



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

Departamento de Estadística  
Máster en Análisis Avanzado de Datos Multivariantes  
Trabajo Fin de Máster

**CARACTERIZACIÓN MULTIVARIANTE  
DEL COMPORTAMIENTO DEL SUELO  
SALMANTINO, BAJO TRATAMIENTOS  
DE SIEMBRA Y FERTILIZACIÓN**

Javier Martín Escribano (alumno)

Purificación Galindo Villardón (tutora)

2012



# VNIVERSIDAD D SALAMANCA

Dpto. de Estadística

Universidad de Salamanca

**Dña. Purificación Galindo Villardón**, *Profesora titular del Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca*

---

CERTIFICA que **D. Javier Martín Escibano** ha realizado en la Universidad de Salamanca, bajo su dirección, el trabajo que para optar al título de Máster en Análisis Avanzado de Datos Multivariantes presenta con el título “**Caracterización Multivariante del Comportamiento del Suelo Salmantino, bajo Tratamientos de Siembra y Fertilización**”, autorizando expresamente su lectura y defensa.

Y para que conste, firma el presente certificado en Salamanca a 13 de julio de 2012.

Dña. Purificación Galindo Villardón

*A Felisa y Julián,  
siempre estaréis conmigo*

*“El apoyo del que menos podemos prescindir es el de nuestro propio esfuerzo.”*

*(Madame Blancheotte (1830-1897) Literata y poetisa francesa)*

*Este trabajo ha sido desarrollado en el marco del Máster en Análisis Avanzado de Datos Multivariantes, impartido por el Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca.*

*Con estas líneas quería mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han hecho posible que ahora, escriba este apartado como parte final de mi trabajo.*

*Quería agradecer en primer lugar a todos los profesores que nos han formado durante este máster, de una forma muy especial al Dr. D. José Luis Vicente Villardón, y por supuesto a la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Purificación Galindo Villardón, por su paciencia, apoyo, consejos y dedicación durante toda mi formación, antes y durante la realización de este máster y trabajo, gracias “Puri”.*

*Al Dr. D. José Mariano Igual Arroyo, por el tiempo compartido y de aprendizaje, en esta última etapa.*

*A todos y cada uno de mis compañeros y amigos, que juntos recorrimos este camino. Julio, gracias amigo.*

*A Sandra, Isa, Zaira y Tessy por todos los momentos de “platica” que pasamos, risas, alegrías, tristezas,..., y apoyo recibido durante todo este tiempo.*

*A Ari, por acompañarme con su paciencia y apoyo en la recta final de este camino que fue duro, pero a su vez inolvidable.*

*A Guille, amigo, gracias por todo este año, la paciencia que has tenido en algunos momentos y ánimos, para que esto hoy, sea una realidad.*

*Y mi más sincero agradecimiento, a mis padres y hermana, por vuestra paciencia aun cuando sé que es difícil, por vuestro apoyo incondicional en todo momento, por escucharme,..., de corazón, gracias.*

# ÍNDICE

Resumen .....	8
---------------	---

## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN Y CONCEPTUALIZACIÓN

1. Introducción y Conceptualización .....	10
1.1. Introducción .....	11
1.2. Conceptualización del entorno .....	12
1.2.1. El suelo como recurso natural .....	12
1.2.1.1. El suelo .....	13
1.2.1.2. La rizodeposición .....	14
1.2.1.3. Principales grupos de microorganismos rizosféricos .....	15
1.3. La fertilización fosfórica .....	17
1.3.1. El fósforo presente en el suelo .....	17
1.3.2. Aprovechamiento del fósforo y la diversidad vegetal .....	19
1.3.3. La importancia de los pastos .....	20
1.3.4. Los pastos de la provincia de Salamanca .....	21
1.3.4.1. Dactilo ( <i>Dactylis glomerata</i> L.) .....	22
1.3.4.2. Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.) .....	23

## CAPITULO II: OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

2. Objetivos .....	24
2.1. Objetivos generales y específicos .....	25

## CAPITULO III: MATERIAL Y MÉTODOS

3. Material y Métodos .....	26
3.1. Caracterización de la base de datos .....	27
3.1.1. Obtención de los datos .....	27
3.1.2. Diseño del estudio de campo .....	27
3.1.3. Obtención de la muestra .....	29
3.1.4. Descripción de las variables .....	30
3.2. Análisis y métodos estadísticos .....	35
3.2.1. Análisis estadísticos .....	35
3.2.2. Métodos estadísticos multivariantes .....	35
3.2.2.1. ANOVA Medidas Repetidas .....	35
3.2.2.2. MANOVA – Biplot .....	41
3.2.2.3. Análisis de la Redundancia (RDA) .....	44

**CAPITULO IV: RESULTADOS**

<b>4. Resultados</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Descripción de la muestra y variables</b>	<b>50</b>
<b>4.1.1. Propiedades del suelo del tipo microbiológico</b>	<b>51</b>
4.1.1.1. Biomasa microbiana	52
4.1.1.2. Bacterias gram positivas	53
4.1.1.3. Actinobacterias	55
4.1.1.4. Bacterias gram negativas	56
4.1.1.5. Hongos saprofitos	58
4.1.1.6. Hongos micorrícicos arbusculares	59
<b>4.1.2. Propiedades del suelo del tipo bioquímico</b>	<b>60</b>
4.1.2.1. Glucosidasa	62
4.1.2.2. Fosfatasa	63
4.1.2.3. Arilsulfatasa	64
4.1.2.4. Ureasa	66
4.1.2.5. Deshidrogenasa	67
4.1.2.6. Mineralización de nitrógeno	68
4.1.2.7. Respiración basal	70
4.1.2.8. Coeficiente metabólico	71
<b>4.2. Análisis de las estacionalidad en los distintos años</b>	<b>73</b>
<b>4.3. Efectos de los tratamientos de siembra y fertilización sobre la microbiología y bioquímica del suelo</b>	<b>94</b>

**CAPITULO V: DISCUSIÓN**

<b>5. Discusión</b>	<b>108</b>
5.1. Discusión	109

<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>112</b>
----------------------------	------------

<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>115</b>
----------------------------	------------

<b><u>ANEXOS</u></b>	<b>120</b>
----------------------	------------

# ÍNDICE DE TABLAS

<b><u>Tabla 1:</u></b> Distribución de las parcelas en función del tratamiento de siembra. ....	<b>31</b>
<b><u>Tabla 2:</u></b> Distribución de las parcelas, en función del tratamiento de siembra y fertilización. ..	<b>31</b>
<b><u>Tabla 3:</u></b> Identificación de los ácidos grasos pertenecientes al suelo. ....	<b>34</b>
<b><u>Tabla 4:</u></b> Diseño de datos de medidas repetidas con un factor intra-sujetos.....	<b>37</b>
<b><u>Tabla 5:</u></b> Diseño de datos de medidas repetidas con dos factores intra-sujetos.....	<b>38</b>
<b><u>Tabla 6:</u></b> Diseño de datos de medidas repetidas con un factor intra-sujetos y un factor inter-sujetos. ....	<b>40</b>
<b><u>Tabla 7:</u></b> Valores medios, error estándar e intervalo de confianza (95%) para las variables microbiológicas 1 en las distintas estaciones del estudio.....	<b>52</b>
<b><u>Tabla 8:</u></b> Valores medios, error estándar e intervalo de confianza (95%) para las variables biológicas 1 en las distintas estaciones del estudio.....	<b>61</b>
<b><u>Tabla 9:</u></b> Valores medios y errores estándar para las variables que miden las propiedades del suelo de tipo microbiológico, en los diferentes muestreos realizados por estaciones.....	<b>74</b>
<b><u>Tabla 10:</u></b> Valores medios y errores estándar para las variables que miden las propiedades del suelo de tipo bioquímico, en los diferentes muestreos realizados por estaciones.....	<b>76</b>
<b><u>Tabla 11:</u></b> Resultados asociados al ANOVA de MR. Se muestra la prueba de esfericidad W de Mauchy, como el estadístico de contraste Lambda de Wilks .....	<b>79</b>
<b><u>Tabla 12:</u></b> Calidades de representación de las variables microbiológicas 1, respecto a los ejes factoriales en la representación de los datos del año 2009. ....	<b>82</b>
<b><u>Tabla 13:</u></b> Calidades de representación de las variables Microbiológicas 1, respecto de los ejes factoriales en la representación de los datos del año 2010. ....	<b>84</b>
<b><u>Tabla 14:</u></b> Calidades de representación de las variables Microbiológicas 1, respecto los ejes factoriales en la representación conjunta de los del año 2009 y 2010.....	<b>85</b>
<b><u>Tabla 15:</u></b> Calidades de representación de las variables Bioquímicas 1, respeto a los ejes factoriales en la representación de los datos del año 2009. ....	<b>87</b>
<b><u>Tabla 16:</u></b> Calidades de representación de las variables Bioquímicas 1, respecto de los ejes factoriales en la representación de los datos del año 2010. ....	<b>90</b>
<b><u>Tabla 17:</u></b> Calidades de representación de las variables Bioquímicas 1, respecto de los ejes factoriales en la representación conjunta de los años 2009 y 2010.....	<b>93</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS

<b><i>Figura 1:</i></b> Localización de la parcela experimental (Muñovela) en la localidad de Barbadillo (Salamanca).....	<b>27</b>
<b><i>Figura 2:</i></b> Análisis de Redundancia en dos etapas:(1) regresión de cada variable en Y sobre todas las variables de X calculando los valores estimados; (2) se lleva a cabo un ACP de la matriz de valores estimados para obtener los vectores y valores propios. Así se obtienen dos tipos de ordenaciones, una (YU) en el espacio de las variables respuesta Y, y otra (YU) en el espacio de las variables explicativas X. Además puede obtenerse otra ordenación mediante la técnica ACP utilizando la matriz de residuos.....	<b>45</b>
<b><i>Figura 3:</i></b> Representación de los valores medios y error estándar de la biomasa microbiana por estaciones.....	<b>52</b>
<b><i>Figura 4:</i></b> Representación de los valores medios de la biomasa microbiana, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.....	<b>53</b>
<b><i>Figura 5:</i></b> Representación de los valores medios y error estándar de las Bacterias Gram Positivas por estaciones.....	<b>54</b>
<b><i>Figura 6:</i></b> Representación de los valores medios de las Bacterias Gram Positivas, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización .....	<b>55</b>
<b><i>Figura 7:</i></b> Representación de los valores medios y error estándar de las Actinobacterias por estaciones.....	<b>55</b>
<b><i>Figura 8:</i></b> Representación de los valores medios de las Actinobacterias, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.....	<b>56</b>
<b><i>Figura 9:</i></b> Representación de los valores medios y error estándar de las Bacterias Gram Negativas por estaciones. ....	<b>56</b>
<b><i>Figura 10:</i></b> Representación de los valores medios de las Bacterias Gram Negativas, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamiento de fertilización.....	<b>57</b>
<b><i>Figura 11:</i></b> Representación de los valores medios y error estándar de los Hongos Saprofitos por estaciones.....	<b>58</b>
<b><i>Figura 12:</i></b> Representación de los valores medios de los Hongos Saprofitos, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.....	<b>59</b>
<b><i>Figura 13:</i></b> Representación de los valores medios y error estándar de los Hongos Micorrícicos Arbusculares por estaciones.....	<b>59</b>
<b><i>Figura 14:</i></b> Representación de los valores medios de los Hongos Micorrícicos Arbusculares, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización. ....	<b>60</b>
<b><i>Figura 15:</i></b> Representación de los valores medios y error estándar de la Glucosidasa por estaciones.....	<b>62</b>
<b><i>Figura 16:</i></b> Representación de los valores medios de la Glucosidasa, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamiento de fertilización.....	<b>63</b>

<b><u>Figura 17:</u></b> Representación de los valores medios y error estándar de la Fosfatasa por estaciones.....	<b>63</b>
<b><u>Figura 18:</u></b> Representación de los valores medios de la Fosfatasa, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamiento de fertilización.....	<b>64</b>
<b><u>Figura 19:</u></b> Representación de los valores medios y error estándar de la Arilsulfatasa por estaciones.....	<b>65</b>
<b><u>Figura 20:</u></b> Representación de los valores medios de la Arilsulfatasa, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamiento de fertilización.....	<b>65</b>
<b><u>Figura 21:</u></b> Representación de los valores medios y error estándar de la Ureasa por estaciones.....	<b>66</b>
<b><u>Figura 22:</u></b> Representación de los valores medios de la Ureasa, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.....	<b>67</b>
<b><u>Figura 23:</u></b> Representación de los valores medios y error estándar de la Deshidrogenasa por estaciones.....	<b>67</b>
<b><u>Figura 24:</u></b> Representación de los valores medios de la Deshidrogenasa, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.....	<b>68</b>
<b><u>Figura 25:</u></b> Representación de los valores medios y error estándar de la Mineralización de Nitrógeno por estaciones.....	<b>69</b>
<b><u>Figura 26:</u></b> Representación de los valores medios de la Mineralización de Nitrógeno, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.....	<b>69</b>
<b><u>Figura 27:</u></b> Representación de los valores medios y error estándar de la Respiración Basal por estaciones.....	<b>70</b>
<b><u>Figura 28:</u></b> Representación de los valores medios de la Respiración Basal, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.....	<b>71</b>
<b><u>Figura 29:</u></b> Representación de los valores medios y error estándar del Coeficiente Metabólico por estaciones.....	<b>72</b>
<b><u>Figura 30:</u></b> Representación de los valores medios del Coeficiente Metabólico, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamiento de fertilización.....	<b>72</b>
<b><u>Figura 31:</u></b> Diagrama de dispersión de las variables microbiológicas 1, representando los valores medios en los diferentes muestreos realizados durante el estudio.....	<b>75</b>
<b><u>Figura 32:</u></b> Diagrama de dispersión de las variables bioquímicas 1, representando los valores medios en los diferentes muestreos realizados durante el estudio.....	<b>77</b>
<b><u>Figura 33:</u></b> Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables Microbiológicas 1, por estación en el año 2009.....	<b>81</b>
<b><u>Figura 34:</u></b> Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables microbiológicas 1, por estación en el año 2010.....	<b>83</b>
<b><u>Figura 35:</u></b> Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables microbiológicas 1, por estación y año.....	<b>85</b>
<b><u>Figura 36:</u></b> Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables bioquímicas 1, por estación en el año 2009.....	<b>87</b>
<b><u>Figura 37:</u></b> Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables bioquímicas 1, por estación en el año 2010.....	<b>89</b>

<b><i>Figura 38:</i></b> Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables bioquímicas 1, por estación y año. ....	<b>92</b>
<b><i>Figura 39:</i></b> Leyenda de las representaciones del RDA, identificándonos los tratamientos de siembra y fertilización. ....	<b>95</b>
<b><i>Figura 40:</i></b> 1) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de PRIMAVERA con las variables microbiológicas 1. 2) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-sample distance, en la estación de PRIMAVERA con las variables microbiológicas 1. ....	<b>96</b>
<b><i>Figura 41:</i></b> 1) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de VERANO con las variables microbiológicas 1. 2) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-sample distance, en la estación de VERANO con las variables microbiológicas 1. ....	<b>98</b>
<b><i>Figura 42:</i></b> 1) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de OTOÑO con las variables microbiológicas 1. 2) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-sample distance, en la estación de OTOÑO con las variables microbiológicas 1. ....	<b>100</b>
<b><i>Figura 43:</i></b> 1) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de PRIMAVERA con las variables bioquímicas 1. 2) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-sample distance, en la estación de PRIMAVERA con las variables bioquímicas 1. ....	<b>101</b>
<b><i>Figura 44:</i></b> 1) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de VERANO con las variables bioquímicas 1. 2) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-sample distance, en la estación de VERANO con las variables bioquímicas 1. ....	<b>103</b>
<b><i>Figura 45:</i></b> Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de OTOÑO con las variables bioquímicas 1. 2) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-sample distance, en la estación de OTOÑO con las variables bioquímicas 1. ....	<b>105</b>
<b><i>Figura 46:</i></b> Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-sample distance, en la estación de primavera, verano y otoño con las variables Químicas 1. ....	<b>107</b>

# RESUMEN

---

---

El presente trabajo tiene como objetivo poner de manifiesto la adquisición de las competencias específicas y transversales del Máster en Análisis Avanzado de Datos Multivariantes; por ello, aunque el trabajo se ubica en el contexto biológico, con la ayuda de los responsables del trabajo de campo, lo que se somete a evaluación es el análisis de los datos. Se realiza una caracterización microbiológica y bioquímica de los suelos de las dehesas salmantinas, bajo distintos tratamiento de siembra y fertilización fosfórica. Se observa su evolución durante un periodo de dos años consecutivos, empleando técnicas multivariantes. Con la utilización del MANOVA-Biplot, hemos podido demostrar la estabilidad del patrón de comportamiento de las variables bioquímicas y microbiológicas en ambos años. El Análisis de la Redundancia (RDA) ha permitido observar aquellas variables que inciden en la evolución de los diferentes tratamientos de siembra y fertilización.

Palabras clave: *Medicago sativa* L., *Dactylis glomerata* L., MANOVA-Biplot, RDA

# ABSTRACT

---

---

The present work is aimed to highlight the acquisition of transversal and specific competences of the Master in Advanced Analysis of Multivariate Data; therefore, although this study is located in the biological context by a supervisor in this field, which is subjected to evaluation is the analysis of data. It's a microbiological and biochemical characterization of soils in "dehesas salmantinas" under different treatments of sowing and phosphate fertilization through observe their evolution during a two year period of time, using multivariate techniques to do a final analysis. The evolution of the soils is observed for a period of two consecutive years, using multivariate techniques. MANOVA-BIPLLOT was used to show the stability of the pattern of behavior of the microbiological and biochemical variables in both years. At the same time, with the Redundancy Analysis (RDA) we could observe those variables that point it existence in the evolution of different treatments of sowing and fertilization.

Key Words: *Medicago sativa* L., *Dactylis glomerata* L., MANOVA-Biplot, RDA

---

---

# 1 - INTRODUCCIÓN Y CONCEPTUALIZACIÓN

---

---

## 1.1. INTRODUCCIÓN

---

---

El presente trabajo ha sido posible gracias a la colaboración con el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca - perteneciente a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IRNASA/CSIC) – que nos ha dado la oportunidad de acceder a unos datos reales para su posterior análisis.

En la primera parte de este trabajo se realiza una conceptualización del entorno en el cual nos vamos a mover durante la realización del mismo. Comentaremos a su vez ciertas características que dan sentido a la realización de este tipo de estudios e investigaciones en este campo, como por ejemplo, la limitación en los recursos necesarios para la fabricación de fertilizantes, imprescindibles en las épocas en las que nos encontramos.

En una segunda etapa, presentamos y describimos los materiales con los que se ha trabajado y una breve descripción de las características principales de las variables con las que cuenta la base de datos original. También se hace una explicación teórica de los métodos estadísticos empleados para la realización de los análisis posteriores. Los métodos elegidos debido a las características de los datos y de los objetivos planteados han sido el ANOVA de medidas repetidas (ANOVA MR), el MANOVA-Biplot de una vía y por último, un Análisis de la Redundancia (RDA).

En la tercera parte, se ha realizado una descriptiva de las principales variables del estudio, para a continuación mostrar y comentar los resultados obtenidos tras la aplicación de las técnicas multivariantes.

Finalmente, se han mostrado una serie de conclusiones a las cuales se han llegado tras el análisis de los datos.

## 1.2. CONCEPTUALIZACIÓN DEL ENTORNO

---

### 1.2.1. EL SUELO COMO RECURSO NATURAL

Los recursos naturales que nos proporciona el planeta son muy numerosos y valiosos, por lo que debemos tratar de utilizarlos con responsabilidad, debido a que en la mayoría de los casos estos recursos son limitados, y algún día deberemos saber vivir sin ellos.

Los recursos naturales son aquellos recursos que nos proporciona la naturaleza de una forma directa o indirecta. Estos recursos pueden ser utilizados por los seres humanos para la satisfacción de sus necesidades. Los recursos naturales, se clasifican en dos grandes grupos, los renovables y los no renovables. Recordemos, los recursos naturales renovables, son aquellos que aun dependiendo de su utilización por parte del ser humano no se agotan, en contraposición con los recursos naturales no renovables, los cuales, debido a su utilización y características del recurso, éstos terminan agotándose.

Como ejemplo de recurso natural no renovable más común sería el petróleo, debido al uso que se realiza y la gran cantidad de tiempo que es necesario para su formación, terminará por agotarse. Como recursos renovables nos encontramos con los animales, las plantas, el agua, el suelo, el viento,..., entre otros, puesto estos se autoregeneran solos, sin la necesidad de ningún factor adicional.

Teniendo en cuenta su origen, pueden ser bióticos o abióticos. Los recursos bióticos son aquellos que se obtienen de la biósfera, como las plantas, animales y sus productos. Los combustibles fósiles (carbón y petróleo) también se consideran recursos bióticos ya que derivan por descomposición y modificación de materia orgánica. Los



recursos abióticos por el contrario son aquellos que no derivan de materia orgánica, como el suelo, el agua, el aire, los metales y los minerales.

Debido a las características del estudio, vamos a centrarnos en los recursos renovables del tipo abiótico, y más concretamente en el suelo, puesto que queremos observar su composición microbiológica y bioquímica a lo largo del tiempo frente a distintos tratamientos de plantas y fertilización. Trataremos de ver las principales características que se suceden en él, con la combinación de dos tipos de plantas, frente a la utilización o no de un fertilizante fosfatado.

#### 1.2.1.1. EL SUELO

El suelo como tal es uno de los recursos naturales más importantes con el que contamos, por lo que existe una necesidad de mantener y optimizar su productividad, para así satisfacer las necesidades agrícolas de los seres humanos.

El suelo lo podemos estudiar como una realidad natural, es decir, de forma independiente de lo que produzca o podamos obtener de él.

Como definición, podemos decir que el suelo es un cuerpo natural, situado en la parte superior de la corteza terrestre, que contiene partículas sólidas, agua, gases y que está provisto de elementos necesarios para el desarrollo y crecimiento de la vegetación. Lo definimos como cuerpo puesto que se dispone de varias partes y natural debido al resultado de la acción de los agentes de la naturaleza sobre la roca madre, siendo el origen del suelo o la materia prima del mismo (Cuadrado y Lorenzo, 1980).

Teniendo en cuenta su carácter funcional, podemos añadir, que el suelo en un medio de soporte físico para los vegetales, que contiene agua, aire y otros elementos minerales, nutritivos para su desarrollo, siendo también el hábitat de animales y microorganismos. Se trata de un sistema ecológico, complejo y fascinante en los que los procesos vitales, modos de vida y relaciones entre la fauna, microflora y suelo,

modifican constantemente sus condiciones físicas, mejorándolas en muchos casos (Ingelmo y Cuadrado, 1986).

Si lo queremos definir de una forma más formal y técnica, podemos decir que es un sistema estructurado, heterogéneo y discontinuo, fundamental e irremplazable; mantiene los ciclos biogeoquímicos, la productividad de los ecosistemas terrestres y sirve de hábitat para diferentes organismos (Nannipieri *et al.*, 2003). En el suelo se producen fuertes y complejas interacciones entre las raíces de las plantas, fauna y microorganismos que lo habitan, así como de todos ellos con los propios constituyentes abióticos del suelo.

La zona de influencia de la planta sobre el suelo, en la que nos vamos a centrar, es la rizosfera. Los datos que se han recogido de diferentes variables relevantes para el estudio de la bioquímica y microbiología, se han obtenido del estudio de la misma. La rizosfera (Hiltner, 1904) la podemos definir como el volumen del suelo biológicamente activo donde interactúan las plantas con la comunidad microbiana, concentrando una gran fracción de la biodiversidad total de la tierra, siendo probablemente el hábitat más dinámico del planeta (Jones and Hinsinger, 2008). Dicho de otro modo, se puede considerar como la porción de suelo en la que están las raíces de las plantas. Es una zona donde se dan toda una serie de relaciones físicas y químicas que afectan a la estructura del suelo y a los organismos que viven en él, proporcionándole unas propiedades diferentes. (Pedraza *et al.*, 2010)

Las plantas, o mejor dicho las raíces, depositan continuamente una variedad de compuestos en la rizosfera. Este proceso recibe el nombre de la rizodeposición (López *et al.*, 2010).

### 1.2.1.2. LA RIZODEPOSICIÓN

Recordemos que la rizodeposición, es el proceso por el cual las raíces de las plantas expulsan al suelo diferentes compuestos. La rizodeposición, puede dar lugar a

características diferentes en el suelo dependiendo del tipo de plantas que se encuentren en él. Por ello, uno de los objetivos en el cual nos centraremos, será el de la observación de la estructura del suelo mediante la combinación en la siembra de dos tipos de especies. A través de los distintos ácidos grasos que se pueden obtener en el suelo, podemos llegar a caracterizarlo, observando además como afecta a fertilización a las características que adopta el propio suelo.

La primera demostración clara de que una especie de planta selecciona de forma específica la composición de su microbiota rizosférica se logró mediante el estudio, por técnicas independientes de cultivos (DGGE<sup>1</sup>) de las poblaciones de rizobacterias en tres cultivos (fresa, colza y patata) crecidos en un mismo suelo (Smalla *et al.*, 2001). Se encontraron diferencias en la composición de las poblaciones bacterianas de la rizosfera entre los diferentes cultivos, con unas bacterias comunes a todos ellos y otras exclusivas de cada cultivo.

En la composición de la microbiótica de la rizosfera, debemos añadir que no sólo influye la planta a través de sus exudados radiculares<sup>2</sup>, sino que hay mecanismos de retroalimentación entre la planta y los microorganismos, por lo que éstos pueden modificar las propiedades de la rizodeposición.

Resumiendo, la rizodeposición de cada especie de planta determina la dimensión y composición de los microorganismos en su rizosfera, ya que la cantidad y tipo de exudados liberados por la raíz están bajo el control genético de la planta (Ryan *et al.* 2009), y éstos tienen efectos selectivos, promotores o inhibidores, sobre diferentes microorganismos presentes en el suelo (Hartmann *et al.*, 2009). La tipología del suelo, es otro factor determinante en la composición de los microorganismos en la rizosfera (Fierer and Jackson, 2006; Tamames *et al.*, 2010) debido a que las características físico-

---

<sup>1</sup> *DGGE*: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización) Es una técnica basada en la amplificación por PCR del ADN metagenómico, la cual genera un perfil genético o “huella digital” que puede ser utilizada para identificar miembros dominantes de una comunidad microbiana.

<sup>2</sup> *Exudados radiculares*: Todos aquellos compuestos orgánicos, liberados al medio (suelo) por raíces de plantas sanas e intactas.

químicas pueden afectar a comunidades bacterianas directa o indirectamente, mediante su influencia sobre la rizodeposición de la planta.

### 1.2.1.3. PRINCIPALES GRUPOS DE MICROORGANISMOS

#### RIZOSFÉRICOS

Prácticamente la totalidad de los grupos generales de (micro)organismos están representados en la rizosfera, incluyendo bacterias, arqueas, virus y hongos (Buee *et al.*, 2009). Gracias a los avances tecnológicos y a los numerosos estudios en ecología microbiana, cada vez se descubren nuevos microorganismos, especialmente bacterias (da Rocha *et al.*, 2009; Kielak *et al.*, 2009).

## 1.3. LA FERTILIZACIÓN FOSFÓRICA

---

---

### 1.3.1. EL FÓSFORO PRESENTE EN EL SUELO

El fósforo es un elemento químico fundamental, y todos los organismos, incluidas las plantas, lo necesitan para crecer y desarrollarse. Lamentablemente, el fósforo no es abundante en el suelo, y mucho del que se encuentra en él lo está en formas que no puede absorber la planta.

El fósforo que se encuentra en el suelo lo podemos dividir en dos grandes grupos: fósforo orgánico y fósforo inorgánico. El fósforo orgánico principalmente se encuentra en los residuos vegetales y animales presentes en el suelo. El fósforo inorgánico se encuentra contenido en los minerales derivados de la roca madre.

Las plantas absorben el fósforo de la solución del suelo, pero se encuentra en proporciones muy bajas. De ahí, el hecho de la utilización de fertilizantes, ya que se aplican para suministrar al suelo los nutrientes necesarios para que la vegetación o cultivo que se encuentre en él tenga todo lo necesario para su correcto desarrollo.

El uso de los fertilizantes se ha multiplicado por 10 desde 1950. Atendiendo a la definición dada por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, el fertilizante es un material cuya función principal es proporcionar elementos nutrientes a las plantas, ya que, el suelo no es capaz de abastecer las necesidades nutritivas de los cultivos. Los fertilizantes restituyen en los suelos los elementos nutritivos necesarios para cada cultivo, que las plantas han extraído, o que por erosión, lavado y retrogradación se han perdido. Si bien el nitrógeno es el nutriente requerido en mayores cantidades, su caso no es el más dramático desde el punto de vista de sus reservas. El fósforo, en cambio, es uno de los elementos más críticos a la hora de su producción, debido a su relativa escasez. Por otro lado, la aplicación de elevadas dosis de fósforo,

conduce a un enriquecimiento del elemento en aguas subterráneas, lagos, y ríos, produciendo el fenómeno de eutrofización de las aguas que es pernicioso para el medio ambiente. (Rubio, 2002).

La principal fuente de fósforo para la agricultura es el fosfato de roca, siendo este un recurso limitado y encontrándose controlado por un número muy limitado de países. A ello hay que añadir una creciente demanda en ciertos países en vías de desarrollo, como China e India, donde la mejor situación económica está cambiando los hábitos alimenticios de la población hacia los productos cárnicos y lácteos, que llevan asociado mayores insumos de fósforo en la agricultura que sustenta su producción. Por otra parte, los cultivos energéticos que abastecen la creciente industria de los biocombustibles compiten ahora por el fósforo antes destinado a la producción de alimentos. Este conjunto de causas han producido un alza en los precios del fosfato de roca, y muchos expertos han alertado sobre la posibilidad de que se produzca una grave crisis alimentaria a medida que se agoten los yacimientos ahora en explotación (Gilbert, 2009; Cordell *et al.*, 2009).

Por ello, es necesaria la investigación para optimizar la utilización de este recurso. Su utilización es necesaria para mantener la productividad agrícola, pero si ésta es incorrecta tiene consecuencias negativas en el medio ambiente y sobre los seres humanos. En la utilización de los fertilizantes es necesario garantizar que estos productos utilizados en la nutrición vegetal o en la mejora de las características del suelo cumplen con dos requisitos fundamentales: la eficacia agronómica y ausencia de efectos perjudiciales para la salud humana, animal o vegetal y el medio ambiente – según informa el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente -.

### 1.3.2. APROVECHAMIENTO DEL FÓSFORO Y LA DIVERSIDAD VEGETAL

Una posible solución a este problema, según ciertos autores se encontraría en la obtención de genotipos de plantas con una mayor eficiencia en el uso del fósforo (Lynch, 2007; Vance *et al.*, 2003) y en la utilización correcta de la diversidad vegetal, con la finalidad de conseguir el fenómeno de la sobreproducción (Tilman, 1999).

La sobreproducción la podemos explicar a través de dos importantes procesos resultantes de un mejor uso de los recursos, los cuales son la complementariedad de nicho y la facilitación. La complementariedad de nicho se produce cuando dos o más especies pueden utilizar el mismo recurso en diferente tiempo, espacio o forma. Cuando se habla de facilitación, nos referimos cuando una especie incrementa el crecimiento o supervivencia de otra(s) debido a que mejora las condiciones abióticas y/o bióticas del medio en el que se encuentra ambas (Callaway, 1995; Loreau, 2000).

En ecología, se han realizado numerosos estudios que demuestran los beneficios sobre el uso de los nutrientes que se produce cuando aumenta la diversidad de especies, centrados mayoritariamente en las interacciones que se producen entre las leguminosas y las gramíneas respecto al uso del nitrógeno, pero son pocos los estudios que observen estas interacciones en relación al fósforo, siendo este el motivo de la realización del trabajo experimental de Dña. Marisol Medina Sierra para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

La combinación de ciertas especies en el suelo, da lugar a interacciones positivas cuando se producen en unas condiciones en las que hay una limitación del fósforo. Las leguminosas expulsan a la rizosfera numerosas sustancias que favorecen la disponibilidad de fósforo para su propia utilización y para las plantas más cercanas. De igual forma, las gramíneas expulsan otro tipo de sustancias que mejora la nutrición

fosfórica de las leguminosas, por lo que la combinación gramíneas-leguminosas es interesante en términos de estudio.

Un modelo natural de interacción entre gramíneas y leguminosas son los ecosistemas de pastos. El pasto comúnmente se entiende como la composición vegetal que es ingerida por el ganado para su alimentación. El pasto por definición es de origen vegetal, si bien el producto ingerido por los animales puede ser un derivado procesado al cual se hayan añadido minerales o restos animales. Para mejorar la calidad y la productividad de los pastos se busca una composición adecuada entre leguminosas y gramíneas, de modo que se produzca una complementación entre ellas que mejore a los mismos, y debido a ello, los agrosistemas de pastos adquieren una gran importancia en la investigación agraria.

### 1.3.3. LA IMPORTANCIA DE LOS PASTOS

Los pastos han adquirido importancia en las investigaciones ecológicas. Además de servir de alimento para el ganado, los pastos aportan unos beneficios importantes desde un punto de vista ecológico y ambiental.

Teniendo en cuenta el creciente incremento en el consumo de productos cárnicos y lácteos, y por lo tanto en su producción, es importante mejorar la utilización de este recurso para que pueda satisfacer sus múltiples funciones de la mejor forma posible. El ser humano ha modificado en numerosas ocasiones la ecología de los ecosistemas para generar pastos con unas propiedades más beneficiosas y rentables para su uso. Una de estas prácticas ha sido la del pastoreo selectivo, el cual favorece el crecimiento de las especies vegetales con mayores cantidad de nutrientes

En las comunidades más diversas se aprovechan mejor los recursos disponibles por una mejor exploración del suelo y una mayor probabilidad de que se establezcan interacciones positivas entre sus miembros (Hector *et al.*, 1999; Trenbath and Brady, 1974).



