

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA
DE UN SUELO DE PRADERA DE *Dactylis glomerata* y *Medicago
sativa* BAJO DIFERENTES PROPORCIONES DE SIEMBRA**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por la licenciada

MARISOL MEDINA SIERRA

Salamanca, 2012

Fdo: Marisol Medina Sierra



Los Dres. **José Mariano Igual Arroyo**, Científico Titular del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA), perteneciente a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); y **Ángel Valverde Portal**, Lecturer en la Universidad de Pretoria (Sudáfrica)

CERTIFICAMOS:

Que la memoria titulada “CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE UN SUELO DE PRADERA DE *Dactylis glomerata* y *Medicago sativa* BAJO DIFERENTES PROPORCIONES DE SIEMBRA”, presentada por D^a **Marisol Medina Sierra** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el IRNASA-CSIC, y autorizamos su defensa.

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Salamanca, a 30 de Junio de 2012.

Fdo: Dr. José Mariano Igual Arroyo

Fdo: Dr. Ángel Valverde Portal

V^oB^o el Tutor,

Fdo: Dr. Eustoquio Martínez Molina

LUIS ROMÁN FERNÁNDEZ LAGO, DIRECTOR EN FUNCIONES DEL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE UN SUELO DE PRADERA DE *Dactylis glomerata* y *Medicago sativa* BAJO DIFERENTES PROPORCIONES DE SIEMBRA”, presentada por D^a Marisol Medina Sierra para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. José Mariano Igual Arroyo y Ángel Valverde Portal en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, y la tutoría del Dr. Eustoquio Martínez Molina, profesor del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Salamanca a 30 de Junio de 2012.

Fdo: Luis Román Fernández Lago

La realización de esta tesis ha sido financiada con una beca de financiación tripartita entre la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia), COLCIENCIAS (Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colombia) y recursos propios.

Dedicatoria

A mis hijos: Laura Selene y Nicolás

A todos, mis más sinceros agradecimientos:

➤ Entidades:

Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia (UdeA).

Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colombia (COLCIENCIAS).

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España (IRNASA-CSIC).

Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG-CSIC).

Universidad de Salamanca (USAL).

➤ Personal del IRNASA (CSIC):

Departamento de Desarrollo Sostenible de Sistemas Agroforestales y Ganaderos del IRNASA (CSIC): José Mariano Igual Arroyo, Ángel Valverde Portal, Ignacio Santa Regina Rodríguez, María González Tirante, Jesús Hernández Pombero, Agustín Rincón Rodríguez, Onofrio Gallina. Personal de prácticas: Victoria Duarte Pérez, Juan Pedro Madera Castro, Alicia Gómez Moriano, Miriam Sánchez, Verónica Barbero, Helena Serrano Moscoso.

Estación Experimental Muñovela: Luis García Criado, Ángel Luis Iglesias Pascual y Cesáreo Pérez Rincón.

Servicio de análisis e instrumentación: Miguel González Villegas, Miguel Tapia Cid, Ana Gema Sánchez Mayordomo, José Antonio Casaseca Sánchez.

Biblioteca: Ana Baillo Almuzara, Luis Martín Montero.

Otras dependencias: Lorena Carro García, José Manuel Ordax de Castro, Luis Fernando Lorenzo Martín, Javier Córdoba Jacoste, Pilar Pérez Pérez, Beatriz Rodríguez Vázquez de Aldana, Juan Bautista Arellano Martínez.

➤ Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG-CSIC)

Monserrat Diaz Raviña, y a su Grupo de Investigación.

➤ Centro Técnico de Informática de Madrid (CTI-CSIC):

Laura Barrios Álvarez.

➤ ***Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca:***

Purificación Galindo Villardón, Javier Martín Escribano.

➤ ***Universidad de Antioquia, Colombia:***

Luz Estela Sánchez Herrera, Sara María Márquez Girón, Rocío Restrepo Suárez, Juan David Sorza Zapata, Fernando Restrepo Betancur.

