,15	-0,41	-0,37	-0,01	-0,16	-0,39	0,40	-0,34	0,47	0,19	-0,12	0,35	0,21
<i>Spartobacteria</i>	0,34	0,20	0,36	0,38	0,01	0,00	-0,19	-0,14	-0,25	0,37	0,00	-0,06	0,35	-0,45	-0,12	0,21	0,10	0,15	0,37
<i>Subdivisión 5</i>	0,70	-0,24	0,68	0,95	0,70	0,92	-0,55	0,53	0,39	0,82	0,81	0,42	-0,93	-0,95	-0,26	0,39	0,38	0,07	0,70
<i>Verrucomicrobiae</i>	0,15	0,05	0,15	0,11	-0,12	-0,19	0,04	-0,26	-0,31	0,08	-0,23	-0,24	0,33	-0,58	-0,09	0,36	-0,19	0,37	0,25

Tabla 62. Matriz de correlaciones de *Pearson* de las variables edáficas y ambientales frente a la abundancia relativa de las clases bacterianas (II).

Coefficientes *r* de *Pearson*, el nivel de significación  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ ; se representan respectivamente en verde, amarillo y naranja.



## ANEXO 5. Cebadores.

Nombre	Cebador reverso	Hibridación con 16S		
V5R-454	CCATCCCCTGTGTGCCTGGCAGTCTCAG	CCGTCAATYYTTTRAGTT		
Nombre	Cebador líder	MID	Hibridación con 16S	
V4f-S0	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGAGTGCGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID1
V4f-S1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGACGCACTC	AYTGGGYDTAAAGNG	MID3
V4f-S2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCACTGTAG	AYTGGGYDTAAAGNG	MID4
V4f-S3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ATATCGCGAG	AYTGGGYDTAAAGNG	MID6
V4f-S4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGTGTCTCTA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID7
V4f-S5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCTCTATGCG	AYTGGGYDTAAAGNG	MID10
V4f-S6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CATAGTAGTG	AYTGGGYDTAAAGNG	MID13
V4f-S7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCACGTAATA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID16
V4f-S8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCTACGTAGC	AYTGGGYDTAAAGNG	MID18
V4f-S9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCACGCGAGA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID66
V4f-S10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGATAGTGA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID67
V4f-B0	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGTACTCAGA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID59
V4f-B1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCTCACGTA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID51
V4f-B2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGTGAGTAGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID47
V4f-B3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGATCGTATA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID55
V4f-B4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTGCTACGA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID54
V4f-B5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAGTCGCATA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID63
V4f-B6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGCACTAGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID43
V4f-B7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGCGTATACA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID57
V4f-B8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTATACATA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID52
V4f-B9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TATATATACA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID64
V4f-B10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTCGAGAGA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID53
V4f-A0	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ATACGACGTA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID15
V4f-A1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGTACTACTC	AYTGGGYDTAAAGNG	MID19
V4f-A2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGACTACAG	AYTGGGYDTAAAGNG	MID20
V4f-A3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACGAGTATG	AYTGGGYDTAAAGNG	MID22
V4f-A4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACTCTCGTG	AYTGGGYDTAAAGNG	MID23
V4f-A5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGTGCTCG	AYTGGGYDTAAAGNG	MID25
V4f-A6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACATACGCGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID26
V4f-A7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTACTATGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID28
V4f-A8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGTACAGTCA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID58
V4f-N0	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ATAGAGTACT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID33
V4f-N1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CACGCTACGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID34
V4f-N2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACGCTGTCT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID40
V4f-N3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGATCACGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID42
V4f-N4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTGTACAGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID29
V4f-N5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGACGTATGT	AYTGGGYDTAAAGNG	MID46
V4f-N6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGCAGTACGA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID56
V4f-N7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACAGTATATA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID48
V4f-N8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGCGATCGA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID49
V4f-LAE	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTAGCAGTA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID50
V4f-LANAE	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CTACGCTCTA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID60
V4f-BC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CTATAGCGTA	AYTGGGYDTAAAGNG	MID61

Tabla 63. Cebadores utilizados en la pirosecuenciación.