### 1.3.4 LOS PASTOS EN LA PROVINCIA DE SALAMANCA

La provincia de Salamanca, cuenta con una extensión de 765.260 ha dedicadas a los pastos, que junto a León (793.231ha) son las provincias con mayor extensión de pastos de la Comunidad de Castilla y León. En la provincia de Salamanca, el 90 % de la superficie de pasto corresponde a pastos con arbolado ralo<sup>3</sup> y a la dehesa<sup>4</sup>.

Atendiendo a las características propias de la dehesa, en la provincia de Salamanca la gran mayoría de sus terrenos pueden considerarse dehesas. Además, se consideran un sistema agrosilvopastoral<sup>5</sup> propio de Península Ibérica. Las dos características fundamentales de este sistema son el carácter mediterráneo de su clima (veranos secos e inviernos fríos) y la baja fertilidad del suelo, particularmente por su déficit de fósforo y calcio, que imposibilita una agricultura rentable y ecológica (Olea and San Miguel-Ayanz, 2006).

Los pastos, junto con el arbolado, son los componentes principales con los que cuenta la dehesa. Debido a las condiciones climáticas y físicas de la zona, con un adecuado pastoreo, las dehesas se encuentran caracterizadas por especies pascícolas anuales de tipo perenne<sup>6</sup>.

---

<sup>3</sup> *Arbolado ralo*: Según la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP), dicese de un tipo de monte con arbolado abierto, hueco o aclarado (natural o artificialmente), que se utiliza para pastoreo extensivo, aunque tampoco la ganadería sea su producción principal.

<sup>4</sup> *Dehesa*: Según la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP), se puede entender como superficie con árboles más o menos dispersos y un estrato herbáceo bien desarrollado, en la que ha sido eliminado, en gran parte, el arbustivo. Es de origen agrícola (tierras labradas en rotaciones largas) y ganadero. Su producción principal es la ganadería extensiva o semiextensiva, que suele aprovechar no sólo los pastos herbáceos, sino también el ramón y los frutos del arbolado.

<sup>5</sup> *Agrosilvopastoral*: Concepto de visión ecológica y aplicación productiva múltiple en el cual se adaptan los cultivos de árboles productores de alimentos a la siembra en gran escala de productos para la cría de ganado y otros animales domésticos. (Mata y Quevedo 1998)

<sup>6</sup> *Pascícolas perennes*: Especie herbácea de ciclo de vida plurianual.

Las especies pascícolas anuales presentan la ventaja adaptativa de sobrevivir en el período seco como semillas, por lo que dominan los pastos naturales de la Península Ibérica dada la acusada estacionalidad de las precipitaciones (Annicchiarico *et al.*, 2011; Clary, 2008). Sin embargo, tienen la desventaja agronómica de concentrar su producción en un corto período de tiempo, principalmente durante la primavera.

Entre las especies pascícolas perennes más utilizadas en las regiones mediterráneas, bien en monocultivos o en mezclas diversas, están: el dactilo, la festuca alta, el raigrás inglés y el raigrás italiano, dentro de las gramíneas; y, entre las leguminosas, la alfalfa, la esparceta o pipirigallo y la zulla (Lelievre and Volaire, 2009).

Debido a las características propias del estudio realizado, se van a utilizar una especie de gramínea y una especie de leguminosas, que pasaremos a comentar brevemente sus principales características a continuación. Del grupo de las gramíneas se consideró el dactilo (*Dactylis glomerata* L.) y dentro de las leguminosas, la alfalfa (*Medicago sativa* L.).

#### 1.3.4.1. DACTILO (*DACTYLIS GLOMERATA* L.)

El Dactilo pertenece al grupo funcional de las gramíneas. Es una especie perenne y puede llegar a alcanzar los 1,20 m. de altura.

Generalmente se encuentra sembrada junto a otras especies de gramíneas y leguminosas. El pasto que produce es de buena calidad, el cual es apto para todo tipo de ganados, disponiendo de una buena aptitud para la siega. Es una planta muy útil, ya que presenta un crecimiento casi continuo, atenuándose en el verano y el invierno. Sirve por tanto para prolongar la época de pastoreo, tanto en el otoño como en la primavera; encontrándose en ésta última favorecida por el pastoreo (Buendía, 2000).



#### 1.3.4.2. ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA L.*)



La alfalfa pertenece al grupo funcional de las leguminosas. Posee una talla media en torno a 60-70 cm. El pasto que proporciona esta especie es considerado de una calidad excelente, favoreciéndole un pastoreo no excesivo, por lo que es poco persistente en el pastizal. Se encuentra extendida a lo largo de toda la geografía española, encontrándose presente desde el nivel del mar hasta los 1.800 m. de altitud, teniendo su óptimo en altitudes medias con climas cálidos (Buendía, 2000).

---

---

## 2 - OBJETIVOS

---

---

## 2.1. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

---

---

Como *objetivo general* en la realización de este estudio nos marcamos el siguiente:

- Poner de manifiesto el papel de los métodos estadísticos multivariantes en la consecución de los objetivos biológicos marcados por el experto.

Como *objetivos específicos* nos planteamos los siguientes:

- Evaluación de las propiedades microbiológicas y bioquímicas en función de los efectos temporales y estacionales.
- Evaluación de las estructuras microbiológicas y bioquímicas en los suelos de las parcelas, con el objetivo de fusionar datos para análisis posteriores.
- Caracterización de la evolución de las propiedades microbiológicas y bioquímicas en las diferentes estaciones.
- Caracterización de los suelos en función de sus propiedades microbiológicas, bioquímicas y químicas en relación de los distintos tratamientos de siembra y fertilización.

---

---

## 3 - MATERIAL Y MÉTODOS

---

---

## 3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA BASE DE DATOS

---

### 3.1.1 OBTENCIÓN DE LOS DATOS

Los datos con los cuales se ha realizado este trabajo, han sido cedidos para la realización del mismo por el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, perteneciente a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IRNASA/CSIC).

Estos datos han surgido del trabajo experimental de Dña. Marisol Medina Sierra, en los que se basa la memoria de Doctorado cuya dirección ha estado a cargo del Dr. D. José Mariano Igual Arroyo y el Dr. D. Ángel Valverde Portal.

### 3.1.2 DISEÑO DEL ESTUDIO DE CAMPO

El estudio, cuenta con 40 parcelas de 9 m<sup>2</sup> de extensión cada una de ellas. Éstas han sido numeradas y tratadas con distintos tipos de siembra y fertilización. Estas parcelas, se encuentran en la finca experimental Moñovela (IRNASA/CSIC) en la localidad de Barbadillo (Salamanca). (Figura 1)



**Figura 1:** Localización de la parcela experimental (Muñovela) en la localidad de Barbadillo (Salamanca).

En las parcelas, se han sembrado dos tipos de plantas, una del grupo de las gramíneas (*Dactylis glomerata L.*) y otra del grupo de las leguminosas (*Medicago sativa L.*). Esta siembra ha sido de dos tipos. En unas parcelas se ha utilizado una siembra en modo de monocultivo y en otras la siembra mixta, donde se han combinado ambas especies.

De las 40 parcelas, 20 de ellas han sido tratadas con un fertilizante fosfatado (+P), mientras que al resto, no se les aplicó dicha dosis de (-P). Éste fue aplicado mediante la técnica del voleo<sup>7</sup>, siendo aplicada antes del inicio de la estación de primavera.

Se han identificado diferentes tratamientos mediante la combinación de la siembra de ambas especies y la fertilización del suelo. Estos tratamientos los podemos identificar y caracterizar de la siguiente manera:

#### ✚ Tratamientos sin fertilización (-P)

- Tratamiento 1 (T1): Monocultivo de Gramínea (*Dactilo*) (100%).
- Tratamiento 2 (T2): Siembra mixta. Gramínea (*Dactilo*) (75%) y Leguminosa (*Alfalfa*) (25%).
- Tratamiento 3 (T3): Siembra mixta. Gramínea (*Dactilo*) (50%) y Leguminosa (*Alfalfa*) (50%).
- Tratamiento 4 (T4): Siembra mixta. Gramínea (*Dactilo*) (25%) y Leguminosa (*Alfalfa*) (75%).
- Tratamiento 5 (T5): Monocultivo de Leguminosa (*Alfalfa*) (100%).

#### ✚ Tratamientos con fertilización (+P)

- Tratamiento 1 (T6): Monocultivo de Gramínea (*Dactilo*) (100%).
- Tratamiento 2 (T7): Siembra mixta. Gramínea (*Dactilo*) (75%) y Leguminosa (*Alfalfa*) (25%).
- Tratamiento 3 (T8): Siembra mixta. Gramínea (*Dactilo*) (50%) y Leguminosa (*Alfalfa*) (50%).
- Tratamiento 4 (T9): Siembra mixta. Gramínea (*Dactilo*) (25%) y Leguminosa (*Alfalfa*) (75%).
- Tratamiento 5 (T10): Monocultivo de Leguminosa (*Alfalfa*) (100%).

---

<sup>7</sup> *Técnica del Voleo*: Dicha técnica de fertilización, también conocida como de “Cobertura total”, consiste en la aplicación del fertilizante en la totalidad del terreno, ya sea antes o después de la siembra.



El periodo de recogida de las muestras se ha realizado en dos años consecutivos, 2009 y 2010, durante los meses de julio, octubre y abril, correspondiendo a las estaciones de verano, otoño y primavera.

### 3.1.3 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El estudio inicial contaba con 3 periodos de muestreos y dos tratamientos de siembra más que los comentados anteriormente, por lo cual, el estudio inicial contaba con 48 parcelas. Estos dos tratamientos son el T6 – correspondería a un tratamiento sin fertilización (-P) y sin tratamiento de siembra (CN) (*Colonización natural*) - y T12 respectivamente – correspondería a un tratamiento con fertilización (+P) y sin tratamiento de siembra (CN) (*Colonización Natural*) -.

La muestra inicial, por tanto, contaba con 432 observaciones de los diferentes parámetros que se estaban midiendo, en las estaciones de primavera, verano y otoño desde 2008 a 2011. El motivo por el cual, se han omitido para este trabajo los dos tratamientos anteriores, y las unidades de muestreo correspondientes al verano, otoño del año 2008 y la primavera del año 2011, ha sido por la existencia de datos faltantes en las muestra, lo cual, requiere un análisis más detenidamente y exhaustivamente de los mismos.

Por lo tanto, tras la eliminación de los casos anunciados, nuestro estudio dispone de la siguiente muestra. Contamos con 40 parcelas, a las cuales se les tomó 4 muestras de suelo a 10 cm. de profundidad. Estas muestras individuales fueron mezcladas homogéneamente para dar lugar a una única muestra final para cada parcela, la cuál se analizó para extraer la información de las diversas variables que comentaremos a continuación.

Concretando, la muestra que disponemos para la realización de los análisis, cuenta con un total de 240 muestras. De todas ellas, las 120 primeras, corresponden a las extraídas durante el año 2009, en las estaciones de primera, verano y otoño. Y a su

vez, cada estación cuenta con un total de 40 muestras para los diferentes tratamientos de siembra y fertilización, correspondiendo 20 de ellas a un tratamiento sin fertilización (-P) y a las restantes les fue aplicado un fertilizante fosfatado (+P). Dentro de cada tratamiento de fertilización, contamos con 5 tratamientos de siembra diferentes (T1 – T5), aplicado cada uno de ellos sobre 4 parcelas diferentes.

### 3.1.4 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

La base de datos cuenta con dos tipos de variables. Aquellas que son del tipo nominal, y hacen referencia a la caracterización e identificación de cada una de las distintas muestras obtenidas a lo largo del estudio. El otro conjunto de variables, de tipo cuantitativo, recogen la información propia de cada una de las variables observadas.

Atendiendo a las variables de categorización, podemos describir las siguientes:

- Variable “Parcela”

La variable “parcela” hace referencia a la parcela de la cual se han tomado las muestras. La base de datos cuenta con un total de 40 parcelas, en las que se han tomado en cada una de ellas 6 muestras, correspondientes a cada periodo de muestreo.

- Variable “Tratamiento”

Hace referencia al “Tratamiento de siembra” aplicado a cada una de las parcelas. Cuenta con 5 categorías (T1 – T5) correspondiendo al tipo de siembra aplicado a dicha parcela. Los tratamientos de siembra corresponden a la proporción en que se sembraron dos especies de plantas: dátilo y alfalfa, como se ha comentado anteriormente. Cada uno de los tratamientos de siembra ha sido aplicado a 8 parcelas distintas, pudiéndose resumir en la siguiente tabla: (Tabla 1)

**Nº de Parcela**

<b>T1</b>	4	7	16	19	26	30	44	47
<b>T2</b>	11	13	17	20	34	38	40	43
<b>T3</b>	1	8	14	24	29	35	42	46
<b>T4</b>	2	10	12	15	36	37	39	45
<b>T5</b>	3	6	9	23	25	28	32	48

**Tabla 1:** Distribución de las parcelas en función del tratamiento de siembra.

- **Variable “Fósforo”**

Cuenta con dos categorías (0 – 1), las cuales hacen referencia al tipo de “*Tratamiento de fertilización*” al que se le ha sometido la parcela. El valor 0 se refiere a que no se ha llevado a cabo una fertilización fosfatada (-P), y el valor 1 de que sí se ha llevado a cabo una fertilización fosfatada (+P). A cada uno de los tratamientos de siembra, se les ha aplicado 4 tipos de -P y +P. (Tabla 2)

**Nº de Parcela**

<b>T1</b>	4	7	16	19	26	<b>30</b>	44	47
<b>T2</b>	11	13	17	20	34	38	<b>40</b>	43
<b>T3</b>	1	8	14	<b>24</b>	29	35	<b>42</b>	<b>46</b>
<b>T4</b>	2	10	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	39	45
<b>T5</b>	<b>3</b>	6	<b>9</b>	23	25	<b>28</b>	<b>32</b>	48

**Tabla 2:** Distribución de las parcelas, en función del tratamiento de siembra y fertilización.

- **Variable “Estación”**

Hace referencia a la época del año en que se han tomado las muestras. Se encuentra codificada con tres categorías (1 – 2 – 3). El valor 1 se refiere a la muestra tomada en verano, el valor 2 al otoño y el valor 3 a la primavera.

- **Variable Muestreo**

Hace referencia a la secuencia del muestreo. Se encuentra codificada con valores que van desde 3 a 8 (3m,...,8m). Los muestreos 4 y 7 corresponden con los muestreos realizados en verano. Los muestreos 5 y 8 son los realizados en otoño, y por último los

muestreos 3 y 6 los realizados en primavera de cada respectivo año. Además de la información procedente a la estacionalidad, nos aporta información temporal. Es decir, las categorías 3,4 y 5 nos están diciendo además, que los muestreos corresponden al año 2009, y de forma análoga, .las categorías 6, 7 y 8 nos informan de que el muestreo se ha llevado a cabo en el año 2010.

Tras describir de una forma breve, las variables las cuales nos están categorizando las diferentes muestras, pasamos a describir, también de una forma breve, las variables cuantitativas correspondientes a la parametrización del suelo. Estas se pueden dividirse en 3 grupos principales, atendiendo al tipo de propiedades medidas.

Estos grupos los podemos identificar mediante:

✚ **Propiedades del suelo del tipo Bioquímico**

- Variables Bioquímicas 1 (8 variables)
- Variables Bioquímicas 2 (5 variables)

✚ **Propiedades del suelo del tipo Microbiológico**

- Variables Microbiológicas 1 (6 variables)
- Variables Microbiológicas 2 (18 variables)

✚ **Propiedades del suelo del tipo Químico**

- Variables Químicas (6 variables)

✚ **Propiedades del suelo del tipo Bioquímico**

▪ **Variables Bioquímicas 1**

Corresponderían a las 8 siguientes variables y hacen referencia con las “*Actividades Enzimáticas*”, que recogen datos de los siguientes componentes que se encuentran en el suelo de las parcelas.

- Glucosidasa (**GLasa**)
- Fosfatasa (**FOasa**)

- Arilsulfatasa (**ARasa**)
- Ureasa (**URasa**)
- Deshidrogenasa (**DEasa**)
- Mineralización de Nitrógeno (**MinN**)
- Respiración basal (**Resp**)
- Coeficiente Metabólico (**qCO<sub>2</sub>**)

#### ▪ Variables Bioquímicas 2

Hacen referencia a las “*Actividades Enzimáticas específicas*” del suelo, que es la actividad enzimática correspondiente normalizada por unidad de respiración del suelo (*Resp*) correspondiendo con las 5 siguientes variables:

- Actividad Glucosidasa (GLasa) normalizada (**normGL**)
- Actividad Fosfatasa (FOasa) normalizada (**normFO**)
- Actividad Arilsulfatasa (ARasa) normalizada (**normAR**)
- Actividad ureasa (URasa) normalizada (**normUR**)
- Actividad deshidrogenasa (DEasa) normalizada (**normDE**)

#### ✚ Propiedades del suelo del tipo Microbiológico

##### ▪ Variables Microbiológicas 1

Las siguientes 6 variables, hacen referencia a datos microbiológicos (Datos por grupos de bacterias):

- Biomasa Microbiana (**BiomM**): Hace referencia a la Biomasa Total. Se obtiene de la suma de cada una de las variables microbiológicas 2 más otras. No son datos de proporción (%mol) sino de concentración.
- Bacterias Gram Positiva (**G+**) (%mol)
- Actinobacterias (**Actin**) (%mol)
- Bacterias Gram Negativa (**G—**) (%mol)
- Hongos Saprofitos (**HSapr**) (%mol)
- Hongos Micorrízicos Arbusculares (**HMA**) (%mol)

##### ▪ Variables Microbiológicas 2

Representan la proporción (%molar) de ácidos grasos procedentes de microorganismos del suelo. A partir de estos valores calculamos datos referentes a las variables microbiológicas 1. (Tabla 3)

Ácidos Grasos		Ácidos Grasos	
34F	<b>i14:0</b>	84F	<b>17:1 w8c</b>
46F	<b>i15:0</b>	87F	<b>cy17:0</b>
47F	<b>a15:0</b>	94F	<b>17:0 10Me</b>
60F	<b>i16:0</b>	99F	<b>18:3 w6,9,12c</b>
65F	<b>16:1 w7c</b>	6aF	<b>18:2 w6,9c</b>
66F	<b>16:1 w5c</b>	102F	<b>18:1 w9c</b>
75F	<b>16:0 10Me</b>	7aF	<b>18:1 w7c</b>
81F	<b>i17:0</b>	111F	<b>18:0 10Me</b>
82F	<b>a17:0</b>	117F	<b>cy19:0</b>

**Tabla 3:** Identificación de los ácidos grasos pertenecientes al suelo.

### Propiedades del suelo del tipo Químico

#### ▪ Variables Químicos (Parámetros del suelo)

Contaríamos con las siguientes 6 variables las cuales nos están midiendo distintos parámetros del suelo.

- Carbono (**C**) (%).
- Nitrógeno (**N**) (%).
- Concentración de fósforo (**Pppm**)
- Concentración de Nitrato (**NO<sub>3</sub>**)
- Concentración de Amonio (**NH<sub>4</sub>**)
- pH (H<sub>2</sub>O) del suelo (**pH**)

## 3.2. ANÁLISIS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS

---

### 3.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para la obtención de los resultados, se han llevado a cabo los análisis estadísticos con diferentes programas específicos. Se han utilizado el programa estadístico SPSS en su versión 19.0, principalmente para la realización de análisis descriptivos y otro tipo de análisis como ANOVA (MR) y MANOVAS. También se ha utilizado el programa estadístico MultBiplot (Vicente-Villardón, 2010), el cuál nos ha permitido hacer una representación de los resultados de diferentes MANOVAs. La realización de técnicas de ordenación (RDA) ha sido resuelto con la utilización del programa CANOCO for Windows en su versión 4.5.

### 3.2.2 MÉTODOS ESTADÍSTICOS MULTIVARIANTES

#### 3.2.3.1. ANOVA MEDIDAS REPETIDAS

Las técnicas iniciales del análisis de varianza fueron desarrolladas por el estadístico y genetista R. A. Fisher en los años 1920 y 1930 y es algunas veces conocido como “ANOVA de Fisher” o “análisis de la varianza de Fisher”, debido al uso de la distribución F de Fisher como parte del contraste de hipótesis (Spiegel *et al.*, 2007).

Los diseños de medidas repetidas se caracterizan por evaluar el patrón de cambio de los sujetos a través del tiempo en función de los tratamientos u otras variables de tipo biológicas, psicológicas o sociales. Entendemos por medidas repetidas las múltiples medidas tomadas sobre la misma entidad o sujeto (Livacic-Rojas *et al.*, 2006).

En ANOVA de medidas repetidas (en adelante ANOVA MR) se ha aplicado con un interés explícito en la respuesta sobre el tiempo en campos como la biología, las ciencias ambientales, ciencias sociales, medicina,..., entre otros (Ruiz-Ochoa *et al.*, 2006).

En la ciencia del suelo, algunas de las observaciones se hacen a través del tiempo sobre la misma unidad taxonómica, pero son analizados mediante gráficos simples por medio de análisis univariados de varianza (ANOVA) o regresión, y se ignora información potencialmente disponible concerniente a la tendencia sobre el tiempo y es frecuente que se violen los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de los análisis univariados, lo que conduce a estimaciones erróneas de la suma de cuadrados medios y de los valores de F y a pruebas de hipótesis no confiables (Ruiz-Ochoa *et al.*, 2006).

Recordemos, los modelos de medidas repetidas, sirven para estudiar el efecto de una o más factores, cuando al menos uno de ellos, es un factor intra-sujetos. El factor intra-sujetos se caracteriza porque todos los niveles del factor se aplican a todos los sujetos de un mismo grupo.

Dentro del análisis de ANOVA MR tenemos distintos modelos con mayor y menor complejidad, que denominaremos y caracterizaremos brevemente. Estos modelos los podemos denominar como:

- ✚ **Diseño de medidas repetidas con un factor intra-sujetos.**
- ✚ **Diseño de medidas repetidas con dos factores intra-sujetos.**
- ✚ **Diseño de medidas repetidas con un factor intra-sujetos y un factor inter-sujetos.**



✚ **Diseño de medidas repetidas con un factor intra-sujetos.**

El diseño con un factor intra-sujetos cuenta con un único factor  $T$  con  $t$  niveles, aplicados a los  $n$  individuos con los que trabajamos, pretendiendo estudiar el efecto del factor  $T$ (con  $t$  niveles) sobre una variable respuesta  $Y$ . El diseño en forma de tabla, sería de la siguiente manera: (Tabla 4)

<i>Sujetos</i>	<i>Factor T</i>						<i>Medias</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>.</i>	<i>i</i>	<i>.</i>	<i>t</i>	
<i>1</i>	$y_{11}$	$y_{21}$	<i>.</i>	$y_{i1}$	<i>.</i>	$y_{t1}$	$\bar{y}_{.1}$
<i>2</i>	$y_{12}$	$y_{22}$	<i>.</i>	$y_{i2}$	<i>.</i>	$y_{t2}$	$\bar{y}_{.2}$
<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>
<i>j</i>	$y_{1j}$	$y_{2j}$	<i>.</i>	$y_{ij}$	<i>.</i>	$y_{tj}$	$\bar{y}_{.j}$
<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>
<i>n</i>	$y_{1n}$	$y_{2n}$	<i>.</i>	$y_{in}$	<i>.</i>	$y_{tn}$	$\bar{y}_{.n}$
<i>Medias</i>	$\bar{y}_{1.}$	$\bar{y}_{2.}$	<i>.</i>	$\bar{y}_{i.}$	<i>.</i>	$\bar{y}_{t.}$	$\bar{y}_{..}$

**Tabla 4:** Diseño de datos de medidas repetidas con un factor intra-sujetos.

Donde  $y_{ij}$  es el valor de la variable respuesta del  $j$ -ésimo individuo bajo el tratamiento  $i$ -ésimo.

El modelo lineal asociado a este diseño tal y como se ha planteado anteriormente viene dado por:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + S_j + e_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, t \quad j = 1, 2, \dots, n$$

$$\sum_{i=1}^t \alpha_i = 0; S_j \sim N(0, \sigma_1); e_{ij} \sim (0, \sigma_2) \text{ y } S_j \text{ y } e_{ij} \text{ son mutuamente excluyentes}$$

Donde  $\mu$  representa la media poblacional de la variable respuesta,  $\alpha_i$  el efecto medio adicional debido al tratamiento  $i$ ,  $S_j$  el efecto aleatorio del sujeto  $j$ , y  $e_{ij}$  representa el error aleatorio. Además estamos suponiendo que no existe efecto interacción entre los sujetos y el factor.

Si disponemos de  $t$  tratamientos y  $n$  réplicas por tratamiento, podríamos interpretarlo mediante una aproximación de un modelo univariante o como un modelo multivariante.

**✚ Diseño de medidas repetidas con dos factor intra-sujetos.**

En este tipo de diseños nos encontramos con dos factores intra-sujetos  $T$  y  $V$ , con  $t$  y  $v$  niveles respectivamente, de forma que tenemos  $tv$  tratamientos los cuales se aplican a una muestra de  $n$  sujetos seleccionados aleatoriamente, y lo que se pretende estudiar es el efecto de los factores intra-sujetos  $T$  y  $V$  sobre la variable respuesta  $Y$ . La organización de los datos sería de la siguiente manera: (Tabla 5)

		<b>Factor T</b>								
		1			...			t		
<b>Sujetos</b>	<b>Factor V</b>	1	...	v	...	...	...	1	...	v
		1	$y_{111}$	.	$y_{1v1}$	...	...	...	$y_{t11}$	.
	.	.	.	.	...	...	...	.	.	.
	.	.	.	.	...	...	...	.	.	.
	.	.	.	.	...	...	...	.	.	.
	n	$y_{11n}$	.	$y_{1vn}$	...	...	...	$y_{t1n}$	.	$y_{tvn}$

**Tabla 5:** Diseño de datos de medidas repetidas con dos factores intra-sujetos.

Donde  $y_{ijk}$  es el valor de la variable respuesta del  $k$ -ésimo individuo bajo el nivel  $i$ -ésimo del factor  $T$  y el nivel  $j$ -ésimo del factor  $V$ .

El modelo lineal asociado, viene dado por:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + S_k + S_{ik} + S_{jk} + e_{ijk}$$

$$i = 1, 2, \dots, t \quad j = 1, 2, \dots, v \quad k = 1, 2, \dots, n$$

$$\sum_{i=1}^t \alpha_i = 0; \sum_{j=1}^v \beta_j = 0; \sum_{i=1}^t (\alpha\beta)_{ij} = 0 \quad \forall j; \sum_{j=1}^v (\alpha\beta)_{ij} = 0 \quad \forall i$$

$$S_j \approx N(0, \sigma_1); S_{ik} \approx N(0, \sigma_2); S_{jk} \approx N(0, \sigma_3); e_{ijk} = (0, \sigma_4)$$

$S_j, S_{ik}, S_{jk}$  y  $e_{ijk}$  son mutuamente independientes

Donde  $\mu$  representa la media poblacional de la variable respuesta,  $\alpha_i$  el efecto medio adicional debido al tratamiento  $i$  del factor  $T$ ,  $\beta_j$  el efecto medio adicional debido al nivel  $j$  del factor  $V$ ,  $(\alpha\beta)_{ij}$  efecto medio adicional a la interacción entre el nivel  $i$  del factor  $T$  y el nivel  $j$  del factor  $V$ ,  $S_k$  el efecto aleatorio del sujeto  $k$ ,  $S_{ik}$  efecto aleatorio del nivel  $i$  del factor  $T$  y el sujeto  $k$ ,  $S_{jk}$  efecto aleatorio del nivel  $j$  del factor  $V$  y el sujeto  $k$  y  $e_{ij}$  representa el error aleatorio. Además estamos suponiendo que no existe efecto interacción de orden tres entre los sujetos y los factores intra-sujetos.

De igual forma que en el caso anterior, si disponemos de  $tv$  tratamientos y  $n$  réplicas por tratamiento, este diseño lo podemos interpretar como una aproximación de un modelo univariante o como un modelo multivariante.

#### *Diseño de medidas repetidas con un factor intra-sujetos y un factor inter-sujetos.*

Al igual que definimos el factor intra-sujetos, para estos modelos se incluye un factor denominado inter-sujetos. Los factores inter-sujetos – conocido también como factores completamente aleatorizados – son aquellos que para nivel del factor se asigna a un grupo diferente de sujetos.

Por tanto, tenemos un factor  $A$  (factor inter-sujetos) con  $a$  niveles que se asigna a grupos independientes de  $n$  sujetos, de forma que tenemos  $a$  muestras aleatorias independientes de  $n$  sujetos a las que se somete a los  $t$  niveles del factor  $T$  (factor intra-sujetos). Pretendemos caracterizar el comportamiento de la variable respuesta  $Y$  sobre los  $a$  grupos a lo largo de los  $t$  niveles del factor  $T$ . La estructura del diseño queda recogida en la Tabla 6, que se muestra a continuación.

De manera que  $y_{ijk}$  es el valor de la variable respuesta del  $k$ -ésimo individuo bajo el  $i$ -ésimo nivel del factor  $A$  y el  $j$ -ésimo nivel del factor  $T$ . Observemos que al

considerar los sujetos fuente de variación sus niveles están anidados en el factor inter-sujetos *A*.

<i>Factor A</i>	<i>Sujetos</i>	<i>Factor T</i>				
		1	. . .	<i>j</i>	. . .	<i>t</i>
<i>1</i>	<i>1</i>	$y_{111}$	. . .	$y_{1j1}$	. . .	$y_{1t1}$
	.	.		.		.
	.	.	. . .	.	. . .	.
	.	.		.		.
	<i>k</i>	$y_{11k}$	. . .	$y_{1jk}$	. . .	$y_{1tk}$
	.	.		.		.
.	.	.	. . .	.	. . .	.
.	.	.		.		.
.	<i>n</i>	$y_{11n}$	. . .	$y_{1jn}$	. . .	$y_{1tn}$
.	.	.		.		.
.	.	.	. . .	.	. . .	.
.	.	.		.		.
<i>a</i>	<i>1</i>	$y_{a11}$	. . .	$y_{aj1}$	. . .	$y_{at1}$
	.	.		.		.
	.	.	. . .	.	. . .	.
	.	.		.		.
	<i>k</i>	$y_{a1k}$	. . .	$y_{ajk}$	. . .	$y_{atk}$
	.	.		.		.
.	.	.	. . .	.	. . .	.
.	.	.		.		.
.	<i>n</i>	$y_{a1n}$	. . .	$y_{ajn}$	. . .	$y_{atn}$

**Tabla 6:** Diseño de datos de medidas repetidas con un factor intra-sujetos y un factor inter-sujetos.

Siguiendo la estructura de los diseños anteriores, mostraremos el modelo matemático, quedando de la siguiente manera:

$$y_{ijk} = \mu + S_{k(i)} + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk} = \mu + S_{k(i)} + e_{ijk}$$

$$i = 1, 2, \dots, a \quad j = 1, 2, \dots, v \quad k = 1, 2, \dots, n$$

$$\sum_{i=1}^a \alpha_i = 0; \quad \sum_{j=1}^t \beta_j = 0; \quad \forall i \sum_{j=1}^t (\alpha\beta)_{ij} = 0; \quad \forall j \sum_{i=1}^a (\alpha\beta)_{ij} = 0$$

$S_{k(i)} \approx N(0, \sigma_1)$ ;  $e_{jk} \approx N(0, \sigma_2)$   $S_{k(i)}$  y  $e_{jk}$  son mutuamente independientes

Donde  $\mu$  representa la media poblacional de la variable respuesta,  $\alpha_i$  el efecto medio adicional debido al tratamiento  $i$  del factor  $A$ ,  $S_{k(i)}$  el efecto aleatorio del sujeto  $k$  en el nivel  $i$  del factor  $A$ ,  $\beta_j$  el efecto medio adicional debido al nivel  $j$  del factor  $T$ ,  $(\alpha\beta)_{ij}$  efecto medio adicional debido a la interacción del nivel  $i$  del factor  $A$  y el nivel  $j$  del factor  $T$ ,  $\mu_{ij}$  es la respuesta media bajo el nivel  $i$ -ésimo del factor  $A$  y el nivel  $j$ -ésimo del factor  $T$ ;  $e_{ij}$  representa el error aleatorio.

Si disponemos de  $m$  tratamientos y  $n$  réplicas por cada uno de los tratamientos, podemos realizar varias interpretaciones al modelo anterior, como una aproximación de un modelo univariante o como un modelo multivariante. En este caso tenemos varias opciones de interpretación para el modelo univariante mediante un diseño “*anidado-cruzado*”, un diseño “*bifactorial de bloques incompletos*” o un diseño de “*parcelas divididas*”.

En algunos casos, para simplificar el análisis cuando se involucran medidas repetidas sobre la misma unidad taxonómica se usan los polinomios ortogonales. El procedimiento consiste en generar nuevas variables a través de sumas ponderadas de las observaciones sobre el mismo individuo, por medio de los coeficientes de los polinomios y realizar con éstas el análisis de varianza tradicional (Ruiz-Ochoa *et al.*, 2006).

### 3.2.3.2. MANOVA - BILOT

Los modelos de Análisis Multivariante de la Varianza (MANOVA) son una generalización directa de los métodos univariantes. La diferencia con éstos, es que se estudia una respuesta que viene dada por un vector para cada observación, en vez de una variable aleatoria escalar (Tusell, 2008).

Las técnicas Biplot, son técnicas estadísticas de análisis multivariante, propuestas por Gabriel (1971) como técnicas de representación. De igual forma que un

diagrama de dispersión muestra la distribución conjunta de dos variables, un biplot representa tres o más variables simultáneamente (Gabriel y Odoroff, 1990).