➤ ***Personal de otras Instituciones a quienes agradezco:***

Gloria Estela Mazo Carvajal, María Inmaculada Sampedro Quesada, Sylvia Pajares Moreno, Francisco Hernando Orozco, Jimmy Álvarez Díaz.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Interacciones plantas-microorganismos en la rizosfera	5
1.1.1. La rizodeposición: el mecanismo de actuación de la planta sobre su rizosfera	5
1.1.2. Influencia de la planta sobre la microbiota rizosférica	8
1.1.3. Grupos principales de microorganismos rizosféricos	11
1.1.3.1. Bacterias	12
1.1.3.2. Hongos	15
1.1.3.3. Arqueas	16
1.1.3.4. Virus	17
1.2. La fertilización fosfórica	17
1.2.1. El fósforo en el suelo	17
1.2.2. Adquisición de fósforo por la planta	18
1.2.3. Evolución histórica y perspectivas de los fertilizantes fosfóricos	20
1.2.3.1. El agotamiento de las reservas de fosfato de roca	20
1.2.3.2. Riesgos ambientales los fertilizantes fosfóricos	22
1.2.3.3. Aprovechamiento del fósforo y diversidad vegetal	25
1.3. Agroecosistemas de pastos	27
1.3.1. Los pastos como sistemas modelo en ecología	27
1.3.2. Importancia económica y ecológica de los pastos	28
1.3.2.1. Evolución histórica de los sistemas de pastos en Europa	29
1.3.2.2. Los sistemas de pastos en Castilla y León. La dehesa	31
1.3.2.3. Especies pascícolas perennes	33
1.3.2.3.1. El dactilo (<i>Dactylis glomerata</i> L.)	33
1.3.2.3.2. La alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	34
1.4. Bioindicadores de la calidad del suelo y estructura de la comunidad microbiana	34
1.4.1. Respiración del suelo	37
1.4.2. Mineralización del nitrógeno	38
1.4.3. Actividades enzimáticas	39
1.4.3.1. Fosfatasas	40

1.4.3.2. β -glucosidasas	42
1.4.3.3. Arilsulfatasas.....	43
1.4.3.4. Ureasa	43
1.4.3.5. Deshidrogenasa	44
1.4.4. Estructura de la comunidad microbiana del suelo: perfil de ácidos grasos	45
2. OBJETIVOS.	48
3. MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1. Descripción de la zona experimental	49
3.1.1. Suelos	49
3.1.2. Vegetación	49
3.1.3. Condiciones climáticas	50
3.2. Tratamientos experimentales y toma de muestras	51
3.2.1. Establecimiento de las parcelas y diseño experimental	51
3.2.2. Muestreo de los suelos	54
3.3. Análisis de los suelos	54
3.3.1. Estructura de la comunidad microbiana: perfil de ácidos grasos del suelo	55
3.3.1.1. Extracción y purificación de los ácidos grasos	55
3.3.1.2. Análisis cromatográfico	56
3.3.2. Propiedades generales del suelo	59
3.3.2.1. pH	59
3.3.2.2. Carbono total	59
3.3.2.3. Nitrógeno total	59
3.3.2.4. Fósforo inorgánico asimilable	60
3.3.3. Propiedades bioquímicas	60
3.3.3.1. Actividades enzimáticas	60
3.3.3.1.1. Actividad fosfatasa (fosfomonoesterasa)	60
3.3.3.1.2. Actividad glucosidasa (β -D-glucosidasa)	61
3.3.3.1.3. Actividad arilsulfatasa.	62
3.3.3.1.4. Actividad ureasa	62
3.3.3.1.5. Actividad deshidrogenasa	63

3.3.3.2. Respiración microbiana del suelo	64
3.3.3.3. Mineralización de nitrógeno, y nitrógeno inorgánico asimilable	64
3.3.4. Otras determinaciones	66
3.3.4.1. Análisis granulométrico	67
3.3.4.2. Cationes asimilables	68
3.3.4.3. Capacidad de intercambio catiónico	68
3.3.4.4. Contenido de carbonatos	68
3.4. Análisis estadístico de los datos	68
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
4.1. Estudio de la dinámica temporal y estacional de las propiedades microbiológicas y bioquímicas del suelo	71
4.1.1. Propiedades microbiológicas	72
4.1.1.1. Biomasa microbiana y abundancia relativa de los grupos microbianos	72
4.1.1.2. Estructura de la comunidad microbiana	74
4.1.2. Propiedades bioquímicas	79
4.1.3. Discusión	84
4.1.3.1. Propiedades microbiológicas	85
4.1.3.1. Propiedades bioquímicas	88
4.2. Estudio de los efectos de la cobertura vegetal y la fertilización fosfórica sobre las propiedades microbiológicas y bioquímicas del suelo	90
4.2.1. Propiedades microbiológicas	91
4.2.1.1. Biomasa microbiana y abundancia relativa de los grupos microbianos	91
4.2.1.2. Estructura de la comunidad microbiana	97
4.2.2. Propiedades bioquímicas	99
4.2.3. Parámetros químicos del suelo	107
4.2.4. Discusión	110
4.2.4.1. Propiedades microbiológicas	110
4.2.4.2. Propiedades bioquímicas	113

5. CONCLUSIONES	118
6. BIBLIOGRAFÍA	120
7. ANEXOS	150

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El suelo 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 terrestres (Nannipieri *et al.*, 2003). En él se producen fuertes y complejas interacciones entre las raíces de las plantas, la fauna y los microorganismos que lo habitan, así como de todos ellos con los propios constituyentes abióticos del suelo. Es por tanto una entidad viva y dinámica, de cuya condición depende el sustento de la humanidad y la vida en la Tierra (Doran *et al.*, 1996).