La técnica conocida por MANOVA-Biplot, nos permite encontrar diferencias ente grupos cuando estamos trabajando con más de una variable respuesta, por lo que es una técnica de análisis estadístico multivariante. El MANOVA-Biplot de una vía nació de la mano de Gabriel (1995), conocidos también como Biplot Canónicos (Vicente-Villardón, 1992; Gower and Hand, 1996). Los diseños de dos vía para el MANOVA Biplot, fue generalizado por Amaro y col. (2004).

Puesto que es de nuestro interés, ya que se aplicará posteriormente, desarrollaremos más detenidamente la técnica del MANOVA Biplot de una vía.

El MANOVA-biplot de una vía, lo podemos entender como una representación Biplot de los resultados de un MANOVA. Con la utilización de esta técnica se permite realizar una representación ponderada de la matriz de medias que consigue las direcciones con máximo poder discriminante entre los grupos. Esta técnica pone de manifiesto las principales diferencias que se producen entre los distintos grupos, al igual que hacer inferencia sobre las variables canónicas y originales mediante regiones de confianza que se sitúan sobre los puntos medios de cada grupo. (Amaro *et al.*, 2004).

Siguiendo las ideas de Vicente-Villardón (2004) y Amaro y col. (2004), partimos de una matriz que contiene la información de  $n$  individuos – muestras – y  $p$  variables (centrada). Los  $n$  individuos – muestras – se encuentran divididos en  $k$  clases mutuamente excluyentes con  $n_i$  individuos cada una de ellas.

$$X = \begin{pmatrix} x_{11} & \cdots & x_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & \cdots & x_{np} \end{pmatrix} \longrightarrow \begin{pmatrix} X_1 = (x_{ij}^1)_{K_1} \\ \vdots \\ X_k = (x_{ij}^k)_{K_k} \end{pmatrix}$$

Donde  $i = 1, 2, \dots, k$

$$n = n_1 + n_2 + \dots + n_k$$

El modelo MANOVA para  $p$  variables, lo podemos expresar de una forma matricial de la siguiente manera:

$$X = AB + U$$

donde  $X$  corresponde con la matriz de rango  $np$  de las observaciones,  $A$  una matriz de diseño de rango  $r$ ,  $B$  es la matriz de parámetros desconocidos, y por último la matriz  $U$ ,  $np$ , contiene los residuales.

La hipótesis lineal general multivariante es:

$$H_0 \equiv CB = 0$$

donde la matriz  $C$ , tiene dimensión  $gp$  y rango  $g \leq r$ .

La matriz  $C$ , la podemos elegir de diversas maneras, dependiendo de las hipótesis que estemos estudiando. El propósito es la construcción de una representación de filas (grupos) y columnas (variables), de forma que los grupos se encuentren separados con el máximo poder discriminante entre ellos.

En el caso de los MANOVA-Biplot de una vía, los podemos construir a partir de la descomposición en valores singulares generalizada:

$$R^{-1/2} \widehat{D} E^{-1/2} = U D_\lambda V'$$

siendo  $R = C(A'A)^{-1}C'$  y  $\widehat{D} = C\widehat{B} = C(A'A)^{-1}A'X$ . La matriz  $E$  es la suma de cuadrados y productos “dentro” de los grupos, y los  $\lambda$ s son los valores propios correspondientes según el proceso de descomposición en valores singulares.

A partir de aquí podemos tomar los marcadores para las filas y columnas, siendo estos:

- Marcadores para las filas (grupos):  $P = R^{1/2}UD_\lambda$
- Marcadores para las columnas (variables):  $Q = E^{1/2}V$

En el MANOVA-Biplot sólo tiene sentido el JK-Biplot canónico, debido a que en él los grupos están formados por las filas que tienen buena calidad de representación y reproduce los elementos de la matriz original.

Algunas de las principales características con las que cuenta este método son:

- Si proyectamos los individuos sobre la representación canónica las coordenadas en el primer eje representan a los valores de los individuos sobre la combinación lineal de las variables originales que produce la mayor F de Snedecor univariante.
- Descripción de la discriminación entre grupos a partir de las variables originales, a través de las proyecciones de los puntos fila sobre los puntos columna.
- La bondad de ajuste de las predicciones se mide a través de la varianza de cada una de las variables explicada por los factores.
- Descripción de las diferencias entre los vectores de medias en un MANOVA

Como principales inconvenientes que puede presentar es la utilización de un software específico y especializado para su realización, al igual que la matriz de covarianzas dentro de los  $k$  grupos deben de ser iguales.

### 3.2.3.3. ANÁLISIS DE LA REDUNDANCIA (RDA)

El análisis de redundancia es la extensión de la regresión múltiple en el contexto de la modelización de datos de respuesta multivariante, y fue propuesto inicialmente por Rao (1964) y posteriormente Van der Wollenberg, en 1977 hizo nuevas aportaciones al mismo. El término redundancia quiere decir varianza explicada y se debe a Gittins, en 1985.

Este análisis es de tipo asimétrico, siendo  $Y$  la matriz de variables respuesta y  $X$  es la matriz de variables explicativas. Cada eje de ordenación canónica corresponderá a

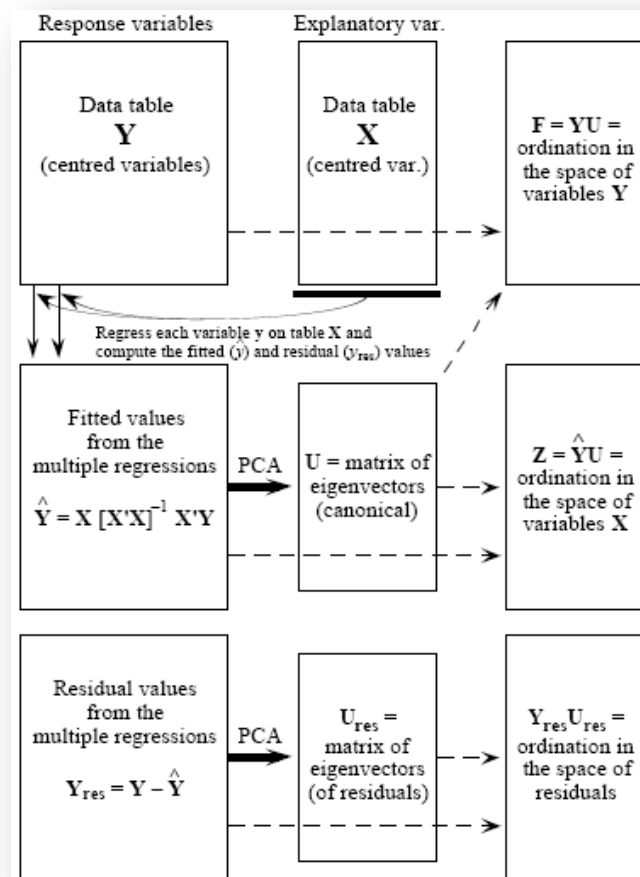


una dirección en el espacio de respuestas de  $Y$ , el cual está correlacionado de forma máxima con una combinación lineal de las variables  $X$ .

El análisis se basa fundamentalmente en dos etapas:

- 1) Se efectúan regresiones de cada variable de  $Y$  sobre todas las variables de la matriz  $X$  y se calculan los valores estimados.
- 2) Se lleva a cabo un análisis de componentes principales sobre la matriz de valores estimados para obtener los valores y vectores propios.

Esquemáticamente el proceso lo podemos ver en la Figura 2.



**Figura 2:** Análisis de Redundancia en dos etapas:(1) regresión de cada variable en  $Y$  sobre todas las variables de  $X$  calculando los valores estimados; (2) se lleva a cabo un ACP de la matriz de valores estimados para obtener los vectores y valores propios. Así se obtienen dos tipos de ordenaciones, una ( $YU$ ) en el espacio de las variables respuesta  $Y$ , y otra ( $\hat{Y}U$ ) en el espacio de las variables explicativas  $X$ . Además puede obtenerse otra ordenación mediante la técnica ACP utilizando la matriz de residuos.

Caracterizando el método de una forma algebraica tenemos:

Sea  $X_{n \times m}$  la matriz de variables explicativas, con  $m$  variables y  $n$  objetos, y sea  $Y_{n \times p}$  la matriz respuesta formada por  $p$  variables y los mismos  $n$  objetos. Supondremos que las matrices están centradas por columnas y si las variables no son homogéneas en cuanto a las escalas de medida están estandarizadas. De esta forma además los términos independientes en las regresiones desaparecerían y la interpretación es más sencilla. También podemos suponer que se han realizado las transformaciones necesarias a las variables para que existan relaciones lineales entre ellas y de alguna forma que sean lo más simétricas posibles para reducir el efecto de los posibles outliers.

Para cada variable respuesta en la matriz  $Y$  calculamos una regresión lineal múltiple sobre todas las variables de  $X$ , obteniendo la siguiente ecuación en forma matricial que corresponde a las estimaciones:

$$b = [X'X]^{-1}X'y$$

por lo que la ecuación que corresponde al conjunto de todas las variables respuesta será:

$$B = [X'X]^{-1}X'Y$$

con  $B$  la matriz de coeficientes de regresión estimados de todas las variables respuesta de  $Y$  sobre los regresores  $X$ . Este proceso se llama "Regresión Lineal Multivariante" (Finn, 1974) y se puede calcular con paquetes estadísticos como SAS.

Por tanto los valores ajustados se obtienen de la expresión  $\hat{Y} = XB$ . Y sustituyendo en esta ecuación el valor de  $B$  queda:

$$\hat{Y} = X[X'X]^{-1}X'Y$$

Como las variables en las matrices  $X$  e  $Y$  están centradas en sus respectivas medias, no tendríamos término independiente en los vectores de  $B$ . Además los vectores de  $\hat{Y}$  están centrados y si  $m=n$ , que es el caso en el que  $X$  es cuadrada puede demostrarse que las regresiones múltiples explican completamente las variables de la matriz  $Y$ , es decir,  $\hat{Y} = Y$ .

La matriz de covarianzas de los valores estimados  $\hat{Y}$  es:

$S_{\hat{Y}\hat{Y}} = \left(\frac{1}{n-1}\right) \hat{Y}'\hat{Y} = \left(\frac{1}{n-1}\right) Y'X[X'X]^{-1}X'X[X'X]^{-1}X'Y = S_{YX}S_{XX}^{-1}S'_{YX}$ , sustituyendo el valor de  $\hat{Y}$  en la primera igualdad, siendo  $S_{YY}$  la matriz ( $p \times p$ ) de covarianzas de las variables respuestas,  $S_{XX}$  de orden ( $m \times m$ ) la matriz de covarianzas entre los regresores (que si las variables están estandarizadas sería  $R_{XX}$ ) y  $S_{YX}$  de orden ( $p \times m$ ) la matriz de covarianzas entre ambas matrices.

El siguiente paso del desarrollo es someter a la matriz  $\hat{Y}$  de valores estimados a un análisis de componentes principales para tratar de reducir la dimensionalidad de la solución, lo cual corresponde a resolver la ecuación:

$$(S_{\hat{Y}\hat{Y}} - \lambda_k I)u_k = 0, \text{ o bien } (S_{YX}S_{XX}^{-1}S'_{YX} - \lambda_k I)u_k = 0$$

Esta ecuación es la que se conoce como ecuación del análisis de redundancia y en función de los programas expresan los valores propios de diferentes formas, de forma explícita, como una fracción de la varianza total de la matriz  $Y$ , etc...

La matriz que contiene los vectores canónicos normalizados  $u_k$  se suele llamar  $U$  y es de orden  $p \times p$ . Ellos muestran las contribuciones de los descriptores en la matriz  $\hat{Y}$  a los diferentes ejes canónicos.

En cuanto a la ordenación de las observaciones en el espacio de las variables respuesta, se puede obtener directamente de la matriz centrada  $Y$  proyectándola sobre los ejes canónicos:

$$F = YU.$$

Los vectores ordenados, es decir, las columnas de la matriz  $F$  se les llama "site scores". Estos vectores tienen varianzas parecidas, aunque no iguales a los valores propios.

La ordenación de los objetos en el espacio  $X$  se obtiene de la siguiente forma:

$$Z = \hat{Y}U = XB U$$

Estos vectores ordenados (columnas de  $Z$ ), puesto que son combinación lineal de las variables  $X$ , se les llama "*fitted site scores*". Tienen varianzas iguales a los correspondientes valores propios.

La correlación  $r_k$  entre los vectores ordenados en los espacios  $Y$  y  $X$  para la  $k$ -ésima dimensión es lo que en algunos paquetes estadísticos, como CANOCO denominan correlación entre especies-variables ambientales.

Hay una cuestión importante para la interpretación de los resultados de esta técnica y es la contribución de las variables explicativas  $X$  a los ejes de ordenación canónica. Se pueden considerar tanto los coeficientes de las regresiones estimadas como los coeficientes de correlación.

La construcción de diagramas biplot relativos al RDA puede consultarse en detalle en ter Braak y Looman (1994), al igual que los tipos de escalado de los mismos que condicionan los distintos tipos de representaciones. La elección de unos u otros dependerá del énfasis que uno quiera que tenga el biplot, es decir, mostrar las distancias entre objetos o las correlaciones entre variables. Cuando la mayoría de las variables explicativas son de tipo binario se utilizará un tipo de escalamiento y si la mayoría de ellas son cuantitativas se optará por otro diferente.

En el caso de que  $Y$  contenga sólo una única variable respuesta el análisis de redundancia no es más que un análisis de regresión múltiple de tipo lineal.

---

---

## 4 - RESULTADOS

---

---

## 4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y VARIABLES

---

Contamos con 5 grupos de variables. Estos grupos, hacen referencia a las propiedades del suelo, desde el punto de vista químico, bioquímico y microbiológico, estando diferenciados de la siguiente manera:

- ✚ Propiedades del suelo del tipo Bioquímico
  - Variables Bioquímicas 1 (8 variables)
  - Variables Bioquímicas 2 (5 variables)
- ✚ Propiedades del suelo del tipo Microbiológico
  - Variables Microbiológicas 1 (6 variables)
  - Variables Microbiológicas 2 (18 variables)
- ✚ Propiedades del suelo del tipo Químico
  - Variables Químicas (6 variables)

La muestra de que disponemos para la realización de los análisis, cuenta con un total de 240 muestras. De todas ellas, las 120 primeras, corresponden a las extraídas durante el año 2009, en las estaciones de primera, verano y otoño. Y su vez, cada estación cuenta con un total de 40 muestras para los diferentes tratamientos de siembra y fertilización, correspondiendo 20 de ellas a un tratamiento sin fertilización (-P) y a las restantes les fue aplicado un fertilizante fosfatado (+P). Dentro de cada tratamiento de fertilización, a su vez, contamos con 5 tratamientos de siembra diferentes (T1 – T5), aplicado cada uno de ellos sobre 4 parcelas diferentes.

Para la realización de los análisis, no se van a utilizar la totalidad de las variables, centrándonos principalmente – debido a la fundamentación del estudio – en las variables que miden las propiedades del suelo de tipo bioquímico y microbiológico, en especial, las identificadas como bioquímicas 1 y microbiológicas 1.

### 4.1.1. PROPIEDADES DEL SUELO DEL TIPO MICROBIOLÓGICO (*MICROBIOLÓGICAS 1*)

Las variables microbiológicas, hacen referencia a la biomasa bacteriana total presente en el suelo, y a la abundancia relativa de 5 grupos de microorganismos, se encuentran caracterizadas por el siguiente grupo de variables:

- Biomasa Microbiana (**BiomM**)
- Bacterias Gram Positivas (**G +**)
- Actinobacterias (**Actin**)
- Bacterias Gram Negativas (**G —**)
- Hongos Saprofitos (**HSapr**)
- Hongos Micorrízicos Arbusculares (**HMA**)

En un primer análisis -meramente descriptivo- mostraremos la representación de los valores medios, acompañados de su error estándar, de cada una de las variables en las diferentes estaciones, para observar los comportamientos de los citados valores medios, en las diferentes estaciones del estudio, que recordemos son: primavera, verano y otoño.

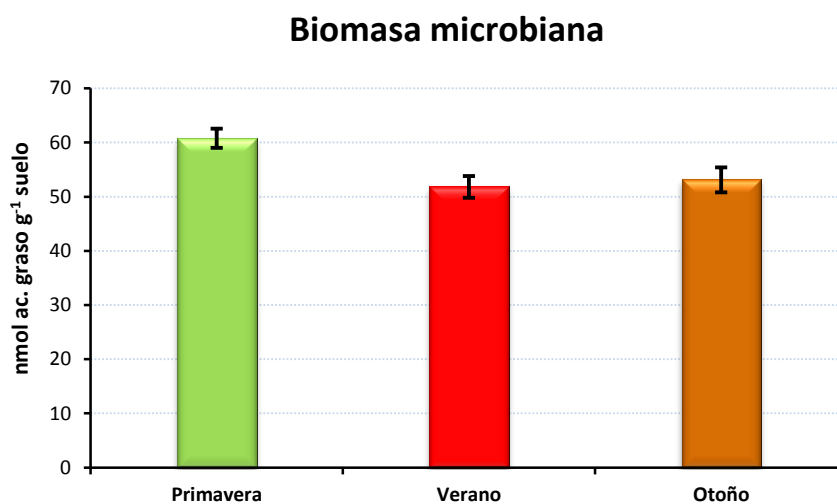
Posteriormente, se mostrará una representación que añade a la anterior, los distintos tratamientos tanto de siembra como fertilización, viendo como pueden variar la relación con las estaciones.

En la siguiente tabla (Tabla 7), se encuentran los valores medios y error estándar, al igual que los intervalos de confianza al 95% para la media, de cada una de las variables microbiológicas utilizadas en el análisis.

	Media	ESM	L.I. (95%)	L.S. (95%)
<b>Primavera</b>				
Biomasa Microbiana	60,79	1,79	57,27	64,31
Bacterias Gram +	13,46	0,26	12,96	13,97
Actinobacterias	4,79	0,11	4,57	5,02
Bacterias Gram —	17,23	0,23	16,78	17,68
Hongos Saprofitos	16,80	0,36	16,10	17,50
Hongos Micorrícicos Arbusculares	20,84	0,84	19,21	22,48
<b>Verano</b>				
Biomasa Microbiana	51,82	2,01	47,87	55,77
Bacterias Gram +	14,39	0,31	13,77	15,00
Actinobacterias	4,79	0,12	4,56	5,03
Bacterias Gram —	17,04	0,24	16,57	17,51
Hongos Saprofitos	16,07	0,36	15,37	16,77
Hongos Micorrícicos Arbusculares	20,77	1,04	18,73	22,81
<b>Otoño</b>				
Biomasa Microbiana	53,12	2,30	48,61	57,64
Bacterias Gram +	14,05	0,35	13,26	14,74
Actinobacterias	4,89	0,14	4,62	5,16
Bacterias Gram —	16,84	0,26	16,34	17,35
Hongos Saprofitos	15,37	0,36	14,67	16,06
Hongos Micorrícicos Arbusculares	23,12	1,15	20,88	25,37

**Tabla 7:** Valores medios, error estándar e intervalo de confianza (95%) para las variables microbiológicas 1 en las distintas estaciones del estudio.

#### 4.1.1.1. BIOMASA MICROBIANA (*BIOMM*)



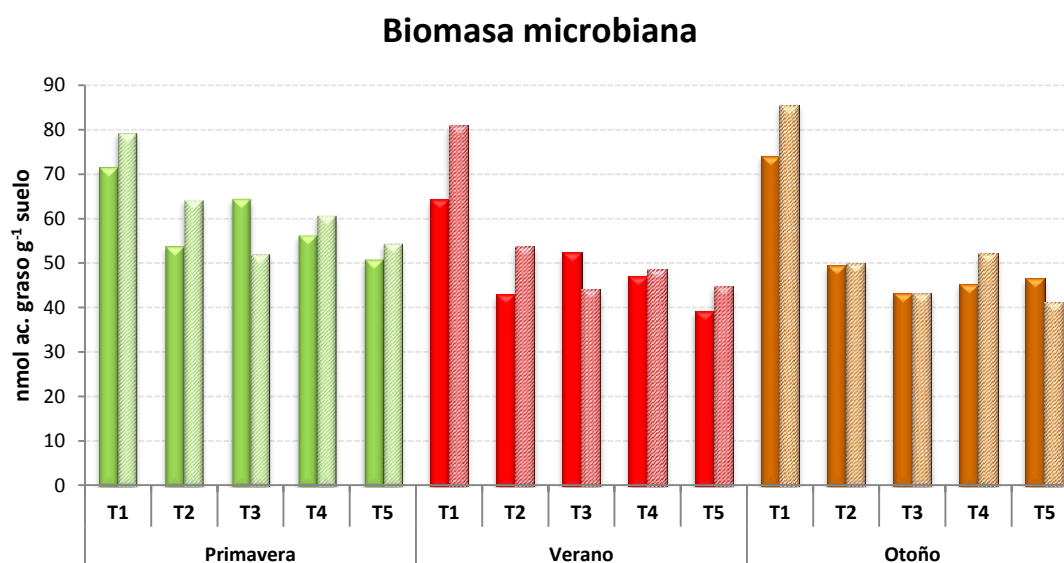
**Figura 3:** Representación de los valores medios y error estándar de la biomasa microbiana por estaciones.

La biomasa microbiana (Figura 3) - nos indica abundancia de microorganismos en el suelo, sin distinción del grupo al que pertenecen - presenta valores superiores en media, en primavera (60,79 nmol ac. graso g<sup>-1</sup> suelo), respecto del verano (51,82 nmol ac. graso g<sup>-1</sup> suelo)



y el otoño (53,12 nmol ac. graso g<sup>-1</sup> suelo). Estos últimos presentan unos valores más similares entre ellos. En cuanto a la dispersión que presentan los datos, el error estándar de la media, adquiere unos valores similares en las tres estaciones, lo cuál nos indica debido a sus valores bajos la poca variabilidad en las estaciones.

Si tenemos en cuenta, además los tratamientos de siembra y fertilización (Figura 4), nos encontramos, con una mayor cantidad, en aquellas parcelas a las que se las aplico una siembra de monocultivo en gramíneas (T1), pero de una forma tímidamente superior, si se ha aplicado el fertilizante fosfatado (+P) (Barras rayadas). Esto puede ser debido a al mayor crecimiento radical que produce el fósforo en la gramínea, lo que causa un aumento de las poblaciones de microorganismos asociados a ellas.

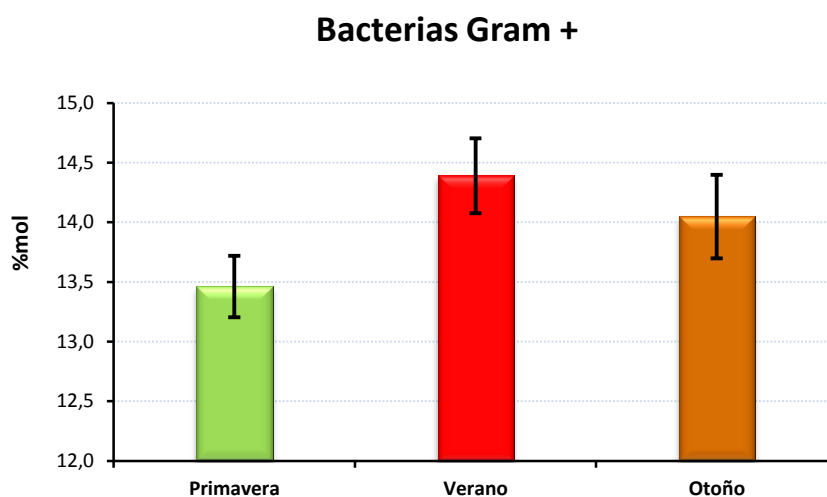


**Figura 4:** Representación de los valores medios de la biomasa microbiana, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización

#### 4.1.1.2. BACTERIAS GRAM POSITIVAS (G+)

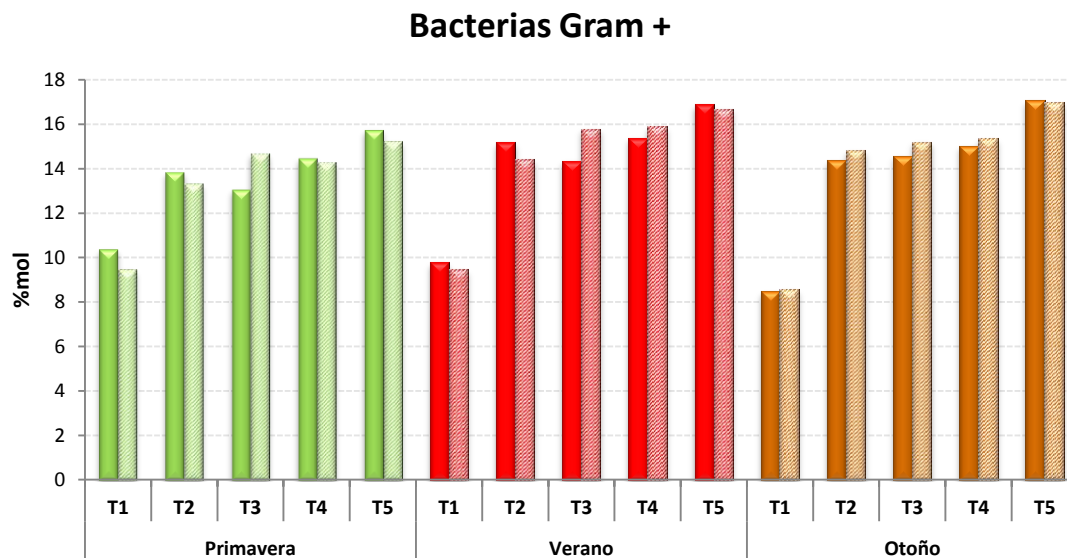
Las Bacterias Gram Positivas, son una de las grandes divisiones en que se distinguen las bacterias, y son las que generalmente resisten bien los estreses ambientales, por ser capaces de formar esporas. En este caso (Figura 5), presenta unos

valores mayores en el verano (14,39 %mol), seguidos en la estación de otoño (14,05 %mol) y unos valores inferiores en la primavera (13,46 %mol). Esto puede ser debido a su capacidad de resistir el calor y la sequía por la propiedad de esporulación antes mencionada. La dispersión, observamos que un poco mayor en verano y otoño (0,31 y 0,35 respectivamente), respecto a la primavera (0,26) teniendo por tanto una variabilidad pequeña en los datos dentro de las estaciones.



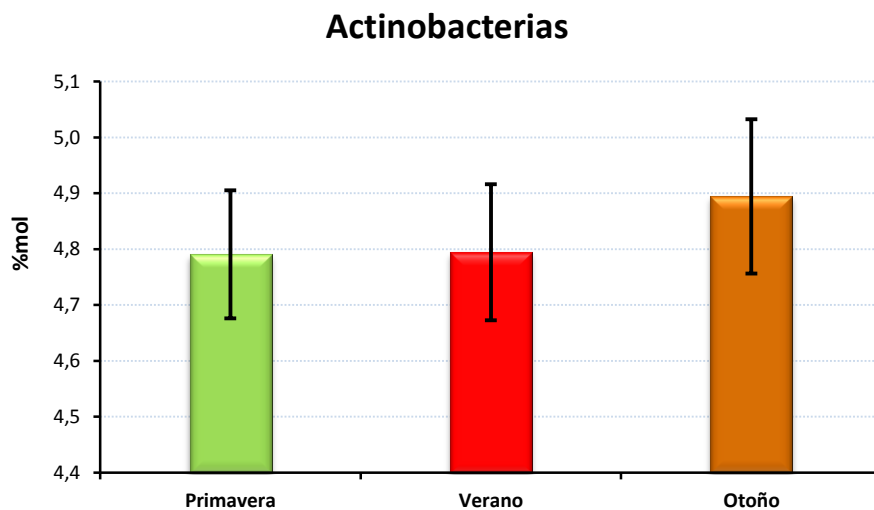
**Figura 5:** Representación de los valores medios y error estándar de las Bacterias Gram Positivas por estaciones.

En la Figura 6, observamos una tendencia creciente, en las tres estaciones, a medida que varía el tratamiento de siembra, ya sea en las parcelas sin fertilizar (Barras lisas) o en las parcelas fertilizadas (Barras rayadas). Lo que nos indica, que a medida que pasamos de un monocultivo de gramínea (T1) hacia un monocultivo de leguminosa (T5), el porcentaje molar de estas bacterias aumenta, encontrándose en una mayor proporción en suelo.



**Figura 6:** Representación de los valores medios de las Bacterias Gram Positivas, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización

#### 4.1.1.3. ACTINOBACTERIAS (*ACTIN*)

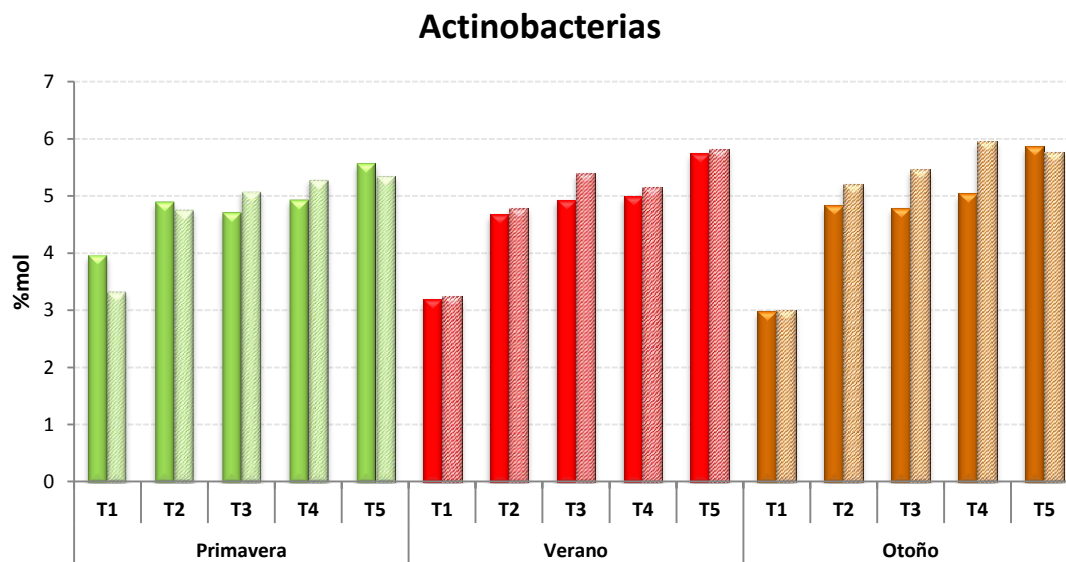


**Figura 7:** Representación de los valores medios y error estándar de las Actinobacterias por estaciones.

A diferencia que las dos anteriores, las Actinobacterias (Figura 7) tienen una presencia mayor en otoño (4,89 %mol), que en primavera (4,79 %mol) y verano (4,79 %mol), estas últimas presentan la misma proporción. Esto puede darse, debido a que tienden a

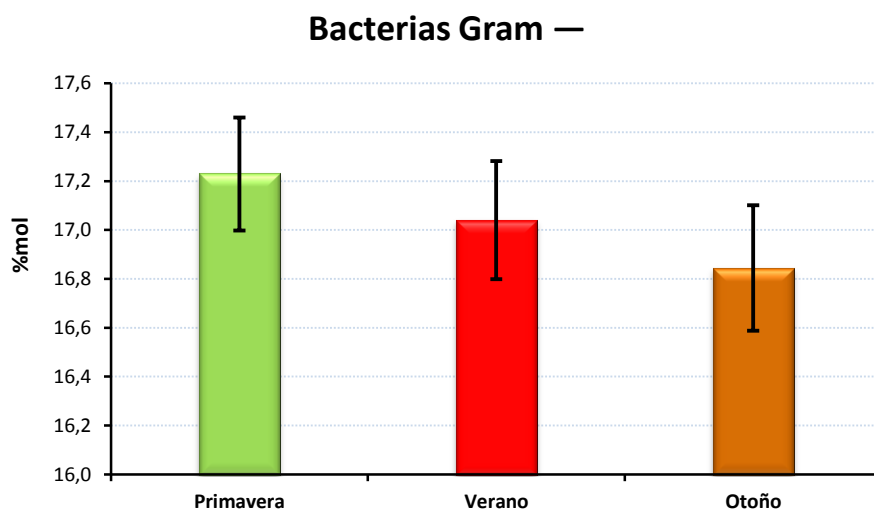
aprovecharse más que otros microorganismos los residuos orgánicos de las plantas cuando estas entran en fase de marchitamiento.

De una forma muy similar, la proporción de Actinobacterias en el suelo, es mayor cuando hay un mayor porcentaje de leguminosas en el suelo. (Figura 8)



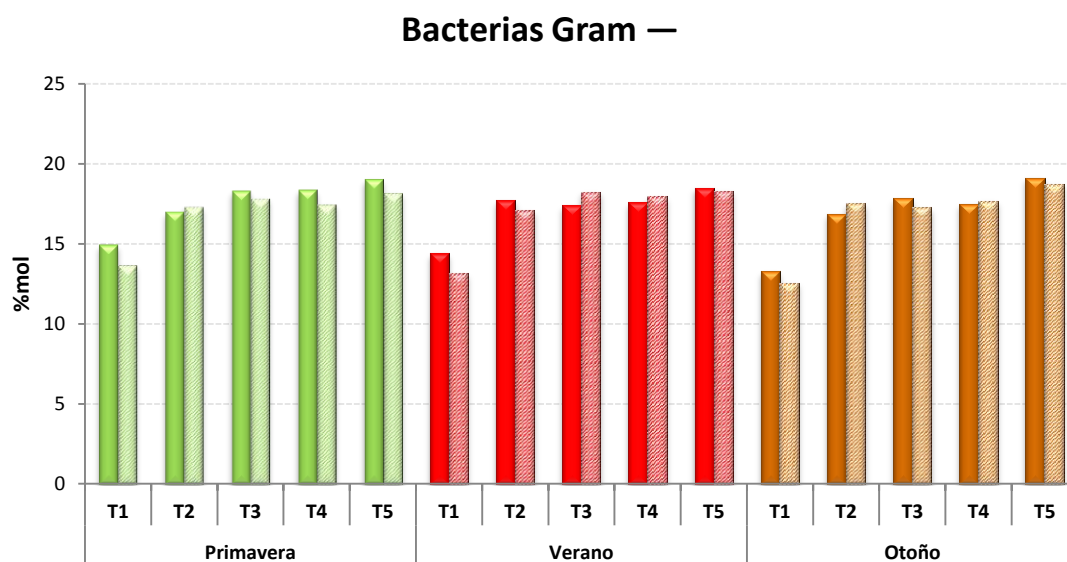
**Figura 8:** Representación de los valores medios de las Actinobacterias, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.

#### 4.1.1.4. BACTERIAS GRAM NEGATIVAS (G<sup>-</sup>)



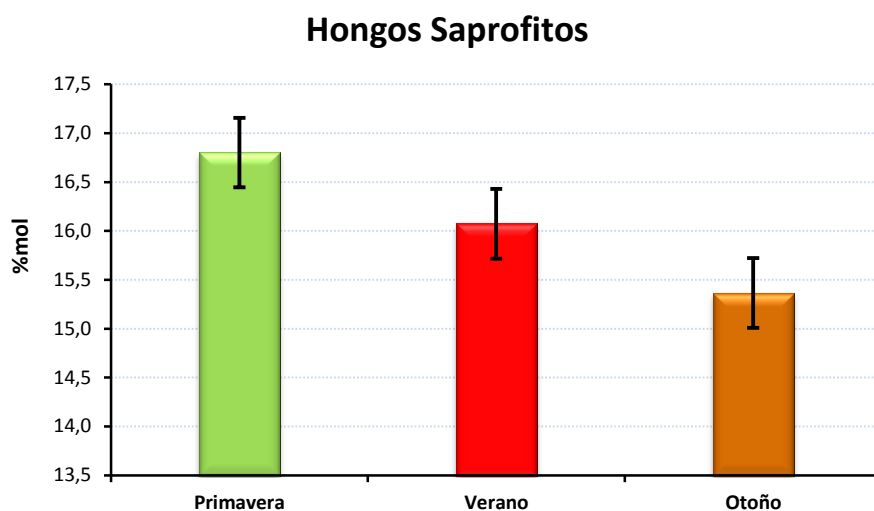
**Figura 9:** Representación de los valores medios y error estándar de las Bacterias Gram Negativas por estaciones.

En cuanto a las Bacterias Gram Negativas (Figura 9), observamos un decremento a medida que pasan las estaciones, con una dispersión similar en ellas. El porcentaje molar de este tipo de bacterias es superior en la estación de primavera (17,23 %mol), seguido del verano (17,04 %mol) y otoño (16,84 %mol), debido a su alta capacidad proliferativa cuando las condiciones de temperatura y humedad son óptimas. En relación a los tratamientos (Figura 10), sigue una tendencia similar que en los casos anteriores. Cuando estamos en el caso del monocultivo de gramíneas (T1), tenemos una menor proporción, y según variamos el tratamiento aumenta, encontrándose en proporciones similares para el resto.



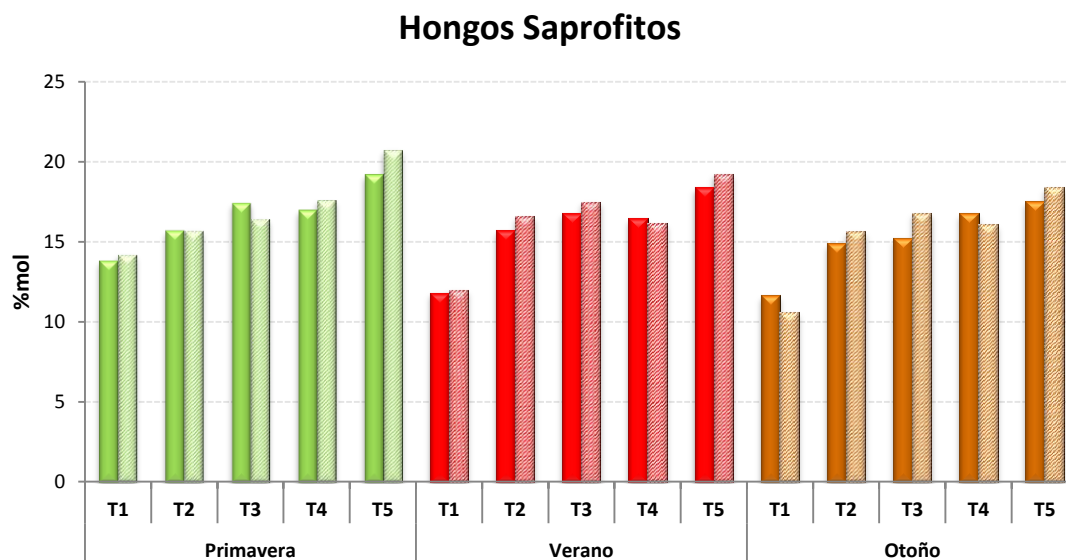
**Figura 10:** Representación de los valores medios de las Bacterias Gram Negativas, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamiento de fertilización.

#### 4.1.1.5. HONGOS SAPROFITOS (*HS<sub>APR</sub>*)



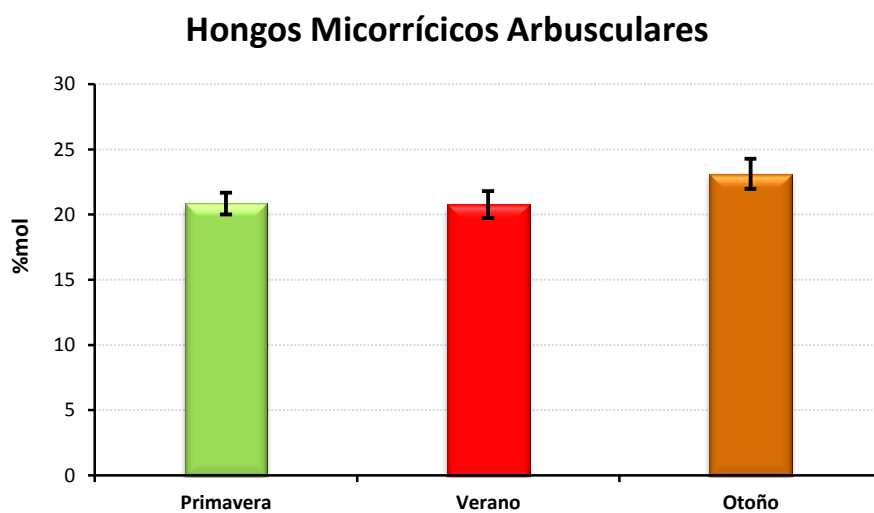
**Figura 11:** Representación de los valores medios y error estándar de los Hongos Saprofitos por estaciones.

En la Figura 11, nos encontramos con un comportamiento similar, decreciente a medida que pasan las estaciones, además de una dispersión similar. La primavera (16,80 %mol) presenta el porcentaje molar más elevado, ya que estos microorganismos necesitan una estacionalidad muy acusada en su crecimiento, luego el porcentaje decrece en verano (16,07 %mol) y otoño (15,37 %mol). En la Figura 12, vemos como estos porcentajes varían en función del tratamiento de siembra y fertilización. Nuevamente, la menor proporción la encontramos cuando estamos trabajando sobre una diversidad vegetal únicamente de gramíneas (T1), y a medida que variamos estos porcentajes de siembra, vemos que la proporción aumenta, siendo mayor en el monocultivo de leguminosas (T5), aunque la diferencia no es muy destacada.



**Figura 12:** Representación de los valores medios de los Hongos Saprofitos, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.

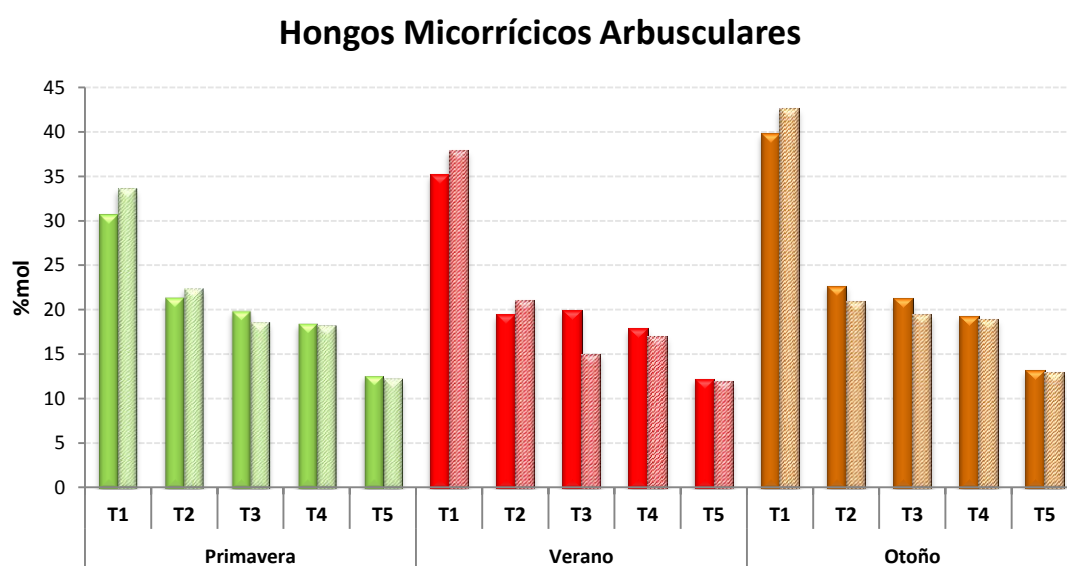
#### 4.1.1.6. HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES (HMA)



**Figura 13:** Representación de los valores medios y error estándar de los Hongos Micorrícicos Arbusculares por estaciones.

Este tipo de microorganismo, como podemos ver (Figura 13), se comporta prácticamente igual en las tres estaciones, con una dispersión pequeña. Se observa una proporción un poco mayor en el otoño (23,12 %mol), frente a primavera y verano (20,84

y 20,77 %mol respectivamente), no siendo unas diferencias muy pronunciadas. Por el contrario, si observamos los tratamientos de siembra y fertilización (Figura 14), vemos una clara y notable diferencia, respecto a los otros microorganismos. Se observa un porcentaje muy superior, cuando se presta atención a monocultivos de gramíneas (T1), que decrece notablemente cuando interactúan las leguminosas, teniendo el menor porcentaje en el monocultivo de leguminosa (T5). Esto puede ser causado porque son microorganismos viven como simbioses en el interior de las raíces, y al ser más densa la masa radicular de las gramíneas, propicia que ellos también, sean más abundantes



**Figura 14:** Representación de los valores medios de los Hongos Micorrícicos Arbusculares, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.

#### 4.1.2 PROPIEDADES DEL SUELO DEL TIPO BIOQUÍMICO (BIOQUÍMICAS 1)

Las variables bioquímicas nos muestran las propiedades del suelo en relación con la actividad que tienen los microorganismos en el reciclado de los nutrientes. Este grupo, lo encontramos caracterizadas por las siguientes variables:



- Glucosidasa (**GLasa**)
- Fosfatasa (**FOasa**)
- Arilsulfatasa (**ARasa**)
- Ureasa (**URasa**)
- Deshidrogenasa (**DEasa**)
- Mineralización de Nitrógeno (**MinN**)
- Respiración basal (**Resp**)
- Coeficiente Metabólico (**qCO<sub>2</sub>**)

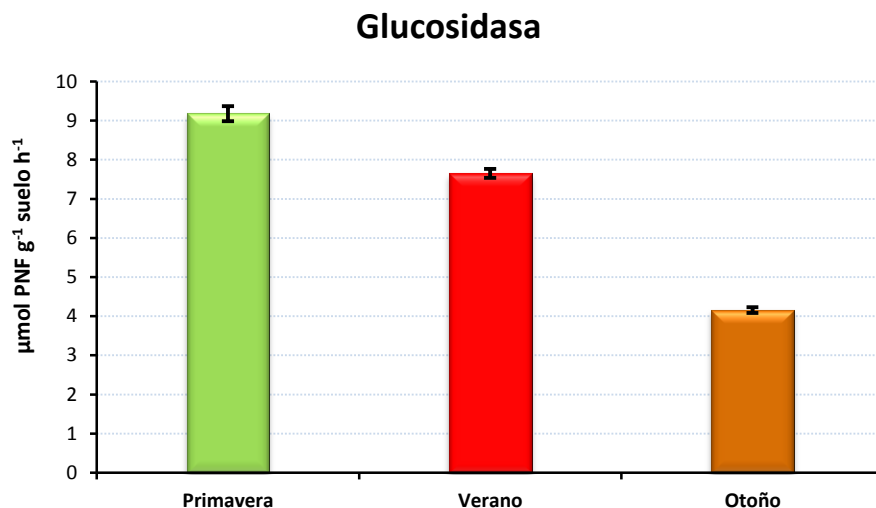
De forma similar a la anterior, procederemos a mostrar los valores medios y su error estándar, para cada una de las variables, a fin de ver su comportamiento en las distintas estaciones del estudio de forma global. Mostraremos también la representación, teniendo en cuenta tanto el tratamiento de siembra como el tratamiento de fertilización, para ver su evolución en las tres estaciones.

En la Tabla 8, se muestran los valores medio, acompañados de su error estándar para la media, y el intervalo de confianza para las estaciones de primavera, verano y otoño de cada una de las variables bioquímicas 1 del estudio.

	Media	ESM	L.I. (95%)	L.S. (95%)
<b>Primavera</b>				
Glucosidasa	9,18	0,19	8,80	9,56
Fosfatasa	18,85	0,47	17,92	19,78
Arilsulfatasa	2,33	0,05	2,23	2,44
Ureasa	0,17	0,01	0,16	0,18
Deshidrogenasa	1,56	0,09	1,38	1,74
Mineralización de Nitrógeno	0,47	0,03	0,41	0,53
Respiración Basal	16,77	0,46	15,87	17,68
Coeficiente Metabólico	24,04	0,80	22,47	25,61
<b>Verano</b>				
Glucosidasa	7,65	0,12	7,42	7,88
Fosfatasa	12,81	0,26	12,30	13,32
Arilsulfatasa	4,90	0,15	4,61	5,19
Ureasa	0,19	0,00	0,18	0,20
Deshidrogenasa	2,24	0,15	1,95	2,54
Mineralización de Nitrógeno	0,17	0,02	0,14	0,20
Respiración Basal	13,22	0,33	12,58	13,86
Coeficiente Metabólico	24,34	1,37	21,66	27,03
<b>Otoño</b>				
Glucosidasa	4,16	0,07	4,01	4,30
Fosfatasa	10,33	0,24	9,87	10,80
Arilsulfatasa	2,33	0,04	2,26	2,40
Ureasa	0,22	0,01	0,20	0,24
Deshidrogenasa	1,58	0,04	1,49	1,66
Mineralización de Nitrógeno	0,22	0,01	0,20	0,24
Respiración Basal	9,74	0,29	9,17	10,32
Coeficiente Metabólico	17,10	0,80	15,53	18,66

**Tabla 8:** Valores medios, error estándar e intervalo de confianza (95%) para las variables biológicas 1 en las distintas estaciones del estudio.

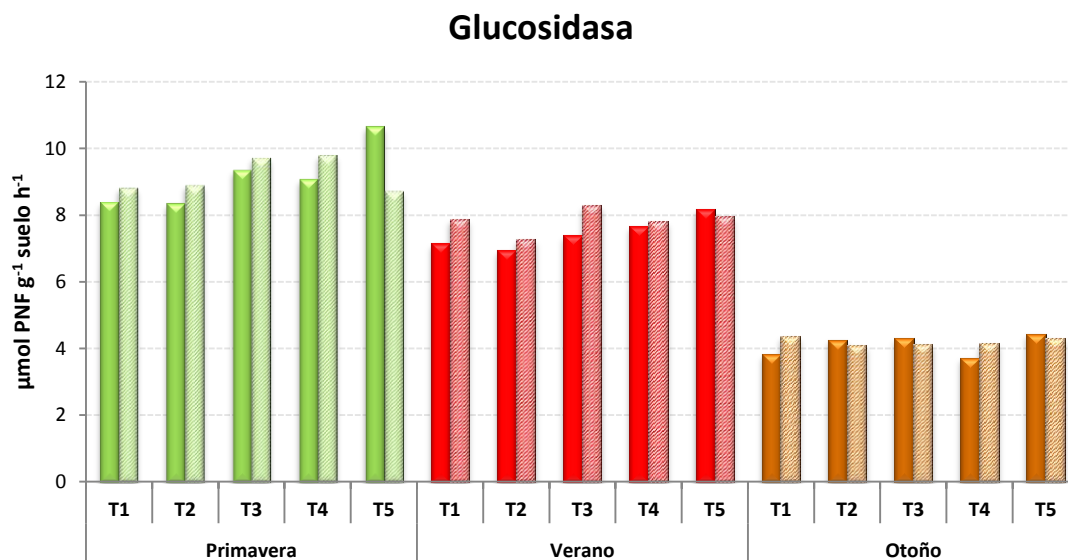
#### 4.1.2.1. GLUCOSIDASA (GLASA)



**Figura 15:** Representación de los valores medios y error estándar de la Glucosidasa por estaciones.

La glucosidasa nos mide la tasa de degradación de carbohidratos. Se observa (Figura 15) una tendencia decreciente a medida que pasamos de la primavera al otoño. Esto puede estar causado, por que el crecimiento de los microorganismos, en su conjunto, es mayor en primavera que en las otras estaciones y, para mantener su tasa de crecimiento alta, necesitan obtener carbohidratos y, por tanto, producir mayores cantidades de glucosidasa, esta es la razón de que presenten un valor medio en primavera ( $9,18 \mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$ ) superior a verano ( $7,65 \mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$ ) y otoño ( $4,16 \mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$ ). En cuanto a la dispersión, observamos, una variación pequeña en todos los casos, siendo un poco mayor en primavera, que en el resto de estaciones.

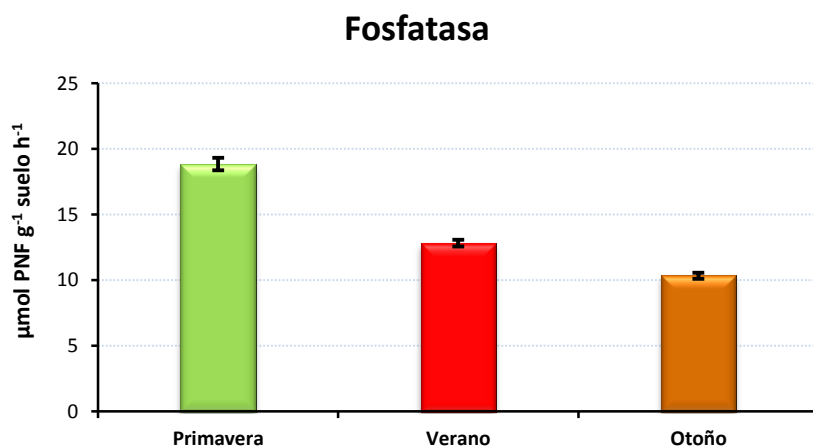
Teniendo en cuenta los tratamientos de siembra y fertilización (Figura 16), no se observan grandes diferencias en relación a esta variable, presentando valores similares cuando utilizamos diferentes tratamientos de siembra.



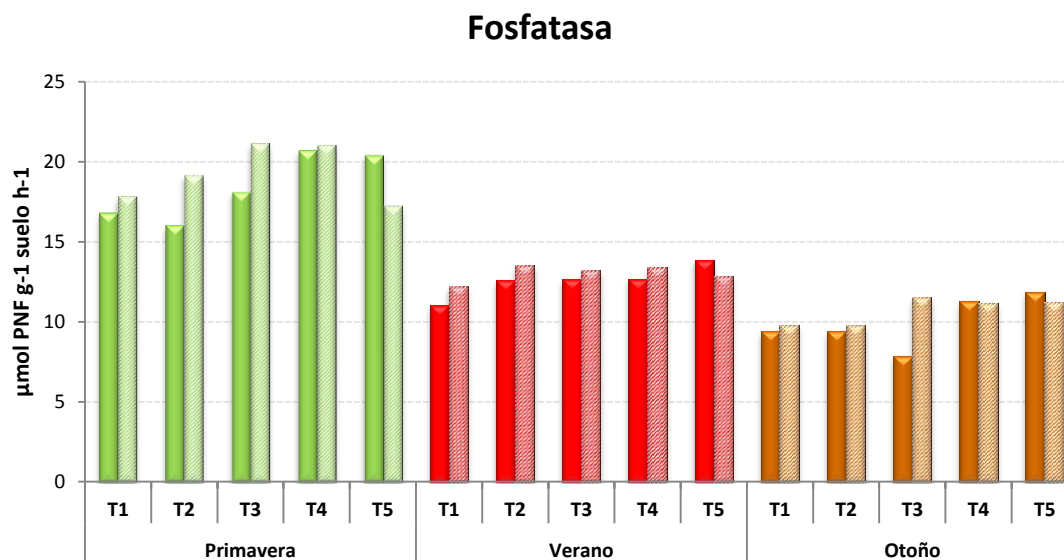
**Figura 16:** Representación de los valores medios de la Glucosidasa, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamiento de fertilización.

#### 4.1.2.2. FOSFATASA (FOASA)

La fosfatasa, nos indica la capacidad de los microorganismos para solubilizar el fósforo del suelo. Al igual que en el caso de la glucosidasa, los valores mayores los encontramos en la primavera ( $18,85 \mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{suelo l}^{-1}$ ), seguidos del verano ( $12,81 \mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{suelo l}^{-1}$ ) y otoño ( $10,33 \mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{suelo l}^{-1}$ ), como podemos observar en la Figura 17. Respecto a la dispersión presentada por los datos, observamos que las variaciones son pequeñas en las diferentes estaciones.



**Figura 17:** Representación de los valores medios y error estándar de la Fosfatasa por estaciones.

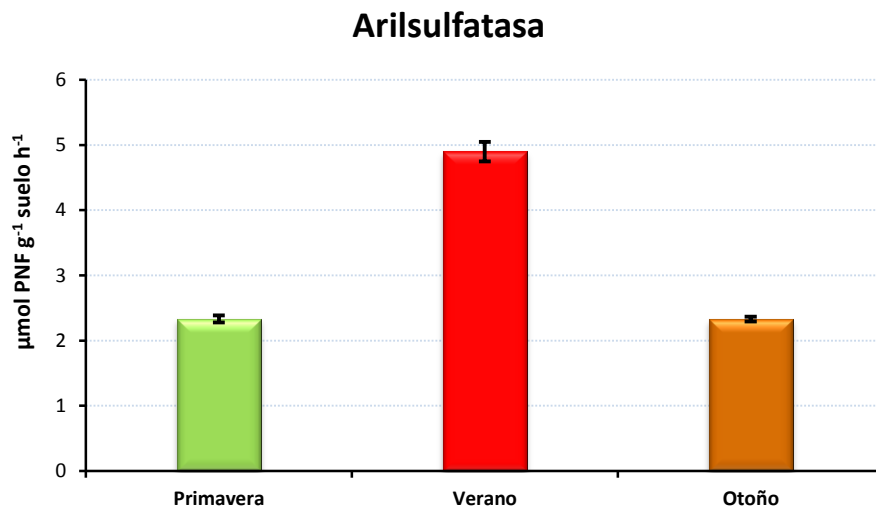


**Figura 18:** Representación de los valores medios de la Fosfatasa, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamiento de fertilización.

Teniendo en cuenta los distintos tratamientos (Figura 18), se observa unos niveles superiores, cuando nos encontramos en un monocultivo de leguminosas (T5) o encontramos una mayor proporción en el porcentaje de siembra, aunque no es una diferencia muy pronunciada respecto al resto.

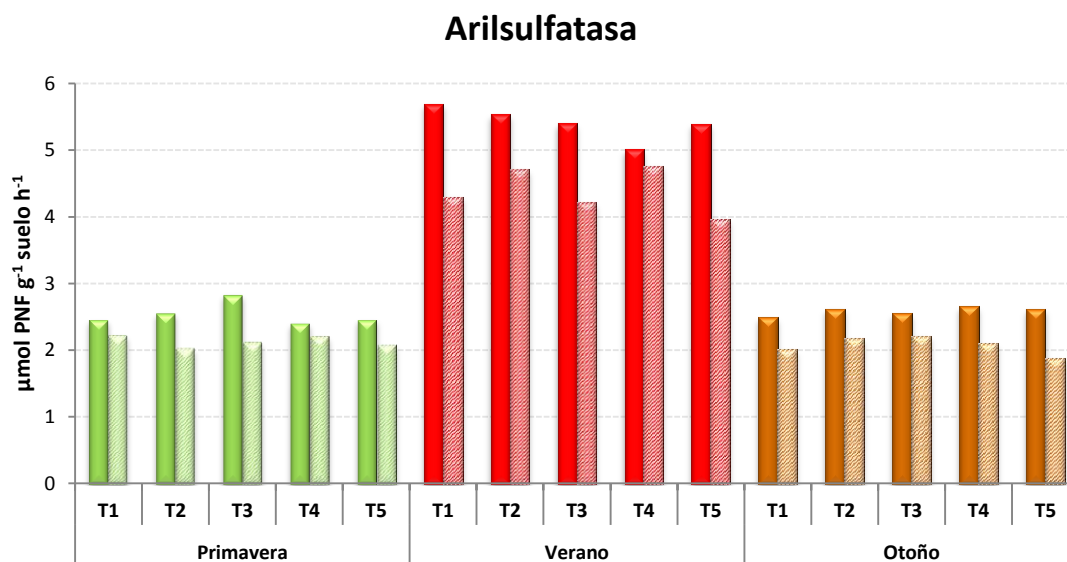
#### 4.1.2.3. ARILSULFATASA (ARASA)

En contraposición, con las otras dos variables tenidas en cuenta, podemos observar (Figura 19), como obtenemos unos valores muy superiores en el verano (4,90  $\mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{suelo l}^{-1}$ ) puesto que esta variable señala la degradación de las proteínas presentes en el suelo. La dispersión que podemos ver es pequeña, especialmente en el otoño.



**Figura 19:** Representación de los valores medios y error estándar de la Arilsulfatasa por estaciones.

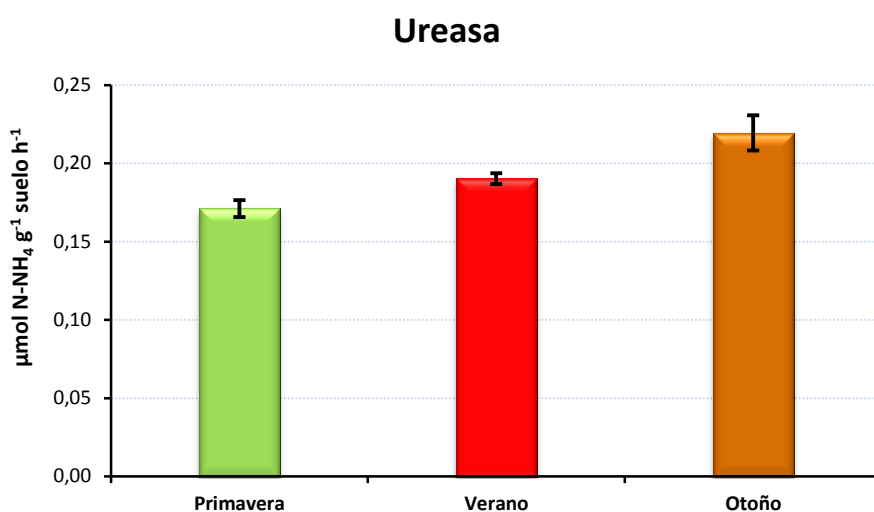
La Figura 20, nos está mostrando los valores de Arilsulfatasa recogidos en el suelo, teniendo en cuenta los distintos tratamientos de siembra y fertilización. Se ven claramente las diferencias comentadas anteriormente. Además, podemos observar, unos valores muy elevados en verano, respecto al resto de las estaciones, destacando estas diferencias en aquellos tratamientos que no disponen de una fertilización fosfórica.



**Figura 20:** Representación de los valores medios de la Arilsulfatasa, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamiento de fertilización.

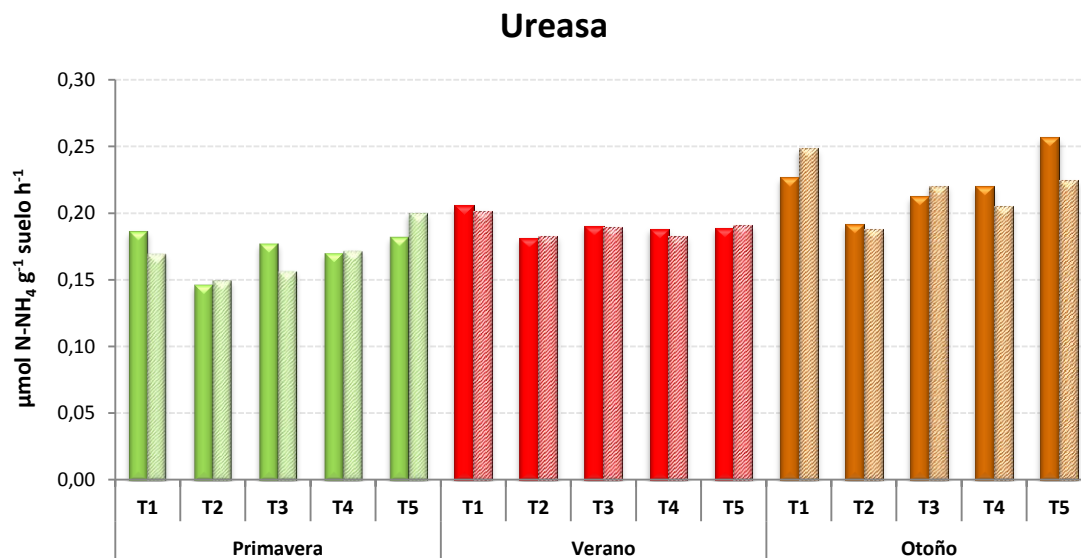
#### 4.1.2.4. UREASA (UR<sub>ASA</sub>)

La ureasa nos indica la capacidad del suelo para degradar compuestos nitrogenados. Encontramos unos valores superiores, con una mayor dispersión en el otoño ( $0,22 \mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ ) debido a que en esta estación se ha acumulado la producida en las anteriores estaciones, ya que esta enzima a diferencias de las otras, permanece activa en el suelo largos periodos. (Figura 21)



**Figura 21:** Representación de los valores medios y error estándar de la Ureasa por estaciones.

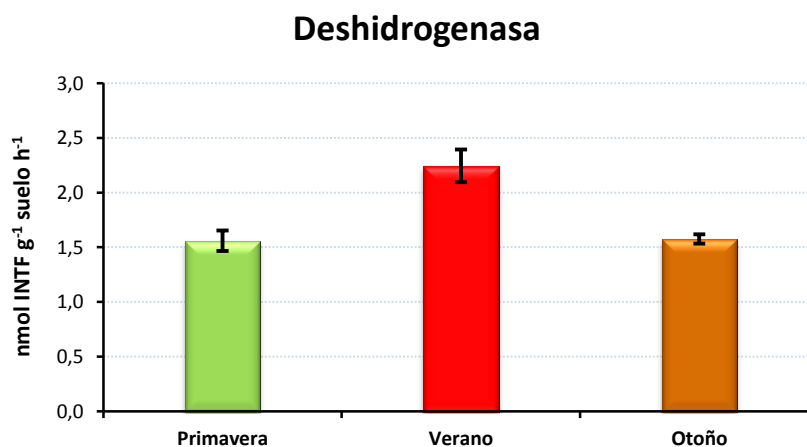
Teniendo en cuenta los diferentes tratamientos (Figura 22), vemos ver como en otoño se obtienen unos valores superiores, cuando se trata de parcelas sembradas en forma de monocultivo (T1 y T5). Esto puede estar causado al producirse una interacción negativa entre ambas especies de plantas, suprimiendo los microorganismos que producen esta enzima.



**Figura 22:** Representación de los valores medios de la Ureasa, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.

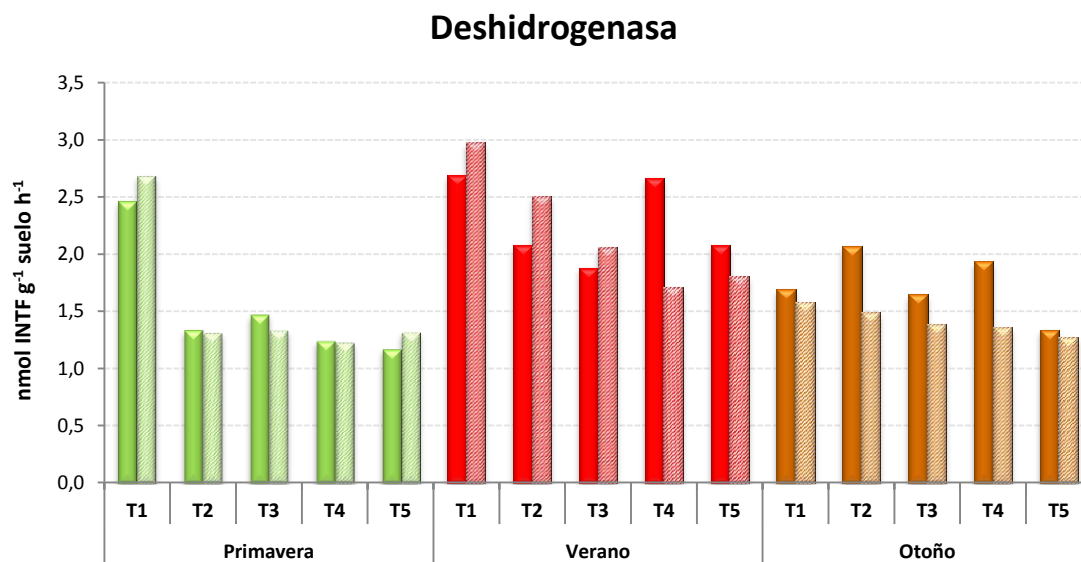
#### 4.1.2.5. DESHIDROGENASA (DEASA)

La deshidrogenasa muestra la actividad metabólica de los microorganismos. Cuando se trata de primavera ( $1,56 \text{ nmol INTF g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ ) u otoño ( $1,58 \text{ nmol INTF g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ ) vemos que se comporta de igual forma, mostrando un pequeño incremento en la dispersión en primavera. La diferencia la encontramos cuando vemos los datos del verano ( $2,24 \text{ nmol INTF g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$ ) ya que en este caso obtenemos unos valores superiores con una mayor dispersión. (Figura 23)



**Figura 23:** Representación de los valores medios y error estándar de la Deshidrogenasa por estaciones.

Observando los tratamientos (Figura 24), se ve una variación dependiendo del tipo de siembra que tengamos, destacando en primavera, sus altos niveles cuando se trata de un monocultivo de gramíneas (T1).



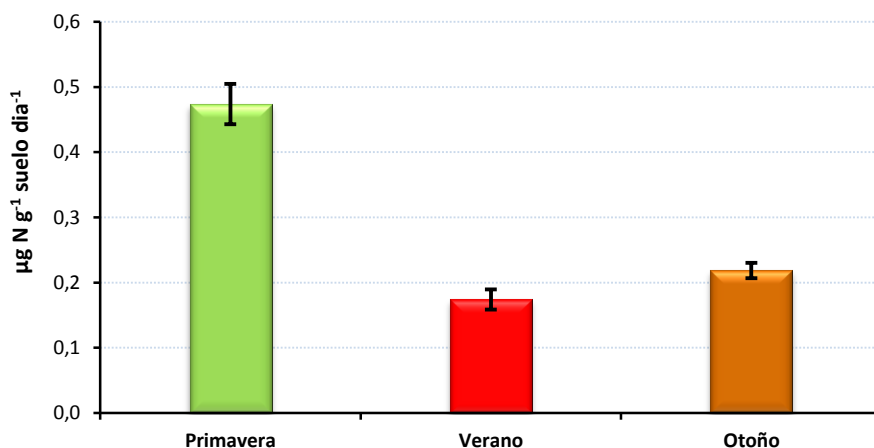
**Figura 24:** Representación de los valores medios de la Deshidrogenasa, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.

#### 4.1.2.6. MINERALIZACIÓN DE NITRÓGENO ( $M_{IN}$ )

La mineralización de nitrógeno nos indica la capacidad que tienen los microorganismos para degradar los compuestos nitrogenados. Este proceso destaca por sus valores más elevados en la primavera ( $0,48 \mu\text{g N g}^{-1} \text{suelo dia}^{-1}$ ), duplicando tanto al verano ( $0,17 \mu\text{g N g}^{-1} \text{suelo dia}^{-1}$ ) como al otoño ( $0,22 \mu\text{g N g}^{-1} \text{suelo dia}^{-1}$ ); puesto que en primavera es cuando se produce un mayor crecimiento de los microorganismos, y es mayor su necesidad de nitrógeno para sustentar su crecimiento. (Figura 25)



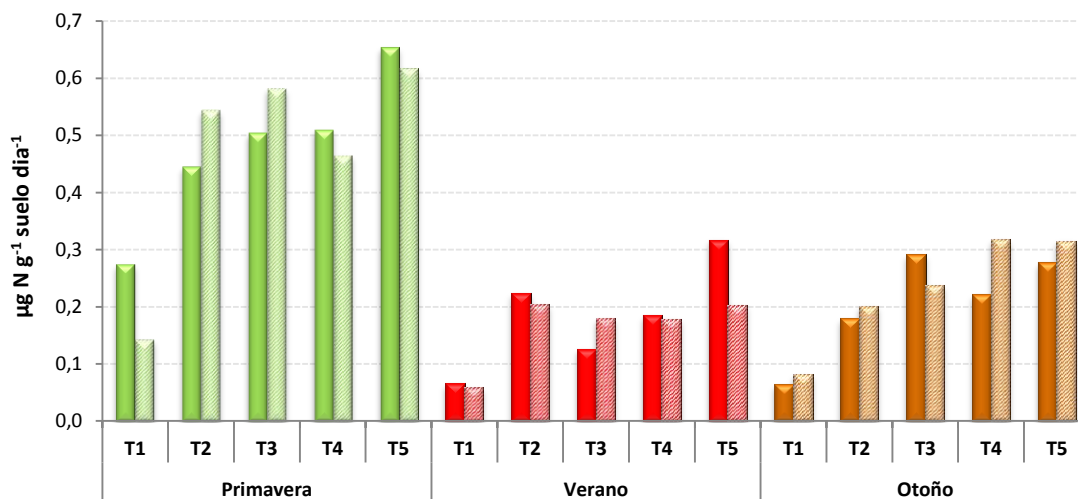
### Mineralización de Nitrógeno



**Figura 25:** Representación de los valores medios y error estándar de la Mineralización de Nitrógeno por estaciones.

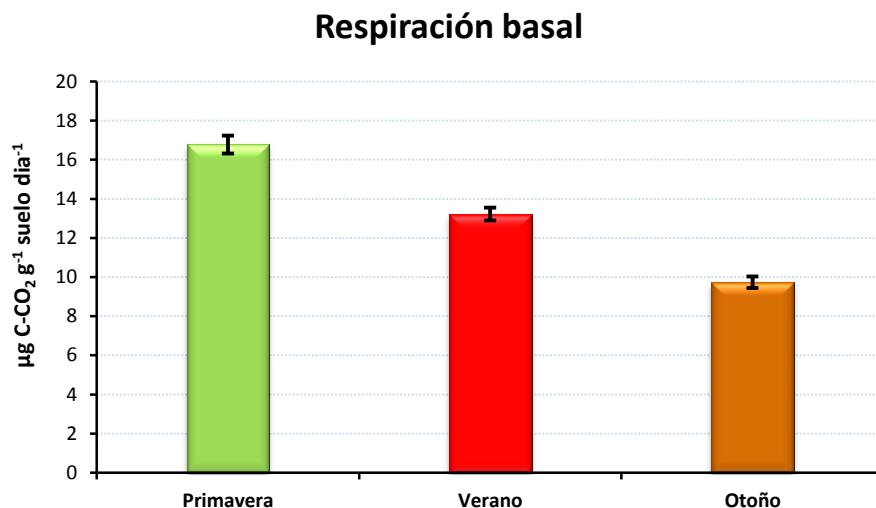
En cuanto a los tratamientos, a excepción del otoño, se observa unos valores superiores de dicha variable cuando nos referimos a monocultivos de leguminosas (T5) y notablemente inferiores cuando se trata de monocultivos de gramíneas (T1). (Figura 26)

### Mineralización de Nitrógeno



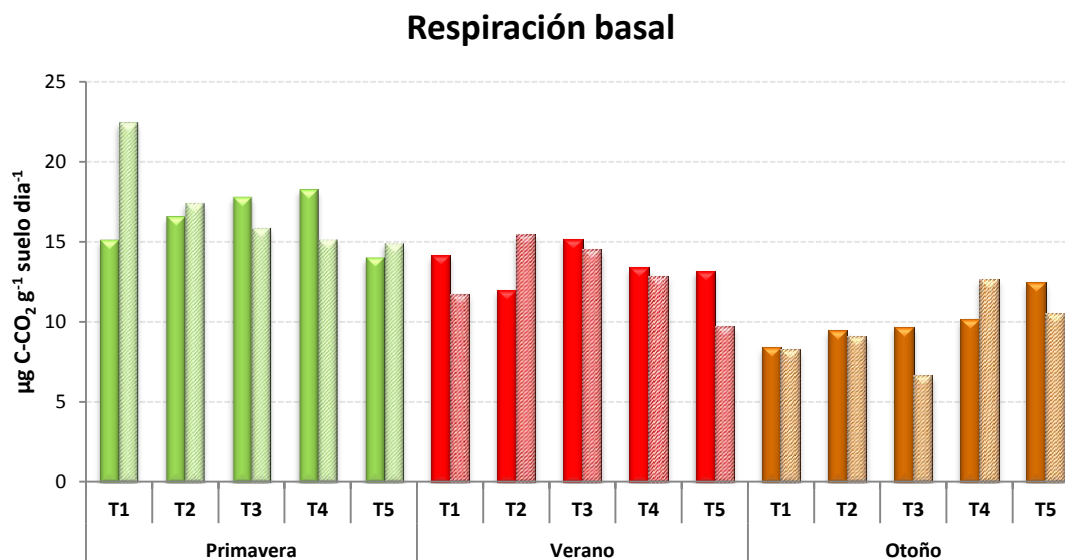
**Figura 26:** Representación de los valores medios de la Mineralización de Nitrógeno, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.

#### 4.1.2.7. RESPIRACIÓN BASAL (*RESP*)



**Figura 27:** Representación de los valores medios y error estándar de la Respiración Basal por estaciones.

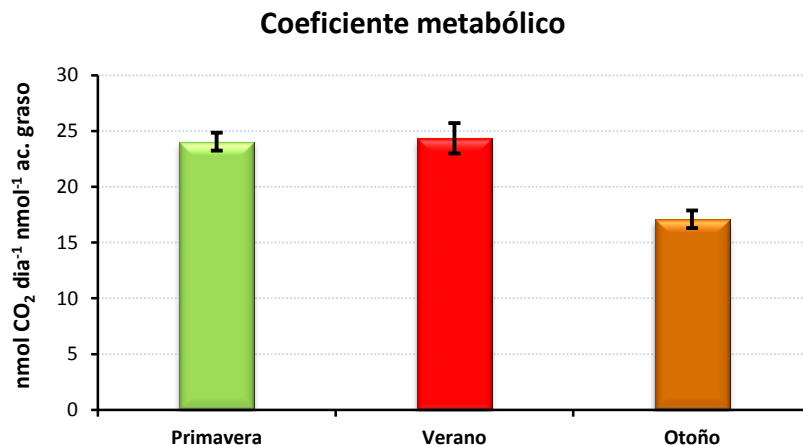
La respiración basal muestra la actividad respiratoria del conjunto de la biomasa microbiana. En la Figura 27, podemos ver como sus valores medios decrecen, de una forma notable, a medida que pasamos de primavera ( $16,77 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ) a otoño ( $9,74 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$ ). En las tres estaciones se observa una dispersión de los datos pequeña y similar. En cuanto a los tratamientos (Figura 28), destaca el incremento en el T1 cuando se aplica un fertilizante fosfatado en la parcela, obteniendo unos valores muy superiores al resto, causado por que el fósforo aumenta el crecimiento de los microorganismos y por tanto se da un mayor desprendimiento de dióxido de carbono, que es lo medido con esta actividad.



**Figura 28:** Representación de los valores medios de la Respiración Basal, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización.

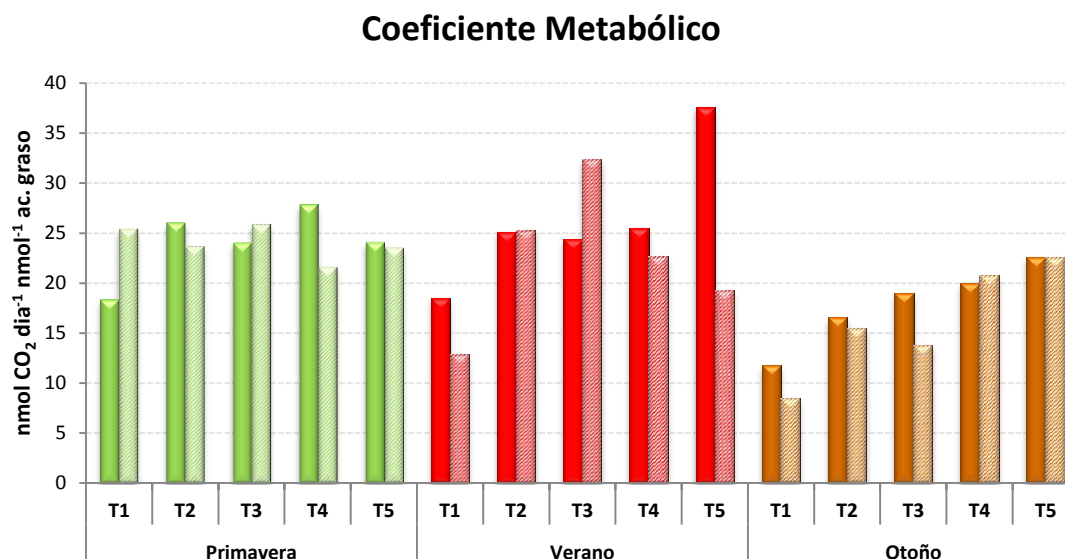
#### 4.1.2.8. COEFICIENTE METABÓLICO ( $q_{CO_2}$ )

Por último, el coeficiente metabólico es la razón entre respiración microbiana y biomasa microbiana. En la Figura 29, observamos como estos valores son inferiores en otoño ( $17,10 \text{ nmol CO}_2 \text{ día}^{-1} \text{ nmol}^{-1} \text{ ac. graso}$ ), respecto a primavera ( $24,04 \text{ nmol CO}_2 \text{ día}^{-1} \text{ nmol}^{-1} \text{ ac. graso}$ ) y verano ( $24,34 \text{ nmol CO}_2 \text{ día}^{-1} \text{ nmol}^{-1} \text{ ac. graso}$ ), aunque los valores son muy similares. Esto se debe a que los microorganismos están entrando ya en una fase de latencia de cara al invierno, y por tanto, aunque su biomasa pueda ser todavía alta, su actividad metabólica (respiración) decrece.



**Figura 29:** Representación de los valores medios y error estándar del Coeficiente Metabólico por estaciones.

Si nos fijamos en esta variable, con los diferentes tratamientos de siembra y fertilización, se observa como presenta ciertas diferencias a medida que varía los porcentajes de siembra, y de igual forma, si se trata de parcelas fertilizadas, o no. En otoño se observa una tendencia creciente a medida que pasamos de T1 a T5. En verano, destacan los altos valores del coeficiente metabólico cuando se trata de monocultivos de leguminosas, (T5) en parcelas no fertilizadas. (Figura 30)



**Figura 30:** Representación de los valores medios del Coeficiente Metabólico, por estaciones, tratamientos de siembra y tratamiento de fertilización.

## 4.2. ANÁLISIS DE LA ESTACIONALIDAD EN LOS DISTINTOS AÑOS

---

---

Como hemos visto en los resultados descriptivos, tanto las variables que hacen referencia a las propiedades bioquímicas como microbiológicas del suelo, tienen un comportamiento diferente en cuanto a estacionalidad se refiere.

Los resultados estaban mostrando los valores medios para de cada una de las variables en relación a las estaciones, sin tener en cuenta en factor tiempo.

Como ya sabemos, la recogida de muestras se ha llevado a cabo en dos años consecutivos diferentes, y en diferentes estaciones del año. La variable que recogía esta información de forma conjunta es la variable “*Muestreo*”. Recordemos que esta variable, se encontraba codificaba en 6 categorías diferentes (3m,..., 8m). Las categorías 3m y 6m, nos están diciendo que se trata de las muestras obtenidas en la estación de primavera, 4m y 7m corresponde a la estación de verano y por último 5m y 8m se están refiriendo a las muestras obtenidas en otoño. Además de la información estacional que nos está proporcionando, también debemos añadir la información temporal que nos aporta. Las categorías 3m, 4m y 5m, recordemos que nos están diciendo que las muestras se han tomado en el año 2009. De forma análoga, las categorías 6m, 7m y 8m se refieren a las muestras tomadas en el año 2010.

Puesto que tratamos de analizar como afecta tanto la estacionalidad como el factor temporal - para tratar de fusionar los datos a la hora de análisis posteriores - con la finalidad de una mejor interpretabilidad y obtención de conclusiones, analizaremos en primer lugar las variables de un modo univariante y posteriormente mediante técnicas multivariantes.

En primer lugar, representaremos para cada una de las variables – tanto de las propiedades del suelo del tipo microbiológico y bioquímico descritas – los valores

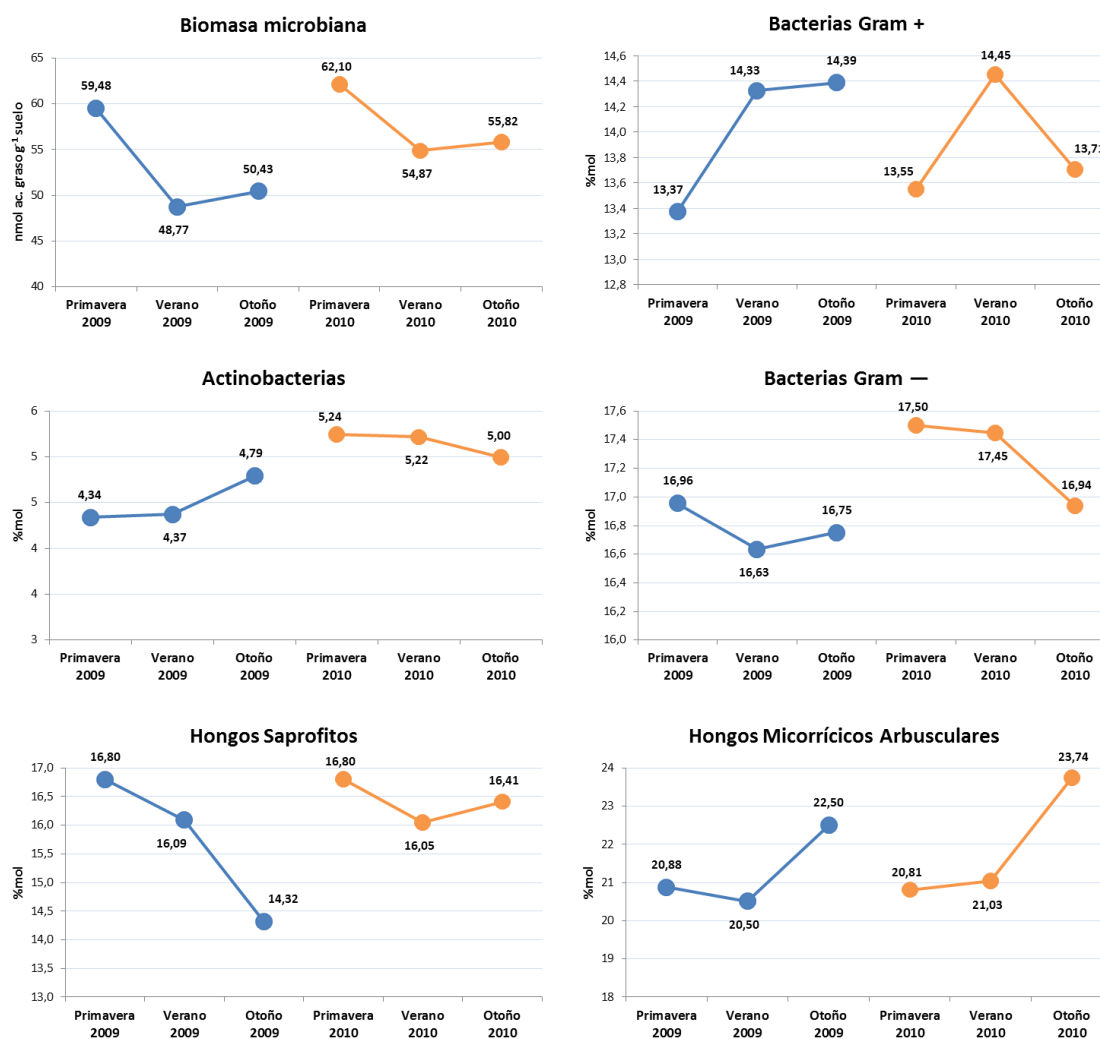
medios y sus correspondientes valores del error estándar (Tabla 9 y Tabla 10), y con la finalidad de facilitar la interpretación sus respectivos diagramas de dispersión, los cuales nos dan una visión más gráfica de los resultados.

	Año 2009		Año 2010	
	Media	ESM	Media	ESM
<b>Primavera</b>				
Biomasa Microbiana	59,48	1,76	62,10	3,14
Bacterias Gram +	13,37	0,33	13,55	0,40
Actinobacterias	4,34	0,12	5,24	0,17
Bacterias Gram —	16,96	0,30	17,50	0,35
Hongos Saprofitos	16,80	0,42	16,80	0,58
Hongos Micorrízicos Arbusculares	20,88	1,13	20,81	1,25
<b>Verano</b>				
Biomasa Microbiana	48,77	2,46	54,87	3,14
Bacterias Gram +	14,33	0,41	14,45	0,48
Actinobacterias	4,37	0,14	5,22	0,18
Bacterias Gram —	16,63	0,34	17,45	0,34
Hongos Saprofitos	16,09	0,56	16,05	0,45
Hongos Micorrízicos Arbusculares	20,50	1,36	21,03	1,59
<b>Otoño</b>				
Biomasa Microbiana	50,43	2,17	55,82	4,05
Bacterias Gram +	14,39	0,45	13,71	0,54
Actinobacterias	4,79	0,16	5,00	0,23
Bacterias Gram —	16,75	0,34	16,94	0,39
Hongos Saprofitos	14,32	0,36	16,41	0,58
Hongos Micorrízicos Arbusculares	22,50	1,36	23,74	1,86

**Tabla 9:** Valores medios y errores estándar para las variables que miden las propiedades del suelo de tipo microbiológico, en los diferentes muestreos realizados por estaciones.

Para facilitar su lectura, en la Figura 31, se muestran la representación mediante un diagrama de dispersión, que nos ayuda a entender los que pasa tanto en las estaciones como en los años correspondientes.

Observando las diferentes representaciones (Figura 31), vemos que no todas se comportan por igual. En relación a la tendencia seguida en tanto en año 2009 como en el 2010, la Biomasa microbiana (BiomM) y los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), son las variables que siguen una tendencia claramente similar en ambos años. En el resto de las variables, no se ve de una forma tan clara, pero tenemos que observar, debido a los escalamientos de los ejes que pequeñas diferencias en la realidad aparecen aumentadas gráficamente. Debido a las características que presentan estas variables, y la opinión de los expertos al respecto, este comportamiento se puede considerar normal en este tipo de variables.



**Figura 31:** Diagrama de dispersión de las variables *microbiológicas 1*, representando los valores medios en los diferentes muestreos realizados durante el estudio.

De igual modo que hemos procedido en el caso de las variables microbiológicas, procederemos para el estudio de las variables que nos dan información de las propiedades del suelo de tipo bioquímico que estamos analizando. A continuación se muestra los datos medios y errores estándar de las distintas variables en relación a las estaciones y años del estudio. (Tabla 10)

	Año 2009		Año 2010	
	Media	ESM	Media	ESM
<b>Primavera</b>				
Glucosidasa	9,66	0,32	8,70	0,19
Fosfatasa	19,44	0,74	18,25	0,58
Arilsulfatasa	2,51	0,07	2,16	0,07
Ureasa	0,21	0,01	0,13	0,00
Deshidrogenasa	1,31	0,11	1,81	0,14
Mineralización de Nitrógeno	0,67	0,04	0,27	0,02
Respiración basal	18,24	0,77	15,31	0,40
Coefficiente metabólico	26,00	1,16	22,08	1,03
<b>Verano</b>				
Glucosidasa	8,21	0,16	7,09	0,11
Fosfatasa	12,64	0,37	12,98	0,36
Arilsulfatasa	3,82	0,08	5,97	0,15
Ureasa	0,16	0,00	0,22	0,00
Deshidrogenasa	1,07	0,04	3,42	0,14
Mineralización de Nitrógeno	0,24	0,03	0,11	0,01
Respiración basal	12,25	0,46	14,20	0,41
Coefficiente metabólico	24,28	2,26	24,41	1,57
<b>Otoño</b>				
Glucosidasa	3,59	0,05	4,72	0,05
Fosfatasa	9,86	0,28	10,80	0,37
Arilsulfatasa	2,39	0,06	2,26	0,05
Ureasa	0,31	0,01	0,13	0,01
Deshidrogenasa	1,62	0,06	1,53	0,07
Mineralización de Nitrógeno	0,21	0,02	0,23	0,01
Respiración basal	9,32	0,41	10,17	0,41
Coefficiente metabólico	16,78	1,12	17,41	1,15

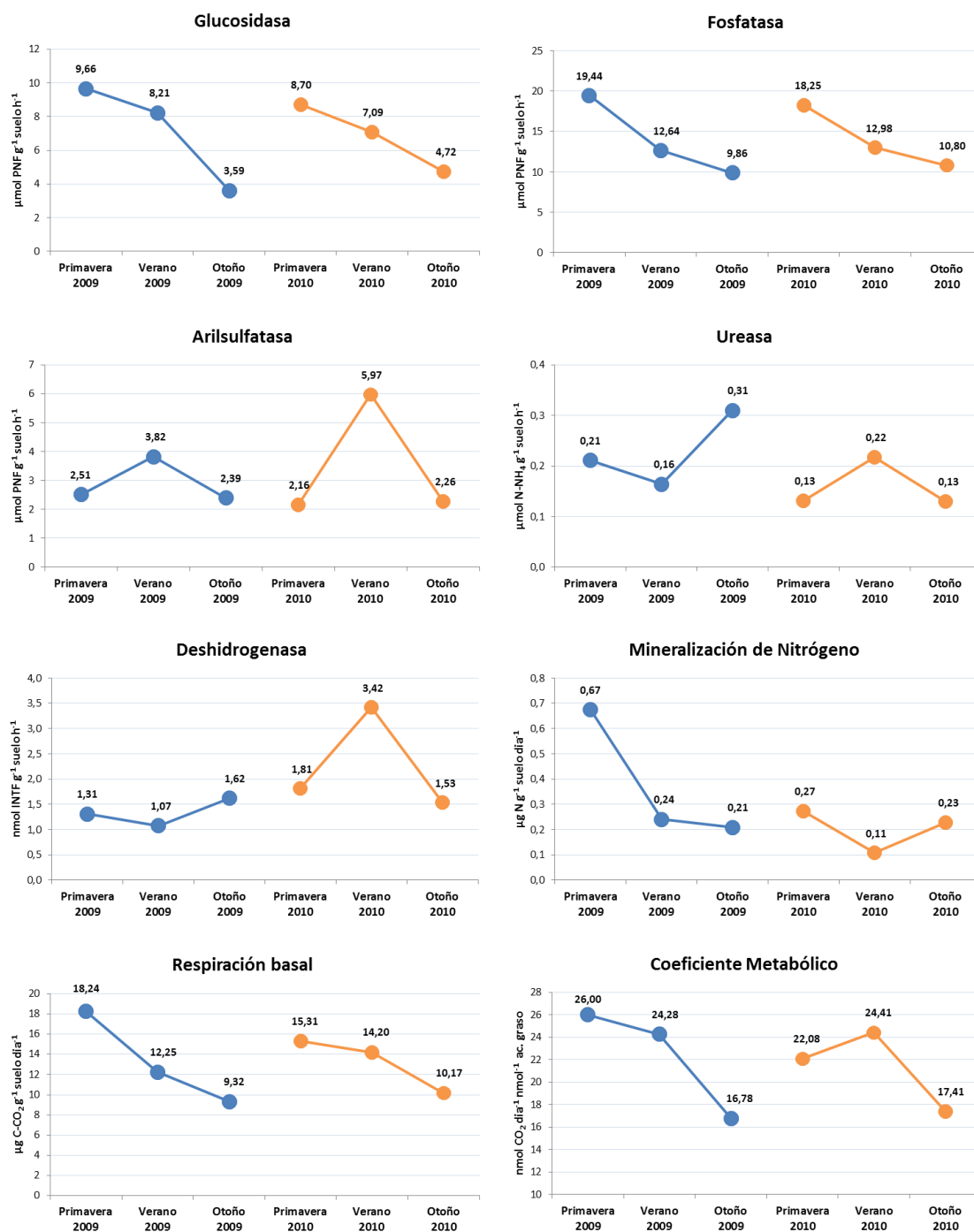
**Tabla 10:** Valores medios y errores estándar para las variables que miden las propiedades del suelo de tipo bioquímico, en los diferentes muestreos realizados por estaciones.

Debido a que las variables no se encuentran medidas todas ellas en las mismas unidades, no podemos extraer conclusiones conjuntas tras el análisis de esta tabla, pero si podemos ver el comportamiento de cada variable en relación a los dos años.

Observando los datos, podemos ver como la tendencia general son valores más elevados en el verano –no para todas las variables- que en las estaciones de primavera y otoño. Esto puede ser debido a las condiciones climatológicas propias del verano, y características de las variables estudiadas.

Para facilitar su lectura, en la Figura 32 podemos encontrar la representación de las variables mediante un diagrama de dispersión, en que podemos observar su evolución en función de los años y muestreos.





**Figura 32:** Diagrama de dispersión de las variables *bioquímicas 1*, representando los valores medios en los diferentes muestreos realizados durante el estudio.

Tras la visualización de estos gráficos podemos observar la tendencia comentada anteriormente. De una forma general, se puede observar en casi todas las variables, pero si que debemos de destacar, que tanto en la Ureasa (URasa) como en la Deshidrogenasa (DEasa), dicha tendencia no se presenta.

En ambas variables – Ureasa (URasa) y Deshidrogenasa (DEasa) - presentan la misma característica en torno a la tendencia que presentan en el transcurso del año 2009 y 2010. En el verano (2009) ( $0,164 \mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ suelo lr}^{-1}$  y  $1,074 \text{ nmol INTF g}^{-1} \text{ suelo lr}^{-1}$  respectivamente) presentan valores inferiores que en los obtenidos en la primavera ( $0,211 \mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ suelo lr}^{-1}$  y  $1,308 \text{ nmol INTF g}^{-1} \text{ suelo lr}^{-1}$  respectivamente) y otoño ( $0,310 \mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ suelo lr}^{-1}$  y  $1,622 \text{ nmol INTF g}^{-1} \text{ suelo lr}^{-1}$  respectivamente) del mismo periodo. De modo contrario a lo ocurrido en el año 2010. Este hecho, es lo que se produce de una manera general en el resto de variables confirmándose para ambos años.

La aparición de esta “*tendencia invertida*” en ambas variables puede ser debido a numerosos factores difícilmente explicables, ya que no se esperaba que ocurriera esto. Como posible explicación, puede ser debido a propiedades internas de las variables medidas. También que hayan podido ser afectadas por algún tipo de climatología adversa en el momento de muestreo; pudiendo ser el causante de obtener mediciones incorrectas de dichas variables, entre una de las muchas opciones posibles.

Con la finalidad de valorar el efecto que provoca la temporalidad sobre las propiedades microbiológicas y bioquímicas del suelo vamos a emplear el método ANOVA MR, en el cual es considerado cada parcela experimental como un único sujeto – de forma independiente al tratamiento de siembra o fertilización. Recordemos que este método se utiliza cuando nos encontramos con la situación que las muestras – en este caso en las distintas estaciones – han sido tomadas sobre los mismos sujetos – en nuestro caso las parcelas experimentales -. Como sabemos contamos con distintos métodos para su aplicación. Se ha utilizado en análisis de medidas repetidas con un factor intra-sujetos – considerando el factor “muestreo” – caracterizándose porque todos los niveles del factor han sido aplicados al mismo grupo de sujetos – parcelas experimentales -.

En el Anexo 1, podemos encontrar los resultados de las pruebas de normalidad realizadas para cada nivel del factor, y para cada variable, tanto en las microbiológicas como bioquímicas. Se puede observar – en las variables bioquímicas - que en todos los

casos, a excepción del verano del año 2009 para la variable “Coeficiente Metabólico” ( $qCO_2$ ) – para un nivel de significación de 0,05 – no podemos rechazar la hipótesis de normalidad. Esto quiere decir, que estadísticamente se pueden considerar normales nuestros datos en los diferentes niveles de cada factor para cada una de las variables. En las microbiológicas, podemos aceptar la hipótesis de normalidad prácticamente en todos los casos, a excepción del año 2010 en algunas variables como son, Bacterias Gram + (G+), Bacterias Gram – (G–) – en verano presenta también sig. < 0,05 - y Hongos Micorrícicos arbusculares (HMA), en el otoño.

Tras estos resultados, la Tabla 11, muestra los resultados asociados al ANOVA de medidas repetidas, para ambos conjuntos de variables.

	W de Mauchy		Lambda de Wilks	
	Chi-Cuadrado (**)	Sig.	F	Sig.
<b>Variables Bioquímicas</b>				
Glucosidasa	124,611	0,000	378,212	0,000
Fosfatasa	43,059	0,000	76,731	0,000
Arilsulfatasa	111,789	0,000	272,271	0,000
Ureasa	79,907	0,000	118,030	0,000
Deshidrogenasa	76,433	0,000	89,249	0,000
Mineralización de Nitrógeno	81,317	0,000	60,978	0,000
Respiración basal	27,572	0,016	27,063	0,000
Coeficiente Metabólico	37,877	0,001	12,643	0,000
<b>Variables Microbiológicas</b>				
Biomasa Microbiana	38,619	0,000	14,881	0,000
Bacterias Gram +	34,854	0,002	11,412	0,000
Actinobacterias	36,478	0,001	12,157	0,000
Bacterias Gram –	23,770	0,049	3,003	0,023
Hongos Saprofitos	15,551	0,343	7,079 (*)	0,000
Hongos Micorrícicos Arbusculares	28,167	0,014	4,246	0,004

(\*) Valor de contraste de esfericidad asumida. Al aceptar la hipótesis de esfericidad, es preferible utilizar el contraste univariado de esfericidad asumida.  
 (\*\*) Valor de la Chi-Cuadrado Aproximado

**Tabla 11:** Resultados asociados al ANOVA de MR. Se muestra la prueba de esfericidad W de Mauchy, como el estadístico de contraste Lambda de Wilks

Cuando estamos trabajando con modelos de ANOVA MR, es necesario suponer que las varianzas de las diferencias entre cada dos niveles del factor son iguales. En este caso, tenemos 6 niveles del factor, por lo tanto tenemos 15 pares de combinaciones dos a dos entre niveles. Calculando las diferencias de esas 15 combinaciones de pares de variables, obtenemos 15 nuevas variables. En el modelo de un factor de MR suponemos

que las varianzas de esas 15 variables son iguales. Este supuesto equivale a afirmar que la matriz de varianzas-covarianzas es *circular* o *esférica*.

La W de Mauchy – prueba de esfericidad de Mauchy – nos ayuda a contrastar este hecho. En este caso, observamos que tenemos resultados significativos ( $< 0,05$ ) en todos los casos, por lo que rechazamos la hipótesis de circularidad. Por ello, basamos nuestra decisión en los estadísticos multivariados – estos no son afectados por la hipótesis de circularidad –, más concretamente en la Lambda de Wilks, para afirmar que en todos los casos obtenemos diferencias en los distintos periodos de muestreos.

Con este tipo de análisis, vemos que de una forma individualizada, encuentra diferencias para los distintos periodos de muestreos. Debido a que este tipo de análisis puede estar sujeto a errores de significación, como ya sabemos a la hora de realizar múltiples contrastes.

Puesto que se ha demostrado la existencia de la evolución temporal que existe entre los distintos parámetros del suelo que estamos analizando - ya sean del tipo microbiológico o bioquímico – y con la finalidad de evitar estos posibles errores, y obtener una visión más clara de las posibles diferencias entre muestreos – estaciones en relación a los años – además de conocer aquellas variables que puedan ser las causantes de dicha evolución, realizaremos un MANOVA Biplot.

Recordemos que estamos analizando si las estructuras tanto en el año 2009 como en el año 2010, en relación a las estaciones de primavera, verano y otoño, son similares.

La aplicación de esta técnica multivariante, pone de manifiesto las principales diferencias que se pueden producir entre diversos grupos, al igual que de una forma conjunta, las variables responsables de dicha separación.

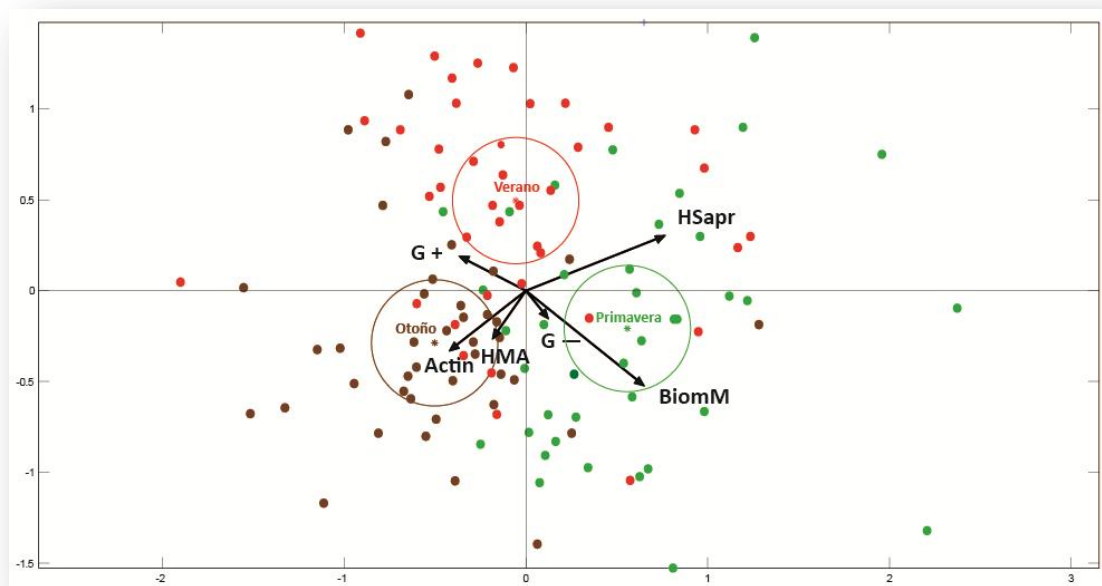
La forma de actuar va a ser la siguiente. Realizaremos múltiples MANOVAS Biplot, que representen la estructura – tanto en las variables microbiológicas como bioquímicas - de las estaciones en el año 2009 y 2010. Posteriormente, haremos una

representación conjunta de ambos años, y mediante la comparativa veremos si se mantienen dichas estructuras, lo cuál nos permitirá fusionar los datos para análisis posteriores sin tener en cuenta el factor tiempo.

De acuerdo con los resultados obtenidos tras realizar el análisis de los datos para las variables microbiológicas de forma conjunta mediante el MANOVA-Biplot, el contraste global – con los datos referidos al año 2009 – muestra un valor de la Lambda de Wilks de 8,4176 (Anexo 2), resultando significativo (sig. = 0,000), por lo que podemos afirmar que al menos dos vectores de medias de las distintas estaciones son diferentes en este año. Teniendo en cuenta, el año 2010 y los datos conjuntos de ambos años, los resultados que se obtienen igualmente resultan significativos. (Anexo 2)

En la Figura 33, se muestra la representación de los datos correspondientes al año 2009.

### Variables Microbiológicas 1 – Datos Año 2009



**Figura 33:** Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables Microbiológicas 1, por estación en el año 2009.

En primer lugar, se observa una dispersión importante de los datos. Esto es debido a la tipología de las variables que estamos representando, ya que la aplicación de los tratamientos de siembra y fertilización puede dar lugar a que las variables tomen valores muy diferentes. No obstante a pesar de dicha dispersión, se observan 3 estructuras diferenciables, correspondientes a las estaciones de primavera, verano y otoño.

Si observamos las calidades de representación de las variables (Tabla 12), podemos caracterizar los ejes factoriales.

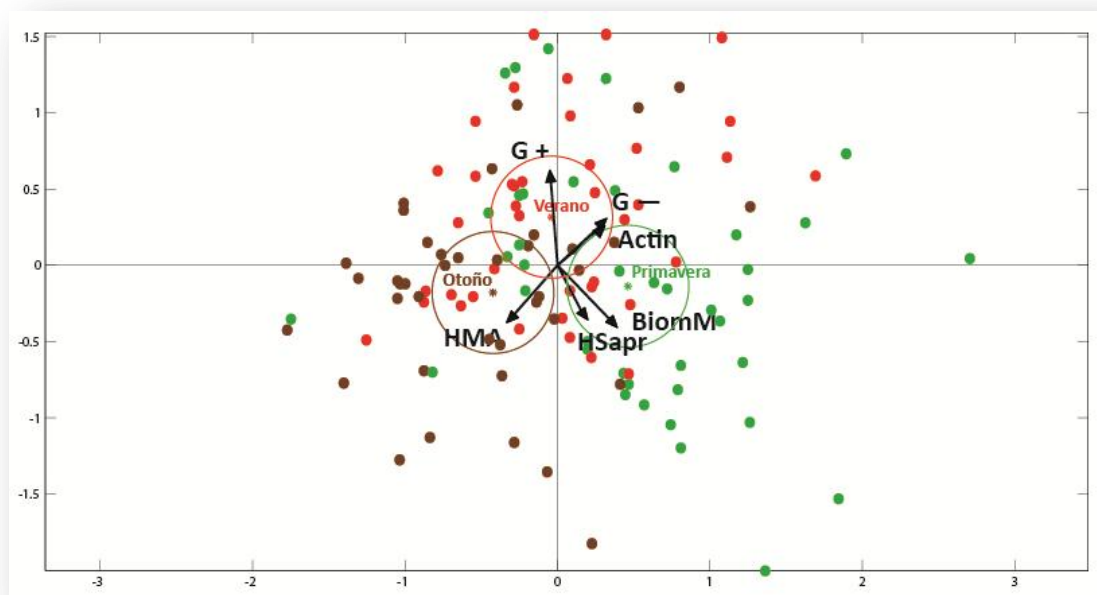
	<b>Eje 1</b>	<b>Eje 2</b>
<b>BiomM</b>	<b>70,25</b>	29,75
<b>G +</b>	<b>85,09</b>	14,91
<b>Actin</b>	<b>71,29</b>	28,71
<b>G —</b>	<b>49,81</b>	<b>50,19</b>
<b>Hsapr</b>	<b>90,64</b>	9,36
<b>HMA</b>	42,41	<b>57,59</b>

**Tabla 12:** Calidades de representación de las variables *microbiológicas 1*, respecto a los ejes factoriales en la representación de los datos del año 2009.

El primero de los ejes se encuentra caracterizado por la Biomasa microbiana (BiomM) y los Hongos Saprofitos (HSapr) en sentido positivo del eje, teniendo unos valores superiores en la estación de primavera. Las Bacterias Gram Positivas (G+) y Actinobacterias (Actin) se encuentra en sentido negativo del eje caracterizando principalmente al otoño. El segundo eje factorial, lo caracteriza principalmente los Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) en sentido negativo, que caracterizan principalmente a la estación estival, con los valores muy bajos en dicha estación. Siendo estrictos deberíamos decir que las Bacterias Gram Negativas (G—) también caracterizan el eje 2, pero como vemos, es una variable de plano, y debido a ello, no se ha considerado.

Atendiendo a las regiones de confianza (95%) para la media – calculadas de forma multivariante –, observamos que no hay intersección entre ellas, lo que de una forma gráfica, nos dice que existen realmente diferencias entre las estaciones para el año 2009.

## Variables Microbiológicas 1 – Datos Año 2010



**Figura 34:** Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables *microbiológicas 1*, por estación en el año 2010.

En cuanto a la Figura 34, está mostrando la representación de los datos correspondientes al año 2010. Tratemos de ver si se mantienen las estructuras como en el año anterior.

De forma análoga, hay una dispersión importante en los datos, pudiendo ser debido a los tratamientos aplicados, al igual que en este tipo de experimentos, la climatología es un factor importante, que puede provocar cambios en las muestras o modificaciones, puesto que no es una variable fácilmente controlable.

Observamos también 3 estructuras, con un posicionamiento similar al año anterior. Los módulos de las variables (vectores) vemos que son inferiores al caso anterior, por lo que las variables tienen una capacidad informativa menor, siendo variables más estables.

	Eje 1	Eje 2
<b>BiomM</b>	<b>70,94</b>	29,06
<b>G +</b>	1,65	<b>98,35</b>
<b>Actin</b>	<b>78,76</b>	21,24
<b>G —</b>	<b>75,53</b>	24,47
<b>Hsapr</b>	41,7	<b>58,3</b>
<b>HMA</b>	<b>67,2</b>	32,8

**Tabla 13:** Calidades de representación de las variables Microbiológicas 1, respecto de los ejes factoriales en la representación de los datos del año 2010.

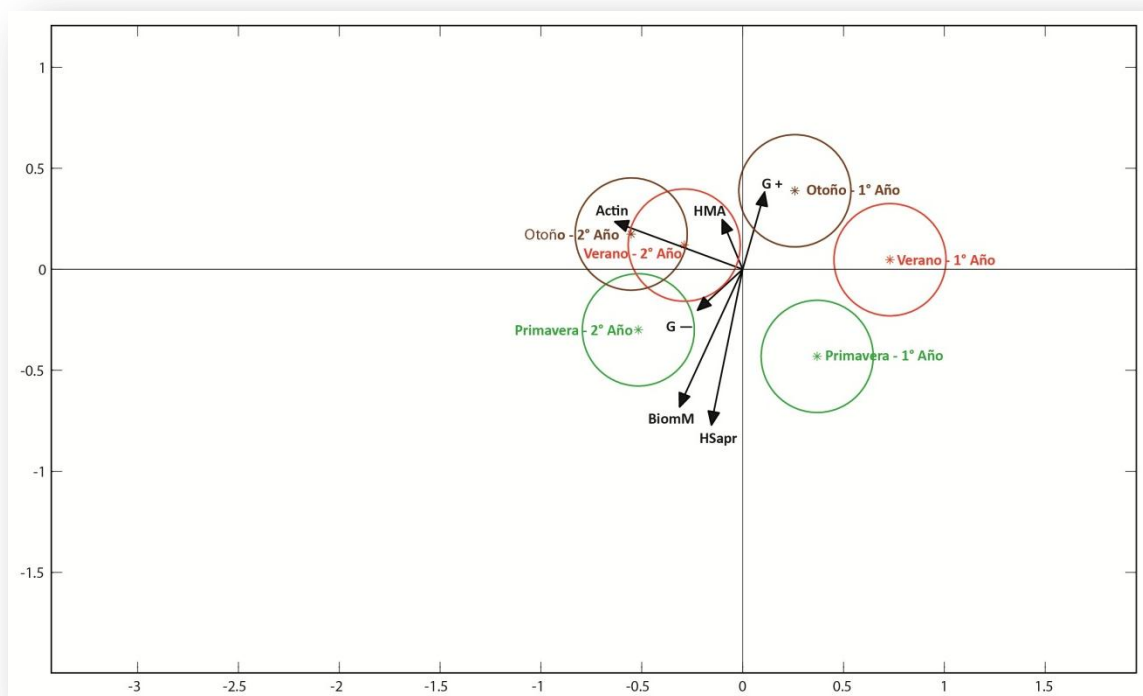
Atendiendo a las calidades de representación de las variables (Tabla 13), los ejes en este año no quedan definidos prácticamente igual por las mismas variables. Las regiones de confianza en este caso se cruzan.

En cuanto a las estructuras que estábamos buscando, en ambos años se mantienen similares, con posibles diferencias en algunas variables, pero como hemos comentado, puede ser debido al tipo de variables, ya que desde el punto de vista ecológico, se podría explicar como que la evolución de las poblaciones microbianas son cambiantes con el tiempo, tendiendo a converger ciertos grupos de microorganismos en cuanto a su presencia relativa en el suelo, mientras que otros muestran una divergencia a medida que pasa el tiempo.

Para corroborar las posibles diferencias entre las estaciones, y ver si las estructuras se mantienen, trataremos los datos de forma conjunta, y observaremos su posicionamiento. Para esta última representación, caracterizaremos los grupos en función del año y la estación – para ello se utilizó la variable “muestreo” -. Se han eliminado los puntos individuales para facilitar la interpretación del gráfico, (Figura 35) representando los valores medios acompañados de su región de confianza al 95 %.



### Variables Microbiológicas 1 – Datos Año 2009 y 2010



**Figura 35:** Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables *microbiológicas 1*, por estación y año.

Con esta representación observamos de una forma clara las diferencias que existen entre los años de estudio. En los datos referidos al año 2009, las diferencias entre las estaciones se observan de una manera más clara que en el caso del segundo año.

En la siguiente tabla (Tabla 14) se muestra las calidades de representación de las variables en este caso.

	Eje 1	Eje 2
BiomM	33,66	<b>66,28</b>
G +	12,89	<b>53,48</b>
Actin	<b>77,85</b>	3,60
G —	<b>52,12</b>	14,60
Hsapr	8,28	<b>68,40</b>
HMA	15,88	<b>31,33</b>

**Tabla 14:** Calidades de representación de las variables Microbiológicas 1, respecto los ejes factoriales en la representación conjunta de los del año 2009 y 2010.

En cuanto al comportamiento respecto al factor temporal de los datos, debemos decir, que aunque no se vea de una forma muy clara, según los expertos en el tema, este comportamiento puede ser explicable, atendiendo a las propiedades de las variables con el paso del tiempo. Vemos una diferenciación entre ambos años de manera clara en relación a la media de las estaciones – los del año 2009 todos se encuentran situados a la derecha del eje de coordenadas, y los del 2010 a la izquierda -. En cuanto a los distintos periodos de muestreo, en el primer año de estudio se observan las diferencias entre ellos al no solaparse las regiones de confianza para la media, no ocurriendo lo mismo para el año 2010.

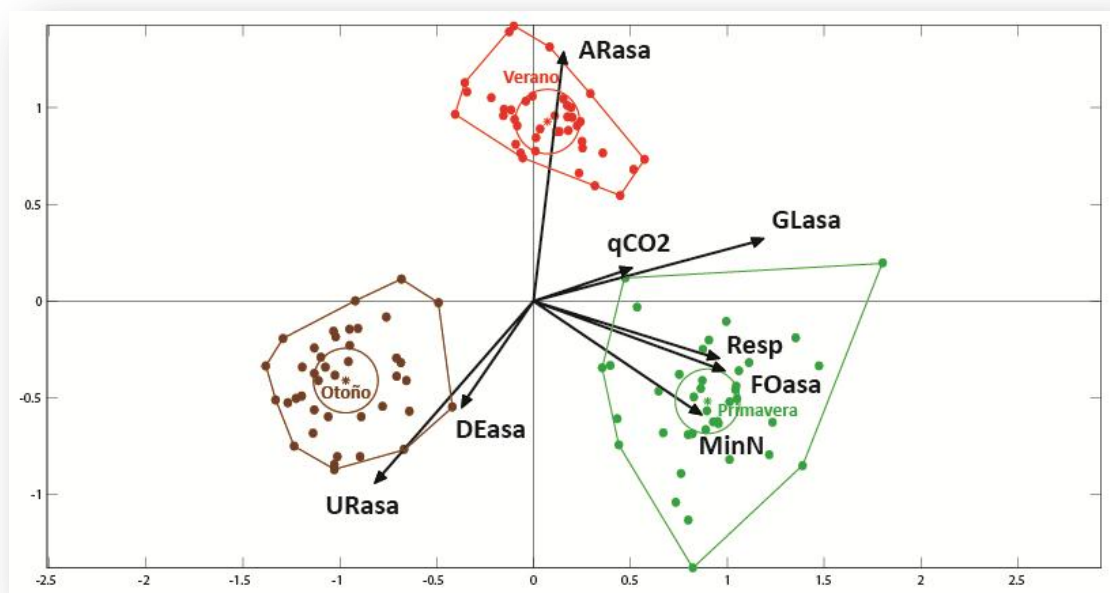
Las diferencias entre los años se deben principalmente a una menor abundancia de Actinobacterias (Actin) en el año 2009 respecto el 2010. En cuanto a las diferencias entre las estaciones son causadas por una mayor biomasa microbiana (BiomM) y presencia de Hongos Saprofitos (Hsapr) en las estaciones de primavera, decreciendo en verano y más aun en otoño.

Cuando trabajamos con la variables bioquímicas, obtenemos resultados significativos tras la realización del análisis del MANOVA-Biplot – ya sean los datos del 2009, 2010 o conjuntos – para el contraste multivariante (Anexo 3). Las pruebas mediante el estadístico de la Lambda de Wilks han mostrado unos valores de 110,146 para el año 2009, 106,787 para el 2010 y 90,535 cuando tratamos los datos de forma conjunta. Todos ellos con una significación  $< 0,05$ , por lo que tenemos evidencias estadísticas para afirmar que existen diferencias, en al menos, dos vectores de medias, en todos los casos.

Por ello, ahora debemos de ver si las estructuras se mantienen de independientemente del año, lo que nos permitirá fusionar los datos para posteriores análisis, eliminando por tanto el factor del año, como ya hemos comentado.

En primer lugar representaremos los datos correspondientes al año 2009, como se puede ver en la Figura 36.

## Variables Bioquímicas 1 – Datos Año 2009



**Figura 36:** Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables *bioquímicas 1*, por estación en el año 2009.

Tras la representación, se observa de una manera gráfica y clara, que tenemos diferencias entre las 3 estaciones, puesto éstas se encuentran perfectamente separadas en 3 agrupaciones diferentes. En cuanto a la dispersión, se observa menos que en el caso de las variables microbiológicas – debido a las características propias de las variables – y en verano y otoño, encontramos una menor dispersión en los datos que en la primavera, debido a la proximidad que hay entre ellos.

El plano factorial, lo podemos categorizar en función de la calidad de representación de las distintas variables (Tabla 15).

	Eje 1	Eje 2
Glasa	94,97	5,03
Foasa	91,03	8,97
Arasa	1,92	98,08
Urasa	50,71	49,29
Deasa	38,91	61,09
MinN	74,65	25,35
Resp	93,27	6,73
qCO <sub>2</sub>	92,31	7,69

**Tabla 15:** Calidades de representación de las variables Bioquímicas 1, respecto a los ejes factoriales en la representación de los datos del año 2009.

El eje 1 vemos que está caracterizado por las variables Glucosidasa (GLasa), Fosfatasa (FOasa), Mineralización de Nitrógeno (MinN), Respiración basal (Resp) y el Coeficiente Metabólico ( $qCO_2$ ) en sentido positivo. Siendo muy estrictos tendríamos que incluir la Ureasa (URasa), que en este caso se encontraría en sentido negativo, pero como vemos presenta casi la misma calidad en ambos ejes. Todas ellas, presentan módulos grandes, lo que nos indican que tienen mucha capacidad informativa, a excepción del Coeficiente Metabólico ( $qCO_2$ ) siendo esta la variable más estable de todas, ya que su módulo es inferior al del resto.

El eje 2, quedaría claramente caracterizado por la Arilsulfatasa (ARasa) en sentido positivo, y podríamos decir que de la Deshidrogenasa (DEasa) también caracterizaría dicho eje, pero en este caso en sentido negativo, pero como vemos con un porcentaje muy inferior que la Arilsulfatasa (ARasa).

Atendiendo a las variables del eje 1, podemos decir que todas ellas covarían entre sí, ya que entre ellas existe un ángulo “pequeño”, pero a su vez, podemos hacer una pequeña distinción entre dos grupos de variables. Esto quiere decir, que la variable GLasa y  $qCO_2$  presentan una mayor covariación entre ellas, que con el resto de variables. Y a su vez, las variables FOasa, MinN y Resp, tienen también una importante covariación entre ellas.

En esta primera visualización, vemos como el verano quedaría situado en la parte superior del gráfico, y claramente caracterizado por los valores de la Arilsulfatasa (ARasa), ya que esta época del año, es cuando se observan mayores valores en dicha variable, siendo mucho menor en el caso de la primavera o el otoño.

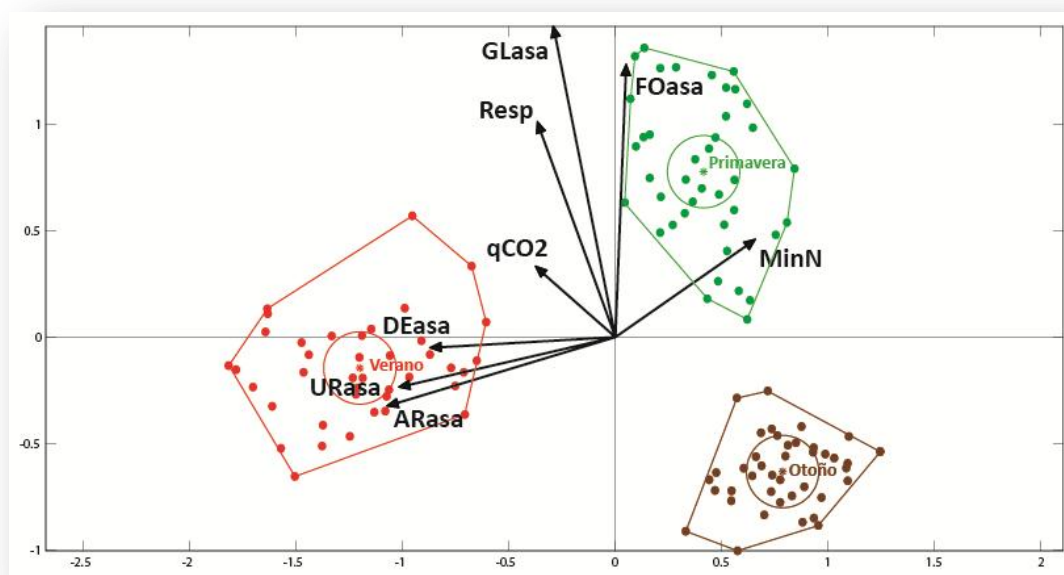
El otoño, a pesar de la problemática comentada anteriormente en relación a la Ureasa (URasa) y Deshidrogenasa (DEasa), se encuentra caracterizado por dichas variables, siendo en este año, donde toman unos valores superiores al resto de estaciones.

Por último, en la primavera, vemos que es la estación que presenta mayor dispersión como ya habíamos comentado anteriormente, pudiendo ser debido a que se

encuentra también caracterizada por un mayor número de variables. Principalmente por la Fosfatasa (FOasa), Respiración basal (Resp) y la Mineralización de Nitrógeno (MinN).

Sabemos lo que ocurre con nuestros datos en el año 2009, veamos a continuación si ocurre algo similar en el año 2010. Sabemos que tenemos dos variables (URasa y DEasa) que presentaban una tendencia diferente en los dos años, por lo que estas diferencias las tenemos que observar en la representación.

### Variables Bioquímicas 1 – Datos Año 2010



**Figura 37:** Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables *bioquímicas 1*, por estación en el año 2010.

Sin entrar a valorar muy a fondo, a primera vista, encontramos nuevamente una separación clara de las distintas estaciones (Figura 37). El otoño, sigue presentando una dispersión menor, pero en este caso el verano muestra una dispersión un poco mayor que al año anterior, pudiendo ser debido a variables que lo caracterizan en este caso, como veremos más adelante.

Atendiendo a la capacidad informativa que presentan las variables, encontramos una similitud respecto al año anterior, ya que todas ellas presentan una alta capacidad informativa a excepción del Coeficiente Metabólico ( $qCO_2$ ) que nuevamente en este año, presenta mucha estabilidad debido a que la longitud de su módulo es muy inferior que el resto de variables.

Si caracterizamos nuevamente los ejes, obtenemos las siguientes calidades de representación para las variables:

	<b>Eje 1</b>	<b>Eje 2</b>
<b>Glasa</b>	7,99	<b>92,01</b>
<b>Foasa</b>	0,34	<b>99,66</b>
<b>Arasa</b>	<b>95,99</b>	4,01
<b>Urasa</b>	97,6	2,4
<b>Deasa</b>	<b>99,85</b>	0,15
<b>MinN</b>	<b>81,85</b>	18,15
<b>Resp</b>	22,38	<b>77,62</b>
<b><math>qCO_2</math></b>	<b>73,75</b>	26,25

**Tabla 16:** Calidades de representación de las variables Bioquímicas 1, respecto de los ejes factoriales en la representación de los datos del año 2010.

En cuanto a la caracterización, encontramos alguna diferencia respecto al año anterior, como ya era previsto. En este caso el eje 1 lo encontramos caracterizado principalmente en sentido positivo por la Mineralización de Nitrógeno (MinN), y en sentido negativo del eje, por la Arilsulfatasa (ARasa), Ureasa (URasa) y Deshidrogenasa (DEasa). En cambio el eje 2, estaría principalmente por la Glucosidasa (GLasa) y la Fosfatasa (FOasa), pero también por la Respiración basal (Resp), todas ellas en el sentido positivo del eje.

En este caso, encontramos que las variables del eje 2, presentan una covariación fuerte entre ellas, debido a que se encuentran representadas muy próximas. Y también, las variables Arilsulfatasa (ARasa), Ureasa (URasa) y Deshidrogenasa (DEasa), que en este caso se encuentran caracterizando el eje 1 en sentido negativo, covariando de forma contraria a la Mineralización de Nitrógeno (MinN).

Observando el verano, encontramos diferencias respecto al año anterior, debido a que ahora se encuentra caracterizado además de por la Arilsulfatasa (ARasa),

también por la Ureasa (URasa) y la Deshidrogenasa (DEasa). El hecho que nos encontremos que en este año el verano esté caracterizado por estas 3 variables y en el año anterior solo por 1, es debido a la “*tendencia inversa*” que poseían estas variables, que como dijimos, puede ser debido a infinidad de sucesos, relacionados con las condiciones climatológicas entre otros. Para poder comprobar a que es debido este cambio tan drástico, hubiera sido bueno disponer de más periodos de muestreo para ver como se comportan estas variables al paso del tiempo, y encontrar así una posible explicación.

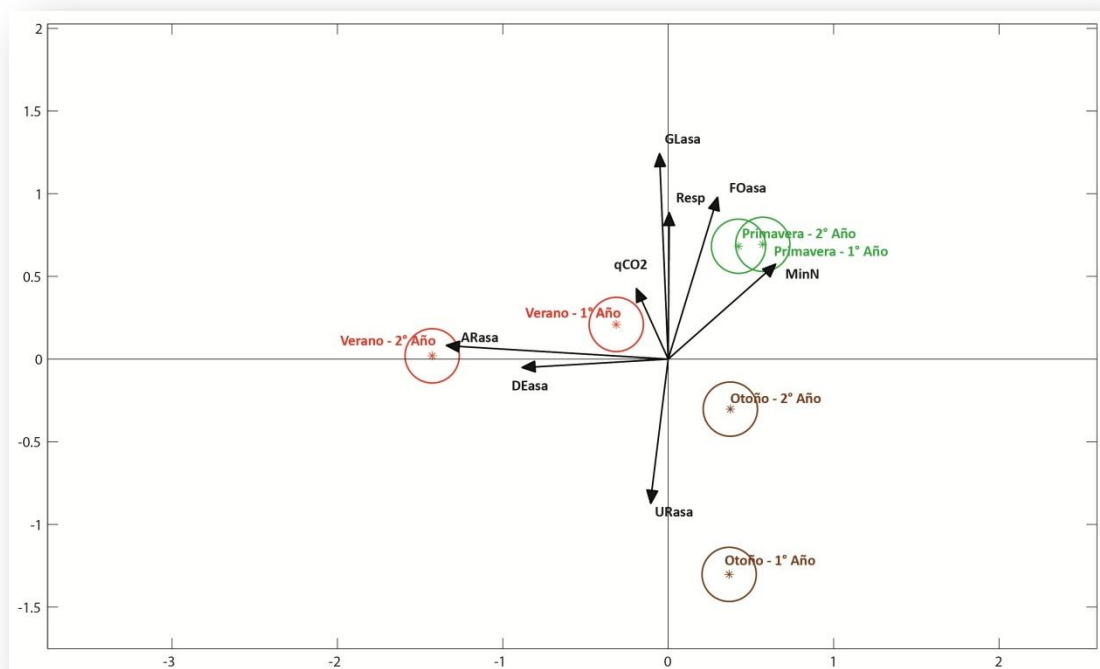
La primavera, de forma análoga al año anterior, presenta una variabilidad muy similar y caracterizada por las mismas variables.

El otoño es la estación, que en este caso, no se encuentra caracterizada por tener valores más elevados de una/s variables, sino por encontrarse valores inferiores de las variables. Es decir, se diferencia de la primavera, en que éste presenta unos valores inferiores tanto en Glucosidasa (GLasa), Fosfatasa (FOasa) como en Respiración basal (Resp) principalmente. Y de igual forma, lo diferenciamos del verano, al tomar valores inferiores respecto a la Arilsulfatasa (ARasa), Ureasa (URasa) y Deshidrogenasa (DEasa).

A pesar de estas ligeras diferencias, que pueden tener o no una explicación biológica, haciendo una lectura global, encontramos comportamientos similares tanto en el año 2009, como en el año 2010. Se observan claramente 3 estructuras bien diferenciadas, y las variables que en cada año caracterizan a estas estructuras, que son las estaciones, concuerdan de una manera similar.

Para contrastar estos agrupamientos y separaciones, podemos tratar los datos de una forma global, es decir, uniendo ambos años, y viendo si el comportamiento se mantiene, ya que es parte de lo que estamos pretendiendo demostrar.

## Variables Bioquímicas 1 – Datos Año 2009 y 2010



**Figura 38:** Representación Biplot de los resultados de un MANOVA de las variables *bioquímicas 1*, por estación y año.

Sin entrar en mucho detalle, puesto que ya hemos comentado la lectura de este tipo de gráficos, podemos observar que al tratar los datos como una unidad, se mantienen las tres estructuras bien diferenciadas, en el verano, otoño y primavera. Nuevamente representaremos para facilitar la lectura, las medias de los distintos muestreos acompañados de su región de confianza (95 %). (Figura 38)

En la primavera, los muestreos de ambos años presentan una gran similitud entre ellos, mientras que no ocurre lo mismo en las estaciones de verano y otoño, caracterizándose estas diferencias por una presencia mayor de ciertas propiedades bioquímicas en el suelo con el paso del tiempo.

A continuación, mostramos las calidades de representación de las variables en relación a los ejes factoriales de esta representación. (Tabla 17)



	Eje 1	Eje 2
<b>Glasa</b>	0,17	<b>89,65</b>
<b>Foasa</b>	7,3	<b>74,84</b>
<b>Arasa</b>	<b>97,55</b>	0,35
<b>Urasa</b>	0,71	<b>43,8</b>
<b>Deasa</b>	<b>62,52</b>	0,21
<b>MinN</b>	<b>33,53</b>	24,87
<b>Resp</b>	0	<b>73,96</b>
<b>qCO<sub>2</sub></b>	13,66	<b>63,81</b>

**Tabla 17:** Calidades de representación de las variables Bioquímicas 1, respecto de los ejes factoriales en la representación conjunta de los años 2009 y 2010.

La primavera se caracteriza por unos valores altos en la Fosfatasa (FOasa) presente en el suelo, al igual que Glucosidasa (GLasa), Mineralización de Nitrógeno (MinN) y Respiración basal (Resp).

El verano lo encontramos caracterizado por altos valores tanto de Arilsulfatasa (ARasa) como Deshidrogenasa (DEasa). Estos valores elevados en cuanto a la Deshidrogenasa (DEasa) recordemos que son debidos principalmente a los obtenidos en el año 2010, y que dicha variable presentaba la problemática de la “*tendencia invertida*”.

El otoño queda caracterizado principalmente por la actividad de la Ureasa (URasa) debido a los altos valores que presenta en la estación. Debemos recordar que esta variable posee la misma problemática que la Deshidrogenasa (DEasa), es decir, la “*tendencia invertida*” en ambos años.

En vista de los resultados, en relación a las variables que miden las propiedades bioquímicas del suelo, hemos visto comportamientos similares en ambos años de estudio, por lo que al igual que las variables microbiológicas, procederemos a fusionar los datos por estación. Mediante esta fusión, no consideraremos el efecto temporal de los datos ya que representaremos e interpretaremos los datos por estaciones, sin tener en cuenta el año en que se obtuvieron las muestras.

### 4.3. EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS DE SIEMBRA Y FERTILIZACIÓN SOBRE LA MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DEL SUELO

---

---

En esta sección, se trata de dar una imagen del efecto que tienen los tratamientos de siembra y tratamientos de fertilización, sobre las propiedades microbiológicas y bioquímicas principalmente y observar de forma breve su efecto sobre las variables químicas.

Como hemos visto en secciones anteriores, la estacionalidad en los datos era un factor importante, pero después de demostrar que las estructuras en ambos años eran similares, se procederá a realizar los análisis teniendo únicamente en cuenta la estación de los mismos, es decir, fusionando los datos de los años 2009 y 2010 y procediendo a su análisis por las estaciones de primavera, verano y otoño.

Para ello, se ha realizado un análisis de la redundancia (RDA) siendo una técnica de ordenación multivariante de análisis de correlación canónica. El objetivo de este tipo de análisis es centrarnos en explicar la variabilidad de los datos que viene mejor explicada por lo que el programa - CANOCO for Windows 4.5. - denomina “*variables ambientales*” – que en nuestro caso serán los tratamientos de siembra y fertilización – buscando para ello como dichos tratamientos explican la microbiología y bioquímica del suelo.

Con la utilización de este programa, tenemos la opción de hacer varios tipos de representaciones. Nos permite representar los resultados del análisis de la redundancia (RDA) con varios tipos de escalamientos, “*Inter-sample distance*”, “*Inter-species correlations*” y “*Symmetric*”. En los resultados que se muestran a continuación se ha utilizado dos tipos de escalamiento, siendo el “*Inter-sample distance*” – para optimizar las distancias reales entre las muestras en el subespacio de ordenación definido por las

variables – y el escalamiento “*Inter-species correlations*” – para optimizar la visualización de la correlación que se producen entre las variables -.

Comenzaremos viendo lo que ocurre a los tratamientos de siembra y fertilización en primer lugar para las propiedades del suelo del tipo microbiológico y posteriormente para las variables que nos miden las propiedades del tipo bioquímico, como hemos venido haciendo en análisis anteriores.

Antes de mostrar los resultados, y para una correcta visualización de los datos, debemos de hacer referencia a la leyenda que se ha utilizado en la elaboración de los gráficos, puesto que esta se decidió extraer del gráfico para facilitar su lectura e interpretación. En los distintos gráficos aparecen una serie de símbolos, que corresponden a los distintos tratamientos de siembra y fertilización. Para una mayor comprensión, en la Figura 39 aparecen representados dichos símbolos acompañados de su respectiva caracterización.

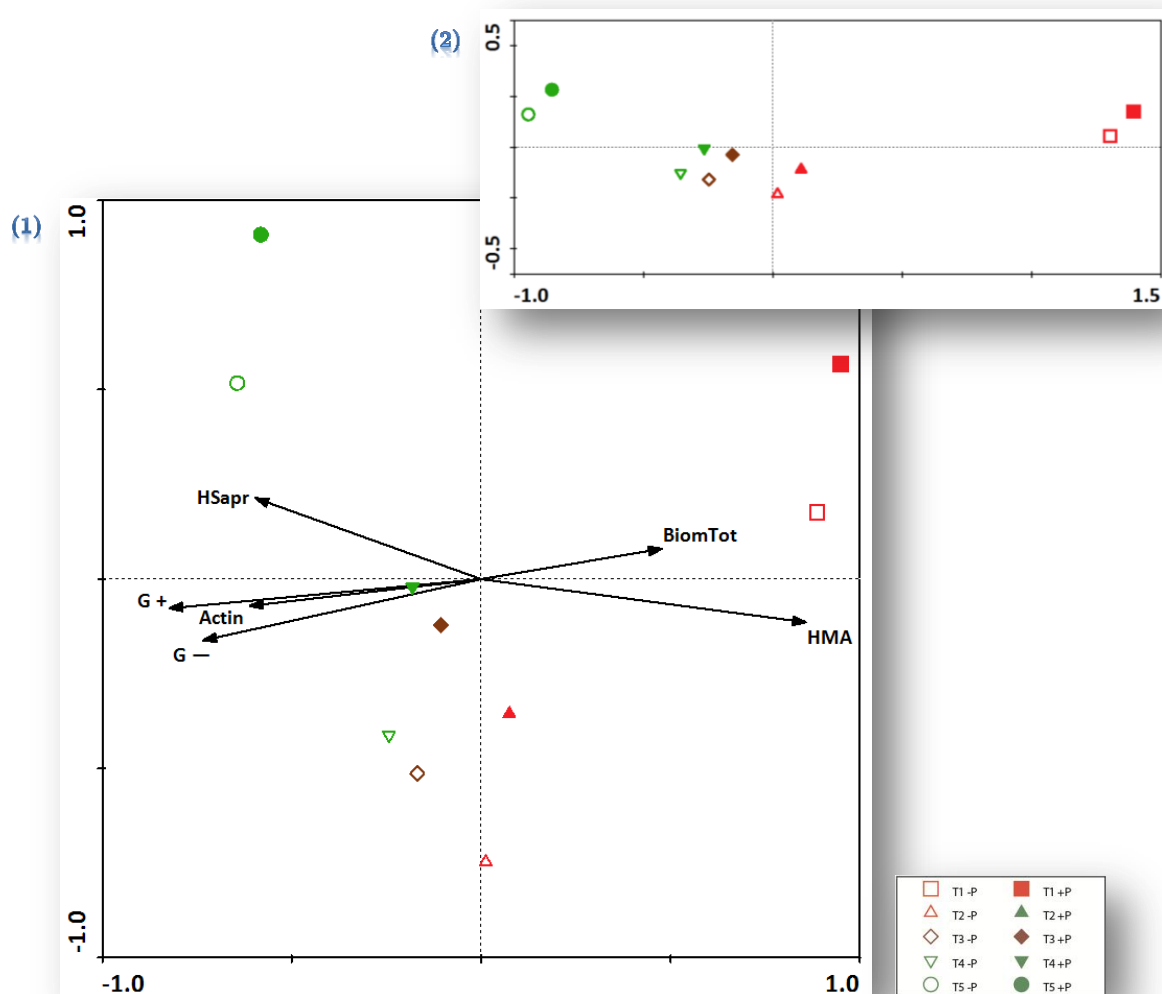


□	T1 -P	■	T1 +P
△	T2 -P	▲	T2 +P
◇	T3 -P	◆	T3 +P
▽	T4 -P	▼	T4 +P
○	T5 -P	●	T5 +P

**Figura 39:** Leyenda de las representaciones del RDA, identificándonos los tratamientos de siembra y fertilización.

Recordemos para este análisis que los resultados se mostraran por estaciones, independiente del año en que se obtuvo la muestra, por lo que se visualizaran los resultados relativos a la estación de primavera, verano y otoño.

En primer lugar, y de forma análoga a lo que venimos haciendo hasta el momento, analizaremos los resultados del tipo microbiológico de los resultados. Se mostrarán las representaciones obtenidas bajo un escalamiento “*Inter-species correlations*”, para visualizar como se comportan las variables en función de los tratamientos, y a su vez una representación con el escalamiento “*Inter-sample distance*”, mediante el cual veremos las diferencias que se producen entre los distintos tratamientos.



**Figura 40:** 1) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento *Inter-species correlation*, en la estación de PRIMAVERA con las variables *microbiológicas 1*. 2) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento *Inter-sample distance*, en la estación de PRIMAVERA con las variables *microbiológicas 1*.

En esta representación (Figura 40 (1)) se optimiza la correlación entre las variables representadas, siendo éstas las que nos miden las propiedades microbiológicas del suelo – biomasa microbiana y abundancia relativa de diferentes grupos de microorganismos -

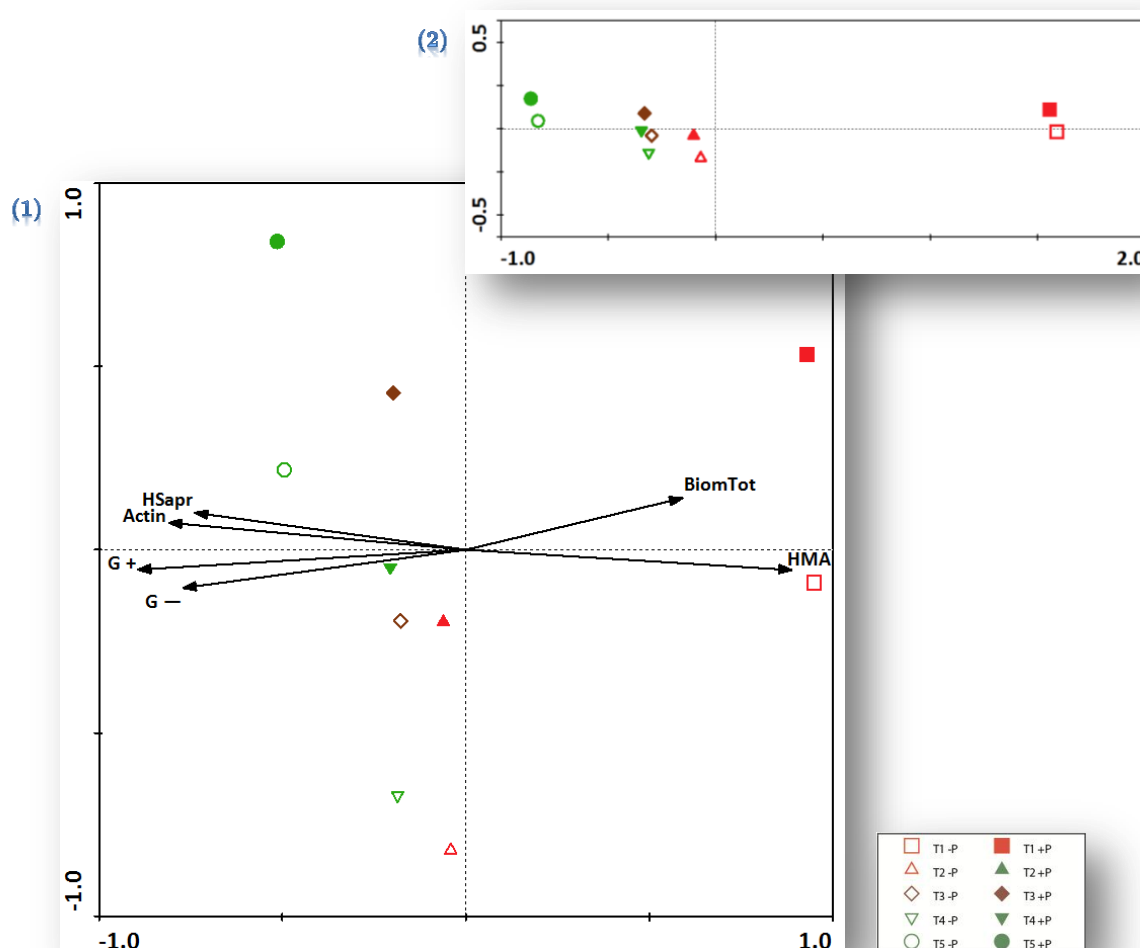
El eje 1 explica en gran medida esta ordenación (96,6%) el cual lo podemos relacionar con los tratamientos de siembra – refiriéndonos a los distintos porcentajes de cobertura vegetal – ya que tenemos una clara diferenciación de los mismos, el monocultivo de alfalfa (T5) – queda representado por los círculos verdes – y el monocultivo de dátilo (T1) – quedando representado por los cuadrados rojos -.

En relación a las variables, estamos viendo como la biomasa microbiana (BiomM) junto con los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) tienden a incrementar sus niveles en los suelos donde hay mayor abundancia de la especie dactilo – parte derecha del gráfico -. Por el contrario, el resto de microorganismos – Hongos Saprofitos (HSapr), Bacterias Gram Positivas (G+), Actinobacterias (Actin) y Bacterias Gram Negativas (G-) – lo hacen cuando en el suelo hay un mayor porcentaje de alfalfa – parte derecha del gráfico -.

La Figura 40 (2), nos está mostrando la misma representación anterior (Figura 41 (1)) con un escalamiento “*Inter-sample distance*”, en el cual se optimiza las distancias entre las muestras que se están analizando, caracterizadas en este caso por los tratamientos.

Se observa una clara distinción entre los diferentes suelos de monocultivos (T1 y T5) – correspondiendo con los cuadrados y los círculos respectivamente – y los suelos con una siembra mixta (T2, T3 y T4) que poseen características similares en cuanto a la microbiología del suelo. Se ve una mayor diferenciación entre los monocultivos de dátilos (T1) respecto a las parcelas con siembra mixta, que entre estos y los monocultivos de alfalfa (T5). Este hecho lo veremos reflejado en las distintas estaciones del estudio, y puede ser debido desde el punto de vista ecológico, a los altos valores que

presentan la biomasa microbiana (BiomM) y los Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) en los monocultivos de dátilo (T1) – correspondiente a los cuadrados -. Ya que los tratamientos con siembra mixta (T2, T3 y T4), también en todas las estaciones, presentan unas estructuras microbiológicas similares.



**Figura 41:** 1) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de VERANO con las variables *microbiológicas 1*. 2) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-sample distance, en la estación de VERANO con las variables *microbiológicas 1*.

En la representación de los datos correspondientes al verano (Figura 41), el primero de los ejes nuevamente nos está caracterizando la cobertura vegetal de nuestras parcelas – es decir, los distintos tratamientos – explicando casi la totalidad de la variabilidad de los datos (98,6 %).

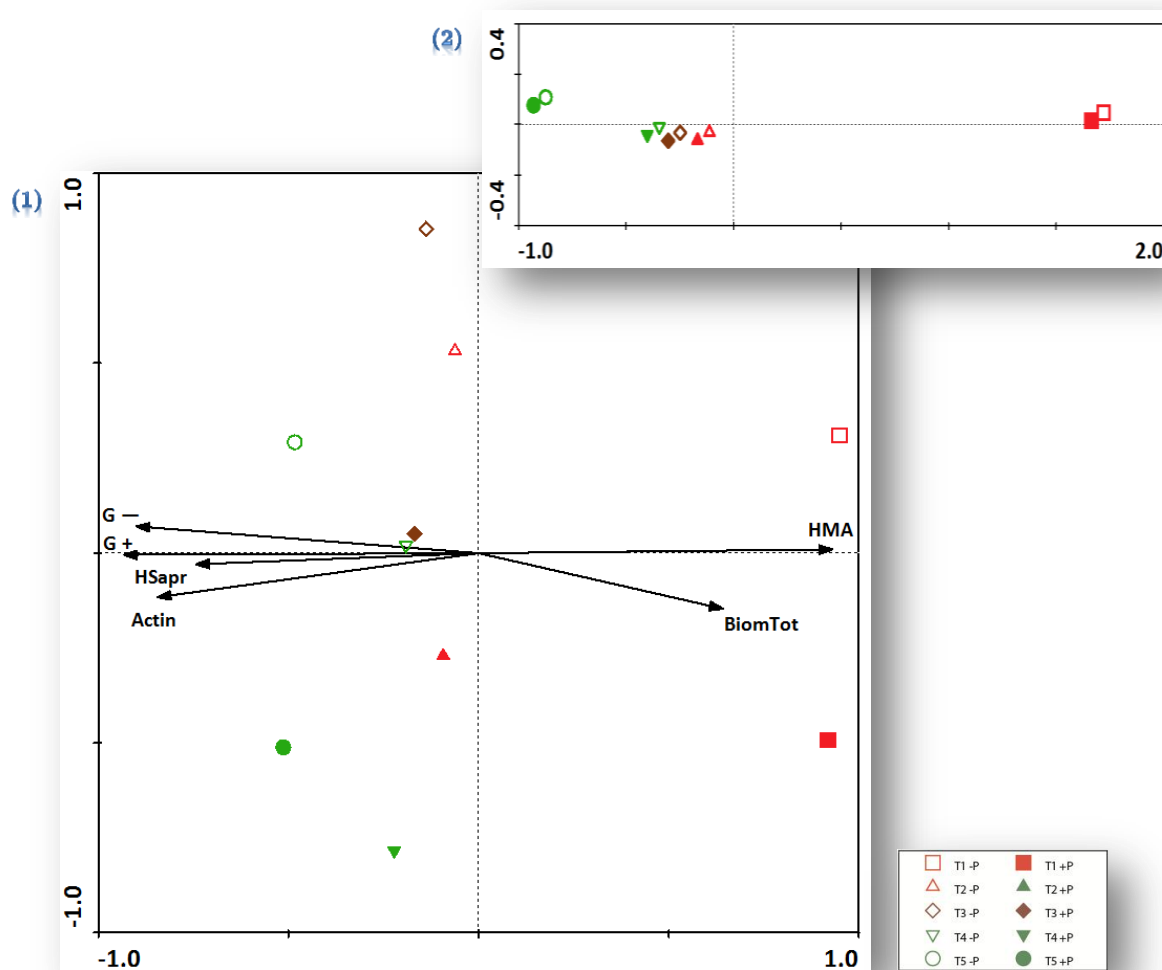
En relación a las variables, (Figura 41 (1)) vemos que se produce una correlación muy similar entre ellas respecto a la primavera, manteniéndose la estructura a la hora de interpretar o caracterizar el eje en función de las mismas.

Si atendemos a la diferenciación en los tratamientos, la separación entre ellos responde de igual forma que en la primavera, estando ordenados en función de los porcentajes de siembra que posee cada uno de ellos. Estas diferencias se pueden ver de una forma más clara en la representación con un escalamiento “*Inter-sample distance*”. (Figura 41 (2)).

Para finalizar con las variables que definen las propiedades del tipo microbiológico, observamos los resultados que se dan en otoño (Figura 42).

Vemos como la estructura que se da en las tres estaciones en relación a las variables representadas es muy similar en todas ellas (Figura 42 (1)). El eje 1 nuevamente nos explica prácticamente la totalidad de la variabilidad de los datos (99 %) indicándonos que la cobertura vegetal influye de forma decisiva en el conjunto de la microbiología del suelo. La biomasa microbiana (BiomM) junto con los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) siguen los mismos patrones que en las estaciones anteriores, indicándonos una mayor abundancia – HMA - y presencia – BiomM - de estas variables en los suelos con monocultivo de dátilo (T1) – cuadrados rojos a la derecha del gráfico -.

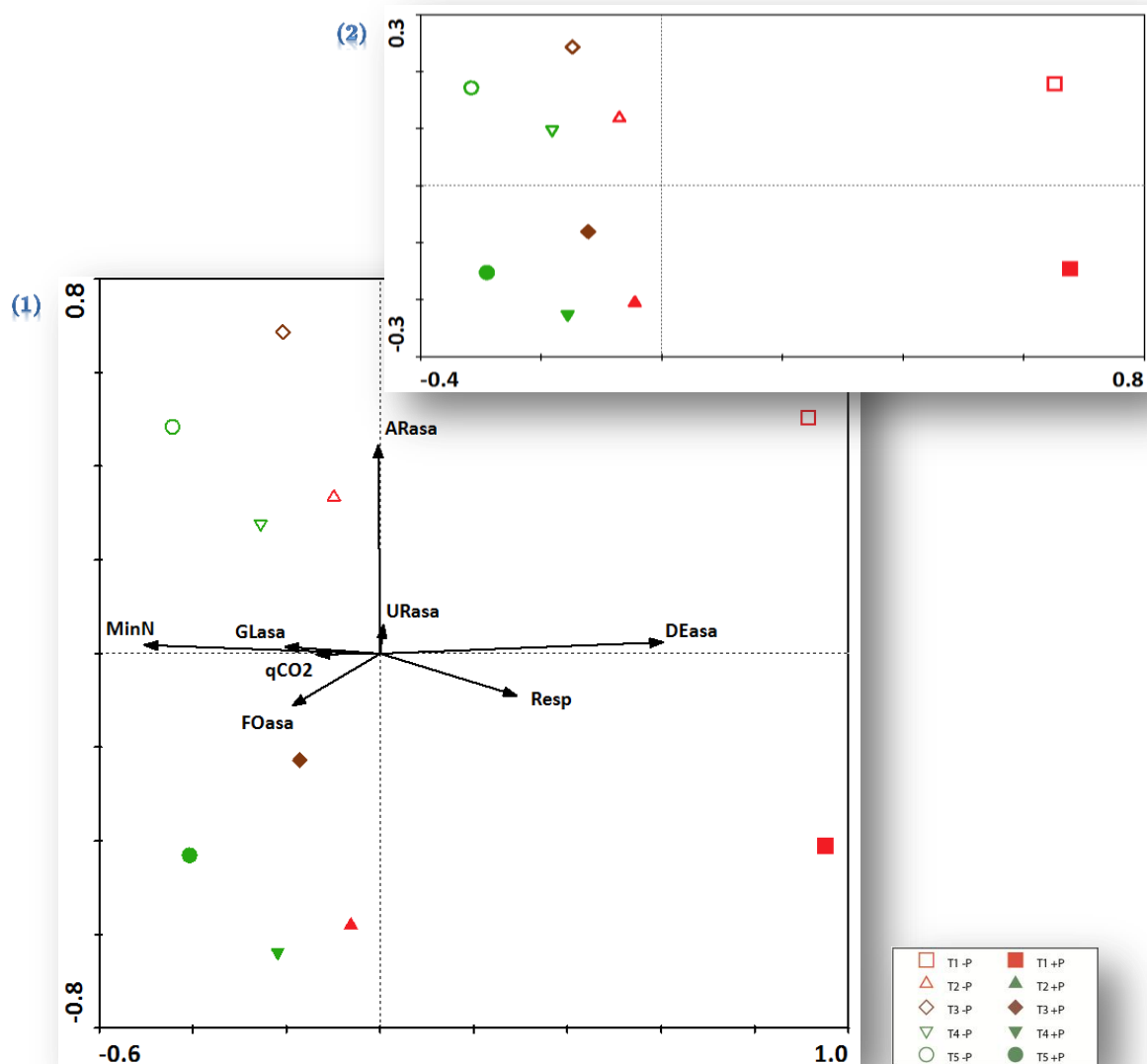
En cuanto a la diferenciación entre los tratamientos (Figura 42 (2)), nuevamente se observa las características comentadas anteriormente. La mayor separación se produce con los monocultivos de dátiles (T1) – cuadrados rojos – respecto del resto de tratamientos. Los tratamientos de siembra mixta, se comportan de forma similar en cuanto a la microbiología del suelo, debido a la similitud de porcentajes de dátilo y alfalfa dados en dichos tratamientos.



**Figura 42:** **1)** Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de OTOÑO con las variables *microbiológicas 1*. **2)** Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-sample distance, en la estación de OTOÑO con las variables *microbiológicas 1*.

Para ver los comportamientos que se producen en los suelos con distintos tratamientos de siembra y fertilización, con respecto a las variables del tipo bioquímico, procederemos de igual forma que en el caso de las propiedades microbiológicas, analizando los datos por estaciones.





**Figura 43:** 1) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de PRIMAVERA con las variables *bioquímicas* 1. 2) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter- sample distance, en la estación de PRIMAVERA con las variables *bioquímicas* 1.

El plano de representación para esta estación, presenta un alto porcentaje de variabilidad explicada de los datos en función de los tratamientos de siembra y fertilización, siendo un 82,8 %. El eje 1, que nos nuevamente se vuelve a relacionar con la cobertura vegetal de las parcelas, es el que mayor porcentaje explica (66,4%), quedando explicado el 16,4 % por el eje 2, que nos hace una separación de los tratamientos que han sido fertilizados (+P) de los que no (-P).

En la Figura 43 (1), se muestra los resultados para la primavera en relación a las propiedades del suelo del tipo bioquímico. Las variables que aportan una mayor información a esta ordenación son la Deshidrogenasa (DEasa), Mineralización de Nitrógeno (MinN) para el eje 1 y la Arilsulfatasa (ARasa) para el eje 2.

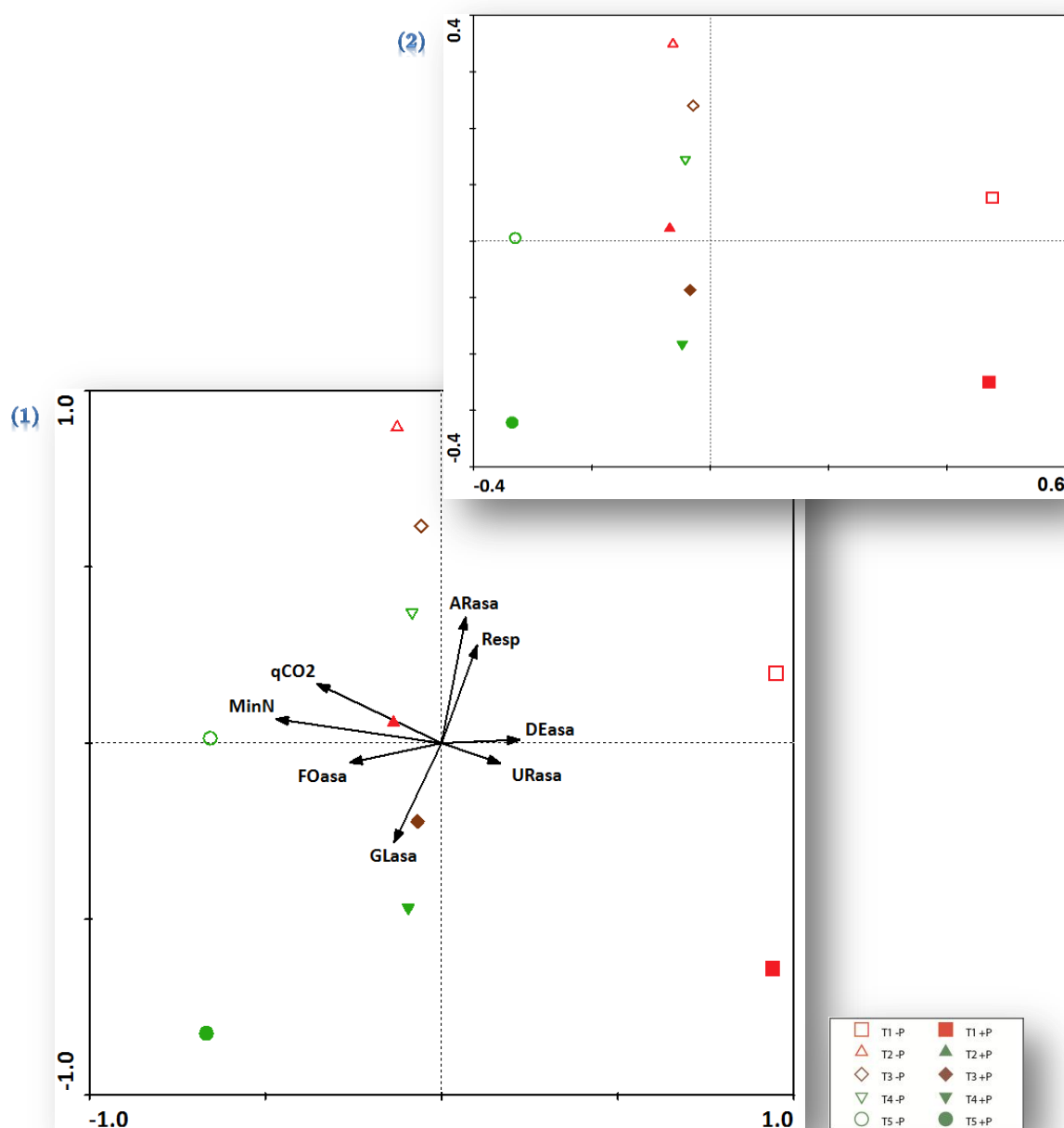
El eje 2, queda definido prácticamente por la Arilsulfatasa (ARasa), y vemos como independientemente de la combinación en la siembra de las parcelas – cobertura vegetal – aquellas que no fueron fertilizadas con el fertilizante fosfatado muestran unos valores superiores en esta variable, que en aquellos a los que se les aplicó.

El eje 1 se encuentra definido principalmente por la actividad de la Deshidrogenasa (DEasa) en sentido positivo y la Mineralización de Nitrógeno (MinN) en sentido negativo. Esto nos está indicando que en aquellas parcelas en las que hay un mayor porcentaje de dátilo esta propiedad tienen unos valores superiores, en especial en las parcelas que se encuentran con monocultivo de dátilo (T1) – cuadrados rojos -. De forma contraria ocurre con la Mineralización de Nitrógeno (MinN), encontrándose de una forma superior en las parcelas con mayor porcentaje de siembra de leguminosas, especialmente en el monocultivo de alfalfa (T5) – círculos verdes -.

La Respiración basal (Resp) mostró un incremento en las parcelas con monocultivo de dátilo (T1) y en las que además tuvieron el efecto del fertilizante fosfatado. La actividad referente a la fosfatasa (FOasa) se ve incrementada en las parcelas con un tratamiento de fertilización (+P), y a medida que aumenta el porcentaje de siembra de la alfalfa.

La Figura 43 (2), la cual nos muestra de una forma optimizada las principales diferencias entre las muestras analizadas – parcelas en nuestro caso caracterizadas por el tratamiento de siembra y fertilización -. Se ve una clara diferenciación entre los tratamientos de siembra y fertilización en relación a las propiedades bioquímicas del suelo. De igual forma que ocurría con las propiedades microbiológicas, se produce una mayor separación entre los monocultivos de dátilo (T1) – cuadrados – con el resto de tratamientos, debido a su mayor actividad de la Deshidrogenasa (DEasa) y su menor

tasa de mineralización de Nitrógeno (MinN) que se produce en él. A diferencia con las propiedades microbiológicas, los tratamientos con un monocultivo de alfalfa (T5) – círculos – muestran una mayor similitud a los tratamientos con siembra mixta (T2, T3 y T4). La utilización del fertilizante sobre las parcelas, para los mismos tratamientos de siembra, queda caracterizado por la reducción en la actividad de la Arilsulfatasa (ARasa) en aquellas parcelas que fueron tratadas con fertilizante fosfatado (+P).



**Figura 44:** 1) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de VERANO con las variables *bioquímicas* 1. 2) Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter- sample distance, en la estación de VERANO con las variables *bioquímicas* 1.

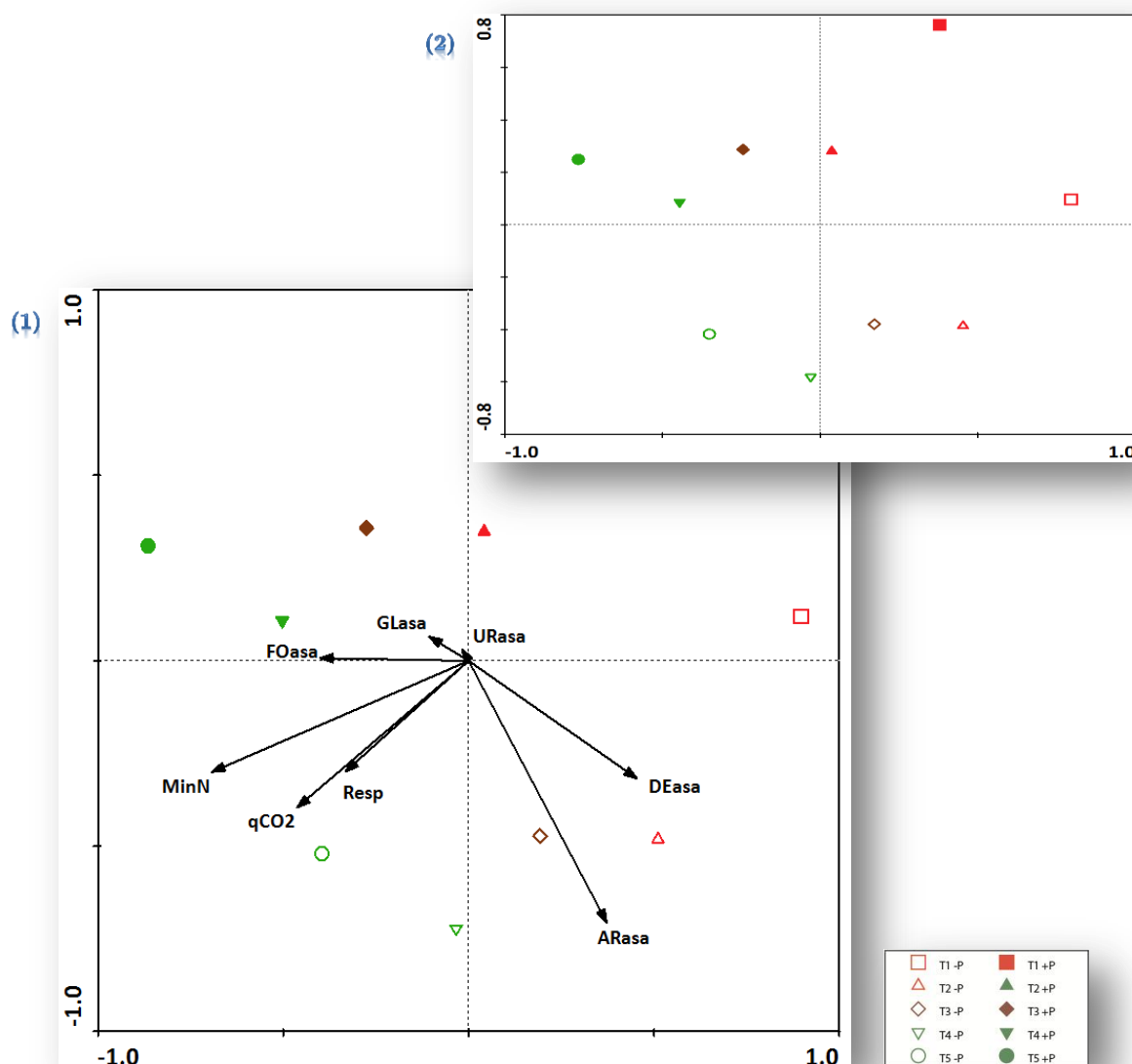
La representación que nos muestra la Figura 44, referente a los datos del verano, nos está enseñando una ordenación con un alto porcentaje de variabilidad explicada (80,3 %), siendo el 50,1 % el porcentaje explicado por el eje 1, y el 30,2 % el eje 2. En este caso vemos una similaridad de las variables en relación a su capacidad informativa, debido a que presentan módulos más similares entre ellos, con alguna diferencia. (Figura 44 (1))

La utilización del fertilizante fosfatado, y a diferencia de la primavera, muestra como en las parcelas fertilizadas (+P), tanto la Arilsulfatasa (ARasa) como la Respiración basal (Resp) presentan unos valores inferiores que en aquellas que no fueron fertilizadas (-P), ocurriendo el efecto contrario con la Glucosidasa (GLasa). Los monocultivos de dátilo (T1) – cuadrados – en este caso además de la Deshidrogenasa (DEasa) se encuentran caracterizados por la actividad de la Ureasa (URasa) – recordemos la problemática de la “*tendencia invertida*” en esta estación -. Por último, los tratamientos que poseen un monocultivo de alfalfa (T5) – círculos – se encuentran diferenciados del resto por sus altos valores en la Mineralización de Nitrógeno (MinN), Fosfatasa (FOasa) y el Coeficiente Metabólico ( $qCO_2$ ).

En cuanto a la diferenciación con los tratamientos (Figura 44 (2)), vemos como se repiten los patrones anteriores, donde los monocultivos (T1 y T5) – ya sean de dátilo o alfalfa – quedan situados de forma contraria y con una distancia significativa. En cuanto a los tratamientos con un porcentaje de siembra mixto (T2, T3 y T4) tienen comportamientos similares en relación a las propiedades bioquímicas también. La fertilización de las parcelas, queda definida perfectamente por la actividad que produce la Arilsulfatasa (ARasa) principalmente, descendiendo su valor en aquellas parcelas a las que fueron aplicadas dicho fertilizante.

Por último, con los datos referentes al otoño se consigue explicar un alto porcentaje de variabilidad correspondiendo con el 90,5 %. El eje 1 – definido por la cobertura vegetal – aporta un 49,8 % y el 40,7 % es aportado por el eje 2 – definido por la fertilización fosfórica -.

Observamos una actividad importante en Arilsulfatasa (ARasa) principalmente, aunque también con otras variables, en cuanto al factor referente la fertilización, ya que nos hace una distinción nuevamente entre parcelas fertilizadas (+P) y parcelas no fertilizadas (-P). (Figura 45 (1))



**Figura 45:** Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-species correlation, en la estación de OTOÑO con las variables *bioquímicas 1*. **2)** Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter- sample distance, en la estación de OTOÑO con las variables *bioquímicas 1*.

Los tratamientos de siembra con mayor porcentaje de alfalfa – situados a la izquierda – se encuentran caracterizados por valores elevados tanto en la Mineralización

de Nitrógeno (MinN), como en el Coeficiente Metabólico ( $qCO_2$ ) y Respiración basal (Resp) principalmente en aquellos que no han sido fertilizados.

En la representación con una optimización en las diferencias entre los tratamientos (Figura 45 (2)), se observa una mayor separación respecto del eje 2, que en las apreciadas en las estaciones anteriores. Esto nos indica, que en el otoño, la fertilización de las parcelas influyó, además de la actividad de la Arilsulfatasa (ARasa), sobre más parámetros bioquímicos que en estaciones anteriores.

Para finalizar este análisis, debido a las características de las variables que muestran las propiedades del tipo químico de suelo, y su importancia veremos de forma breve las principales características que se producen en relación distintos tratamientos.

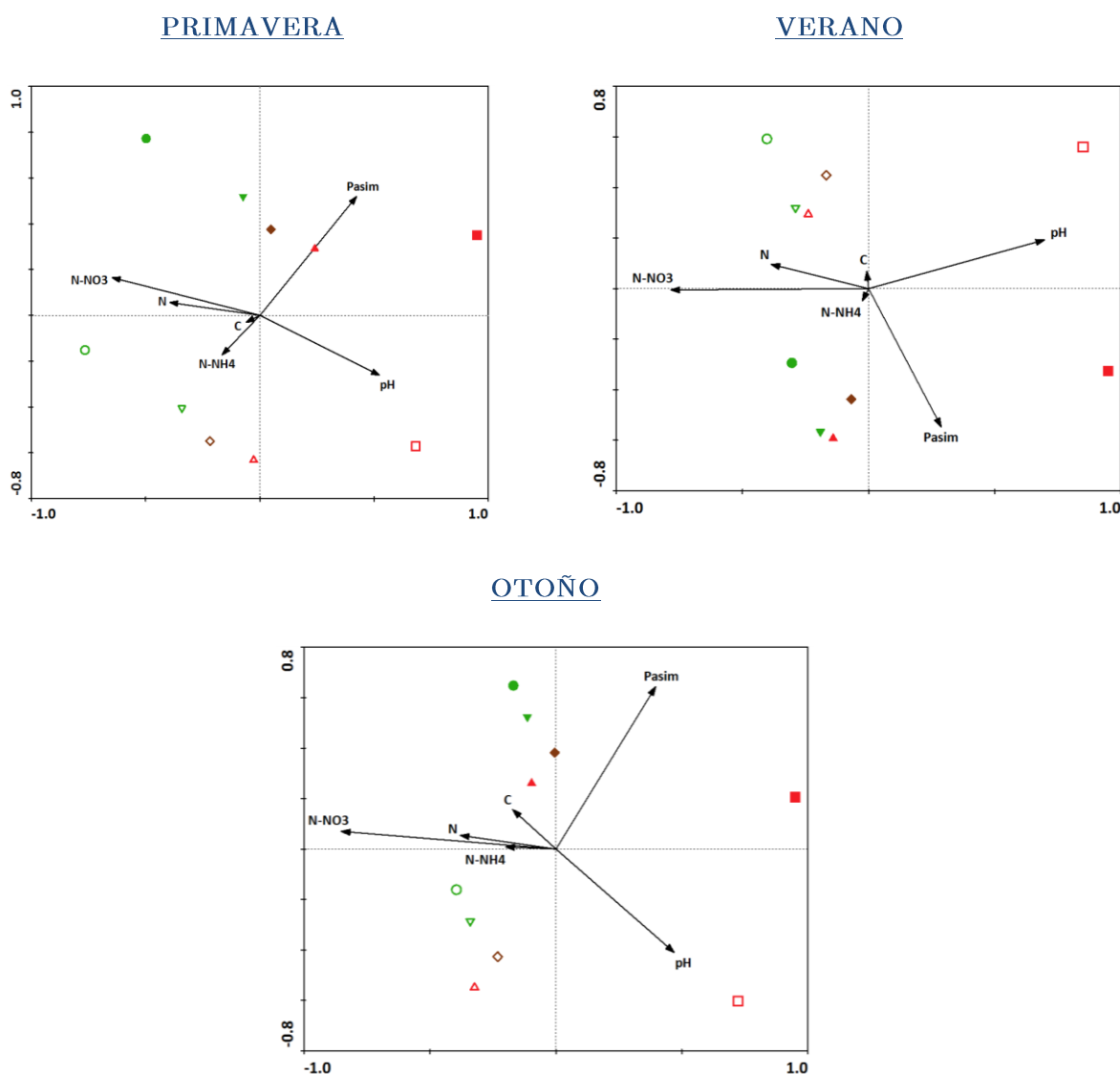
En las Figuras 46 se muestra la representación de estas variables – que recordemos son el Carbono (C), Nitrógeno (N), Concentración de fósforo (Pasim), Concentración de Nitrato ( $N-NO_3$ ), Concentración de Amonio ( $N-NH_4$ ) y el pH del suelo (pH) – sobre el plano de ordenación en función de los tratamientos de siembra y fertilización.

Se puede observar como en las tres estaciones, tenemos 3 variables que destacan del resto principalmente. Estas son la concentración de fósforo (Pasim), concentración de nitrato ( $N-NO_3$ ) y el pH de suelo.

En relación a la concentración de fósforo (Pasim) en el suelo, como es lógico, fue muy superior en aquellos suelos a los que se les aplicó el fertilizante fosfatado, sin tener ningún efecto sobre los distintos tratamientos de siembra en las parcelas.

En las tres estaciones, la concentración de Nitrato ( $N-NO_3$ ) se observar que ha tenido un efecto sobre la cobertura vegetal de las parcelas. Se ve claramente como presenta unos valores más elevados sobre a medida que nos encontramos en suelos que presentan una mayor cobertura vegetal de alfalfa – parte izquierda del gráfico -.En cuanto a la concentración de Amonio ( $N-NH_4$ ) no se observan comportamiento definido

en función de ambos tratamientos, al igual que ocurre con el Carbono (C), y el Nitrógeno (N).



**Figura 46:** Representación biplot de especies y muestras en el RDA, con un escalamiento Inter-sample distance, en la estación de primavera, verano y otoño con las variables Químicas 1.

Por último, en relación con el pH del suelo, observamos que fue mucho más elevado en los terrenos que presentaban monocultivo de dátilo (T1) y en especial en aquellas parcelas que fueron fertilizadas.

---

---

## 5 – DISCUSIÓN

---

---



## 5.1. DISCUSIÓN

---

---

Cuando trabajamos con datos biológicos, y especialmente en trabajos de campo donde no se pueden controlar todas las condiciones ambientales, el papel que juega el clima es fundamental en las propiedades biológicas del propio suelo (Frank and Groffman, 1998; Wardle, 1998). La climatología afecta de una forma muy significativa a las propiedades del suelo, al igual que a las propias composiciones microbiológicas y bioquímicas que puedan encontrar en el suelo. Por ejemplo, tanto la temperatura como la humedad afectan notablemente al tamaño, actividad y estructuras de las comunidades microbiológicas y bioquímicas de los suelos (Insam *et al.*, 1989; McGill *et al.*, 1986; Schimel y Clein, 1996).

Como hemos comprobado tras la realización de los análisis de los datos, las diferencias que obtenemos en relación a las estaciones son claras, especialmente con las propiedades de tipo bioquímico. La climatología con la que cuenta la provincia de Salamanca, pertenece a un clima mediterráneo continental llegando a unas temperaturas extremas tanto en el invierno como en el verano, y con un nivel bajo de precipitaciones, por lo que ambos factores condicionaran mucho las propiedades biológicas que se den en los suelo. Además, según algunos autores, las precipitaciones en esta región condicionan en gran medida la composición vegetal que se encuentre (Vázquez de Aldana *et al.*, 2008). Debido a este importante condicionamiento, la demostración de los efectos estacionales, se realizó sin tener en cuenta los tratamientos de fertilización además de los tratamientos de siembra, puesto que como causa de las fuertes interacciones entre la climatología y las variables de estudio, estas diferencias estarían muy presentes.

Si hablamos de las propiedades microbiológicas del suelo, hemos comprobado tras aplicar la técnica del MANOVA-Biplot, las diferencias que se producen tanto de forma estacional, como de forma temporal y además nos ha dado la oportunidad de conocer las variables responsables de dicha separación. En el año 2009, las estaciones se

encuentran especialmente diferenciadas a causa de la gran cantidad de biomasa microbiana (BiomM) registrada durante la primavera respecto a las demás estaciones, y teniendo en cuenta el factor temporal, ésta es mayor en el año 2010. Estas reducciones se pueden asociar a épocas de sequía y/o temperaturas elevadas (Bell *et al.*, 2009; Drenovsky *et al.*, 2010), y teniendo en cuenta las condiciones climatológicas dadas en dichos años, puede dar respuesta a ello, ya que el año 2009 fue extremadamente seco.

En relación a lo comentado en la literatura referente a este campo, las propiedades del suelo del tipo bioquímico, tienen un comportamiento totalmente esperado y lógico, puesto que estas variables se encuentran muy afectadas por la climatología estacional (Monokrousos *et al.*, 2004; Sardans *et al.*, 2008), como se ha podido demostrar con los resultados obtenidos de la realización del MANOVA-Biplot, obteniendo una solución perfectamente separada y agrupada en las diferentes estaciones.

Cuando queremos ver la relación que existe entre las propiedades microbiológicas del suelo y la cobertura vegetal que se encuentra en él, debemos de tener en cuenta que las propiedades rizosféricas de las plantas están influidas por las propiedades microbiológicas que se encuentran previamente en el suelo, y esto puede variar en función de la región en la que nos encontremos o cómo también es lógico en función de la tipología de suelo que tengamos (Hartmann *et al.*, 2009). En nuestro caso, tras los diferentes análisis de la redundancia (RDA) en cada una de las estaciones del estudio, hemos visto que tenían un comportamiento similar. Esto nos indica que la cobertura vegetal se encuentra caracterizada por las propiedades microbiológicas del propio suelo. Hemos comprobado que la especie de dátilo (T1) se encontraba perfectamente definida por la biomasa microbiana (BiomM) ligeramente en mayor medida en aquellas parcelas que fueron fertilizadas, y de manera similar los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) los cuales tenían ligeramente mayor pero en los dátiles (T1) no fertilizados.

De igual forma, pero con características contrarias, el resto de las propiedades microbiológicas medidas caracterizan a la alfalfa (T5) principalmente, siendo las bacterias gram positivas (G+), bacterias gram negativas (G—), actinobacterias (Actin) y hongos saprofitos (HSapr), teniendo una distinción clara. Por tanto, además de los condicionantes climatológicos que afectan de forma tan decisiva, debemos de tener cuenta el papel tan importante que juegan las comunidades de microorganismos en la rizosféricos (Fierer y Jackson, 2006; Garbeva *et al.*, 2004; Hinsinger *et al.*, 2009; Tamames *et al.*, 2010).

Las propiedades bioquímicas del suelo, no mostraron todas ellas el mismo patrón tras los análisis de los datos. En el caso de la Arilsulfatasa (ARasa) se pudo observar que se encontraba en cantidades mayores en aquellos suelos que no estaban fertilizados en todas las estaciones. Además, se ha visto un comportamiento independiente al tipo de siembra encontrado en las parcelas. Este comportamiento independiente se comprobó en un estudio realizado sobre suelos forestales de la región (Salazar *et al.*, 2011). Aquellas parcelas que tenían una presencia mayor de dáceos (T1) se vieron caracterizadas principalmente por la Deshidrogenasa (DEasa), al igual que de forma contraria los cultivos de alfalfa (T5) presentaron unos niveles mayores en la tasa de mineralización de nitrógenos (MinN), coeficiente metabólico ( $qCO_2$ ) y respiración basal (Resp)

---

---

# CONCLUSIONES

---

---

# CONCLUSIONES

---

---

Tras haber llevado a cabo los distintos análisis sobre los datos de que disponíamos y en base a los objetivos marcados inicialmente, podemos enunciar las siguientes conclusiones extraídas del estudio.

1. Tanto en las variables que miden las propiedades microbiológicas como bioquímicas del suelo, se ha podido comprobar a través de la realización del ANOVA MR la existencia del efecto estacional en ambos conjuntos de variables.
2. En las propiedades microbiológicas se ha podido demostrar de forma multivariante con la utilización del MANOVA-Biplot, la existencia del efecto estacional y temporal, además de poder ver las variables responsables de dicha diferenciación.
3. De igual forma, las propiedades de tipo bioquímico, se ha demostrado con la utilización del MANOVA-Biplot, el fuerte efecto estacional y que variables son las causantes del efecto tan significativo que supone la estación.
4. Las estructuras de comportamiento que se producen en ambos años en relación a las variables del tipo microbiológico y bioquímico, las podemos considerar similares, lo que nos da la oportunidad de fusionar los datos, para tratarlos de forma conjunta por estaciones.
5. Tanto para las variables del tipo microbiológico como bioquímico, dan lugar a caracterizaciones del suelo en función de las estaciones en la que nos encontremos, en algunos casos, se encuentran propiedades similares.
6. La composición microbiológica del suelo, caracteriza de forma clara a los distintos tipos de siembra aplicados. El dácilo (T1) se encuentra perfectamente identificado por la biomasa microbiana (BiomM) y los hongos micorrícicos

- arbusculares (HMA), pudiendo ser demostrado tras el análisis de la redundancia (RDA).
7. La composición microbiológica del suelo, nos caracteriza la especie de las gramíneas mediante principalmente por las bacterias gram positivas (G+), bacterias gram negativas (G—), hongos saprofitos (HSapr) y las Actinobacterias (Actin), habiendo sido demostrado tras obtener los resultados del análisis de la redundancia (RDA).
  8. La fertilización de las parcelas, en relación a las variables microbiológicas, no tuvo un efecto muy significativo en la composición del suelo.
  9. La Arilsulfatasa (ARasa) tiene un papel decisivo en cuanto al tratamiento de fertilización, ya que nos identifica en las tres estaciones la presencia o no de dicho fertilizante.
  10. Mediante la representación de los resultados tras la aplicación del Análisis de la Redundancia (RDA), se comprobó que las parcelas en las que se había aplicado un tratamiento de siembra mixta, tenían un comportamiento muy similar.
  11. En cuanto a las propiedades químicas del suelo, tienen una importancia relevante en las tres estaciones, el pH, la concentración de fósforo (Pasim), concentración de nitrato (N-NO<sub>3</sub>).

---

---

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

- Amaro IR, Vicente-Villardón JL, Galindo-Villardón MP** (2003): MANOVA Biplot para arreglos de tratamientos con dos factores basado en modelos Lineales Generales Multivariantes. *Interciencia* **29**: 26-32
- Annicchiarico P, Pecetti L, Bouzerzour H, Kallida R, Khedim A, Porqueddu C, Simoes NM, Volaire F and Lelievre F** (2011) Adaptation of contrasting cocksfoot plant types to agricultural environments across the Mediterranean basin. *Environmental and Experimental Botany* **74**: 82-89
- Bell CW, Acosta-Martínez V, McIntyre NE, Cox S, Tissue DT y Zak JC** (2009) Linking Microbial Community Structure and Function to Seasonal Differences in Soil Moisture and Temperature in a Chihuahuan Desert Grassland. *Microbial Ecology* **58**: 827-842
- Buee M, De Boer W, Martin F, van Overbeek L and Jurkevitch E** (2009) The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil* **321**: 189-212
- Buendía L** (2000) Principales Especies Pascícolas de Las Zonas Templadas. *Fundación Condal del Valle de Salazar*, Spain, pp: 67-71; 163-175
- Callaway RM** (1995) Positive interactions among plants. *Botanical Review* **61**: 306-349
- Clary J** (2008) Rainfall seasonality determines annual/perennial grass balance in vegetation of Mediterranean Iberian. *Plant Ecology* **195**: 13-20
- Cordell D, Drangert JO and White S** (2009) The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change-Human and Policy Dimensions* **19**: 292-305
- Cuadrado S, Lorenzo L.F** (1980) Estudio del suelo. I.O.A.T.O. Excmá. Diputación Provincial de Salamanca, Salamanca, Spain, pp 11-22
- da Rocha UN, van Overbeek L and van Elsas JD** (2009) Exploration of hitherto-uncultured bacteria from the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **69**: 313-328
- Drenovsky RE, Steenwerth KL, Jackson LE y Scow KM** (2010) Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. *Global Ecology and Biogeography* **19**: 27-39
- Fierer N and 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
- Finn, JD** (1974) A general model for multivariate analysis. *Holt, Rinehart, and Winston*, New York
- Frank DA and Groffman PM** (1998) Ungulate vs. landscape control of soil C and N processes in grasslands of Yellowstone National Park. *Ecology* **79**: 2229-2241
- Gabriel KR** (1971) The biplot-graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika*, **58**: 453-467.
- Gabriel KR** (1995) Manova biplots for two way contingency tables. Recent Advances in Descriptive Multivariate Analysis. *Clarendon Press, Oxford, RU*: 227-268.
- Gabriel KR and Odoroff CL** (1990) Biplot in biomedical research. *Statistics in Medicine* **9**: 469-485



- 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
- Gilbert N** (2009) Environment: The disappearing nutrient. *Nature* **461**: 716-718
- Gower J and Hand D.** (1996) Biplots. Monographs on statistics and applied probability. *Chapman y Hall*, London, UK
- Gittins R** (1985) Canonical analysis-a review with applications in ecology. *Springer-Verlag*, Berlin, Germany
- Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D and Berg G** (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil* **321**: 235-257
- Hector A, Schmid B, Beierkuhnlein C, Caldeira MC, Diemer M, Dimitrakopoulos PG, Finn JA, Freitas H, Giller PS, Good J, Harris R, Hogberg P, Huss-Danell K, Joshi J, Jumpponen A, Korner C, Leadley PW, Loreau M, Minns A, Mulder CPH, O'Donovan G, Otway SJ, Pereira JS, Prinz A, Read DJ, Scherer-Lorenzen M, Schulze ED, Siamantziouras ASD, Spehn EM, Terry AC, Troumbis AY, Woodward FI, Yachi S and Lawton JH** (1999) Plant diversity and productivity experiments in European grasslands. *Science* **286**: 1123-1127
- Hiltner L** (1904) Uber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache (On recent insights and problems in the area of soil bacteriology under special consideration of the use of green manure and fallowing). . *Arb Dtsch Landwirt Ges* **98**: 59-78
- Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D y Young IM** (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* **321**: 117-152
- Ingelmo F, Cuadrado S** (1986) El agua y el medio físico del suelo. Centro de edafología y biología aplicada (CSIC). Excm. Diputación Provincial de Salamanca, Salamanca, Spain, pp: 15-23
- Insam H, Parkinson D y Domsch KH** (1989) Influence of macroclimate on soil microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry* **21**: 211-221
- Jones DL and Hinsinger P** (2008) The rhizosphere: complex by design. *Plant and Soil* **312**: 1-6
- Kielak A, Pijl AS, van Veen JA and Kowalchuk GA** (2009) Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *ISME Journal* **3**: 378-382
- Lelievre F and Volaire F** (2009) Current and Potential Development of Perennial Grasses in Rainfed Mediterranean Farming Systems. *Crop Science* **49**: 2371-2378
- Livacic-Rojas P, Vallejo G, Fernández P** (2006) Procedimientos estadísticos alternativos para evaluar la robustez mediante diseños de medidas repetidas. Revista 9. Análisis de la varianza. *Probabilidad y Estadística [Schaum's Outline of Theory and Problems of Probability and Statistics]*, México D.F, pp: 335-371
- López L, Benítez-Vega J, Fernández P, López-Bellido, RJ** (2010) Influencia del sistema de laboreo en la rizodeposición de nitrógeno de habas y garbanzos. *Vida Rural* **320**: 44-48
- Loreau M** (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos* **91**: 3-17
- Lynch JP** (2007) Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany* **55**: 493-512
- Mata, A and Quevedo F** (1998) Diccionario didáctico de ecología. *Editorial de la Universidad de Costa Rica (UCR)* **387**: 16

- McGill WB, Cannon KR, Robertson JA y Cook FD (1986) Dynamics of soil microbial biomass and water-soluble organic C in Breton L after 50 years of cropping to 2 rotations. *Canadian Journal of Soil Science* **66**: 1-19
- Monokrousos N, Papatheodorou EM, Diamantopoulos JD y Stamou GP (2004) Temporal and spatial variability of soil chemical and biological variables in a Mediterranean shrubland. *Forest Ecology and Management* **202**: 83-91
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G and Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* **54**: 655-670
- Olea L and San Miguel-Ayanz A (2006) The Spanish dehesa. A traditional Mediterranean silvopastoral system linking production and nature conservation. *Grassland Science in Europe* **11**: 3-13
- Pedraza R, Teixeira K, Fernández A, García I, Bacas B, Azcón R, Baldani V, Bonilla R (2010) Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* **11(2)**: 155-164
- Rao, C. R. (1964): The use and interpretation of principal component analysis in applied research. *Sankhya A* **26**: 329-358
- Rubio G, (2002) Conectando el fósforo del suelo con la planta. *Informaciones Agronómicas del cono sur* **16**: 19-24
- Ruiz-Ochoa MA, Meléndez RA, Castellanos ML, Polanía JH (2006) Aplicación de medidas repetidas a cuatro propiedades edáficas en los manglares del Brazo Calancala, río Ranchería. *Rev. Acad. Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales* **115**: 233-242
- Ryan PR, Dessaux Y, Thomashow LS and Weller DM (2009) Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant and Soil* **321**: 363-383
- Salazar S, Sanchez LE, Alvarez J, Valverde A, Galindo P, Igual JM, Peix A y Santa-Regina I (2011) Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. *Ecological Engineering* **37**: 1123-1131
- Schimel JP y Clein JS (1996) Microbial response to freeze-thaw cycles in tundra and taiga soils. *Soil Biology & Biochemistry* **28**: 1061-1066
- Sardans J, Peñuelas J y Estiarte M (2008) Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology* **39**: 223-235
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H and Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4742-4751
- Spiegel MR, Schiller J, Srinivasan A (2007) 9. Análisis de la varianza. *Probabilidad y Estadística [Schaum's Outline of Theory and Problems of Probability and Statistics]*, México D.F, pp: 335-371
- Tamames J, Abellan JJ, Pignatelli M, Camacho A and Moya A (2010) Environmental distribution of prokaryotic taxa. *BMC Microbiology* **10**
- ter Braak CJF and Looman CWN (1994): Biplots in reduced-rank regression. *Biometrical Journal*, **36**: 983-1003
- Tilman D (1999) The ecological consequences of changes in biodiversity: A search for general principles. *Ecology* **80**: 1455-1474
- Trenbath BR and Brady NC (1974) Biomass Productivity of Mixtures. *In Advances in Agronomy*, Vol Volume 26. Academic Press, pp 177-210

- Tusell F** (2008) Análisis Multivariante. Capítulo 3: Análisis de la varianza multivariante, pp: 45-50
- Vance CP, Uhde-Stone C and Allan DL** (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* **157**: 423-447
- Van der Wollenberg AL** (1977): Redundancy analysis, an alternative for canonical correlation analysis. *Psychometrika* **42**: 207-219.
- Vázquez de Aldana BR, García-Ciudad A y García-Criado B** (2008) Interannual variations of above-ground biomass and nutritional quality of Mediterranean grasslands in Western Spain over a 20-year period. *Australian Journal of Agricultural Research* **59**: 769-779
- Vicente-Villardón JL** (1992) Una alternativa a las técnicas factoriales basada en una generalización de los métodos Biplot. *Tesis Doctoral* Universidad de Salamanca.
- Vicente-Villardón JL** (2004) Biplot Canónico – MANOVA Biplot. *Material didáctico* Universidad de Salamanca
- Vicente-Villardón, J.L.** (2010) *MULTBILOT: A package for Multivariate Analysis using Biplots*. Departamento de Estadística. Universidad de Salamanca. (<http://biplot.usal.es/ClassicalBiplot/introduction.html>).
- Wardle DA** (1998) Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: A global-scale synthesis. *Soil Biology & Biochemistry* **30**: 1627-1637

---

---

# ANEXOS

---

---

**ANEXO 1:** Prueba de Kolmogorov-Smirnov, en variables bioquímicas y microbiológicas, de cada uno de los muestreos.

Variables Bioquímicas 1	Año 2009		Año 2010	
	Z de K-S	Sig.	Z de K-S	Sig.
Primavera				
Glucosidasa	1,351	0,052	0,860	0,451
Fosfatasa	0,464	0,983	0,714	0,688
Arilsulfatasa	0,644	0,801	0,620	0,837
Ureasa	0,739	0,646	0,703	0,707
Deshidrogenasa	1,264	0,082	0,834	0,489
Mineralización de Nitrógeno	0,678	0,747	0,733	0,655
Respiración basal	0,843	0,477	0,949	0,328
Coefficiente Metabólico	0,471	0,979	0,773	0,589
Verano				
Glucosidasa	0,729	0,633	0,386	0,998
Fosfatasa	0,732	0,658	0,830	0,496
Arilsulfatasa	0,530	0,942	0,486	0,972
Ureasa	0,746	0,633	0,757	0,616
Deshidrogenasa	0,621	0,836	0,679	0,746
Mineralización de Nitrógeno	0,744	0,637	0,437	0,991
Respiración basal	0,528	0,943	0,879	0,423
<b>Coefficiente Metabólico</b>	<b>1,521</b>	<b>0,020</b>	0,852	0,462
Otoño				
Glucosidasa	0,583	0,886	0,520	0,950
Fosfatasa	0,778	0,580	0,853	0,460
Arilsulfatasa	0,642	0,804	0,626	0,828
Ureasa	0,450	0,987	0,566	0,906
Deshidrogenasa	0,405	0,997	0,909	0,381
Mineralización de Nitrógeno	0,489	0,971	0,585	0,883
Respiración basal	0,644	0,801	0,835	0,489
Coefficiente Metabólico	0,713	0,690	0,485	0,973

Variables Microbiológicas 1	Año 2009		Año 2010	
	Z de K-S	Sig.	Z de K-S	Sig.
Primavera				
Biomasa Microbiana	0,692	0,724	0,769	0,594
Bacterias Gram +	0,855	0,458	0,921	0,365
Actinobacterias	0,637	0,811	1,088	0,187
Bacterias Gram —	0,623	0,832	0,932	0,350
Hongos Saprofitos	0,710	0,694	0,694	0,722
Hongos Micorrícicos arbusculares	0,638	0,811	1,044	0,226
Verano				
Biomasa Microbiana	0,559	0,914	0,824	0,505
Bacterias Gram +	0,670	0,760	1,360	0,490
Actinobacterias	0,690	0,729	1,325	0,060
<b>Bacterias Gram —</b>	<b>0,585</b>	<b>0,883</b>	<b>1,473</b>	<b>0,026</b>
Hongos Saprofitos	0,922	0,364	0,707	0,700
Hongos Micorrícicos arbusculares	0,689	0,729	0,893	0,403
Otoño				
Biomasa Microbiana	0,485	0,973	1,261	0,083
<b>Bacterias Gram +</b>	<b>1,308</b>	<b>0,065</b>	<b>1,478</b>	<b>0,025</b>
Actinobacterias	0,943	0,336	0,689	0,729
<b>Bacterias Gram —</b>	<b>1,186</b>	<b>0,120</b>	<b>1,527</b>	<b>0,019</b>
Hongos Saprofitos	0,804	0,538	1,082	0,192
<b>Hongos Micorrícicos arbusculares</b>	<b>1,043</b>	<b>0,227</b>	<b>1,417</b>	<b>0,036</b>

**ANEXO 2:** Resultados globales del análisis del MANOVA Biplot para las variables Microbiológicas 1.

**Variables Microbiológicas 1 - Año 2009**

Eje	Eigenv.	% Expl.	% Expl. Cum.	S.C.T.	S.C.E.	F	p-valor
1	0,740	60,375	60,375	1,548	0,548	32,070	0,000
2	0,600	39,625	100	1,360	0,360	21,048	0,000
3	0	0	100	1	0		

Global contrast based on **Wilk's Lambda : 8.4176**

The F statistics follows a Snedecor's F with 12 & 224 d.f.

**p-value : 0.000**

**Variables Microbiológicas 1 - Año 2010**

Eje	Eigenv.	% Expl.	% Expl. Cum.	S.C.T.	S.C.E.	F	p-valor
1	0,537	72,383	72,383	1,288	0,288	16,877	0,000
2	0,332	27,617	100	1,110	0,110	6,439	0,000
3	0	0	100	1	0	0,000	1,000

Global contrast based on **Wilk's Lambda : 3.6579**

The F statistics follows a Snedecor's F with 12 & 224 d.f.

**p - value : 0.000**

**Variables Microbiológicas 1 - Año 2019 y 2010**

Eje	Eigenv.	% Expl.	% Expl. Cum.	S.C.T.	S.C.E.	F	p-valor
1	1,006	65,594	65,594	2,013	1,013	47,405	0,000
2	0,587	23,306	91,899	1,344	0,344	16,107	0,000
3	0,321	6,986	98,885	1,103	0,103	4,828	0,000
4	0,106	0,757	99,642	1,011	0,011	0,523	0,759
5	0,073	0,358	100	1,005	0,005	0,247	0,941
6	0	0	100	1	0	0,000	1,000

Global contrast based on **Wilk's Lambda : 7.2408**

The F statistics follows a Snedecor's F with 30 & 918 d.f.

**p - value : 0.000**

**ANEXO 3:** Resultados globales del análisis del MANOVA Biplot para las variables Bioquímicas 1

**Variables Bioquímicas 1 - Año 2009**

Eje	Eigenv.	% Expl.	% Expl. Cum.	S.C.T.	S.C.E.	F	p-valor
1	3,050	57,476	57,476	10,301	9,301	544,130	0,000
2	2,623	42,524	100	7,882	6,882	402,573	0,000
3	0	0	100	1	0	0,000	1,000

Global contrast based on **Wilk's Lambda : 110.146**

The F statistics follows a Snedecor's F with 16 & 220 d.f.

**p - value : 0.000**

**Variables Bioquímicas 1 - Año 2010**

Eje	Eigenv.	% Expl.	% Expl. Cum.	S.C.T.	S.C.E.	F	p-valor
1	3,372	68,564	68,564	12,370	11,370	665,118	0,000
2	2,283	31,436	100	6,213	5,213	304,946	0,000
3	0	0	100	1	0	0,000	1,000

Global contrast based on **Wilk's Lambda : 106,787**

The F statistics follows a Snedecor's F with 12 & 220 d.f.

**p - value : 0.000**

**Variables Bioquímicas 1 - Año 2019 y 2010**

Eje	Eigenv.	% Expl.	% Expl. Cum.	S.C.T.	S.C.E.	F	p-valor
1	2,752	38,423	38,423	8,576	7,576	354,568	0,000
2	2,685	36,572	74,995	8,211	7,211	337,485	0,000
3	1,947	19,228	94,223	4,791	3,791	117,437	0,000
4	0,901	4,119	98,342	1,812	0,812	38,007	0,000
5	0,572	1,658	100	1,327	0,327	15,301	0,000
6	0	0	100	1	0	0,000	1,000

Global contrast based on **Wilk's Lambda : 90.535**

The F statistics follows a Snedecor's F with 40 & 992 d.f.

**p - value : 0.000**