En el medio terrestre, la diversidad y funcionamiento global del ecosistema se considera regida por la diversidad, la estructura y la productividad del componente vegetal. Por ejemplo, la estructura y actividad de la microbiota edáfica está relacionada, a escala local, con la composición de especies vegetales y la edad del ecosistema (Grayston *et al.*, 2001; Priha *et al.*, 1999); influyendo también en ella factores ambientales como el tipo de suelo, el contenido de nutrientes, el pH y la humedad. Pero a su vez, las comunidades microbianas condicionan las interacciones entre plantas, el balance de nutrientes y la productividad del ecosistema (Chen *et al.*, 2008a; Sanon *et al.*, 2009). La naturaleza dinámica e interactiva de las relaciones planta-microorganismos-suelo genera sistemas de retroalimentación que confieren estabilidad y resiliencia a los ecosistemas, siendo esenciales para su productividad y funcionamiento (Bever, 2003), y para comprenderlas mejor es necesario un enfoque multidisciplinar de los estudios (Copley, 2000; Van Breemen y Finzi, 1998).

1.1. INTERACCIONES PLANTAS-MICROORGANISMOS EN LA RIZOSFERA.

1.1.1. LA RIZODEPOSICIÓN: EL MECANISMO DE ACTUACIÓN DE LA PLANTA SOBRE SU RIZOSFERA.

La rizosfera (Hiltner, 1904), definida como el volumen de suelo biológicamente activo donde interactúan las raíces de las plantas con la comunidad microbiana,

concentra una gran fracción de la biodiversidad total de la Tierra, siendo probablemente el hábitat más dinámico del planeta (Jones y Hinsinger, 2008).

La vasta cantidad de carbono orgánico aportado al suelo por la planta mediante la rizodeposición sustenta a la microbiota edáfica, a la vez que media las interacciones multipartitas que se dan en la rizosfera. La rizodeposición comprende fenómenos de difusión y secreción, así como de lisis de las células epidérmicas. Mediante el fenómeno de difusión, las moléculas polares pequeñas y compuestos sin carga eléctrica son transportados a través de la fracción lipídica de las membranas celulares. Esta difusión pasiva depende de la permeabilidad de la membrana y del pH citosólico. Otros compuestos atraviesan la membrana por canales proteicos, y su paso está condicionado por el gradiente electroquímico entre el citosol y el apoplasto. Finalmente, los compuestos de alto peso molecular son secretados dentro de vesículas, aunque la naturaleza de este fenómeno está menos comprendida (Badri y Vivanco, 2009). Mediante estos procesos en su conjunto, y según lo calculado para pastizales de zonas templadas, la tasa de aporte de carbono al suelo del componente vegetal puede alcanzar los 167 mg de C kg⁻¹ suelo día⁻¹ (Jones *et al.*, 2009).

Los exudados radiculares son de muy diversa naturaleza química y poseen distintas funciones biológicas (Tabla 1.1.) (Faure *et al.*, 2009). El tipo y cantidad de exudados está determinado por la especie de planta (Cieslinski *et al.*, 1997), e incluso se presentan diferencias entre genotipos de una misma especie (Hoekenga *et al.*, 2003). Asimismo, la edad y estado fenológico de la planta influyen también en el perfil de exudados radiculares. Se ha calculado que en plántulas jóvenes la rizodeposición puede llegar a representar entre el 30-40% del total del carbono fijado por fotosíntesis (Badri y Vivanco, 2009), y sigue aumentando gradualmente hasta la floración para luego decrecer en la madurez (Aulakh *et al.*, 2001).

La deficiencia de nutrientes incrementa la exudación de ciertos metabolitos, especialmente de aquellos capaces de movilizarlos desde las formas químicas poco solubles presentes en el suelo. Es, por ejemplo, el caso de la deficiencia de fósforo, a la que la planta responde incrementando la extrusión de protones para acidificar la rizosfera, de carboxilatos para solubilizar el fósforo por quelación e intercambio de ligandos, y de fosfatasas o fitasas para movilizarlo mediante hidrólisis enzimática

Tabla 1.1. Compuestos orgánicos y enzimas liberados por las plantas en los exudados radiculares y su función en la rizosfera. ^a

Clase de compuestos	Componentes	Funciones
azúcares	arabinosa, desoxirribosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, oligosacáridos, rafinosa, ramnosa, ribosa, sacarosa, xilosa, manitol, polisacáridos complejos.	Lubricación, protección de la planta contra toxinas; quimioatrayentes, estimulación del crecimiento microbiano.
Aminoácidos y amidas	los 20 aminoácidos proteinogénicos, ácido γ -aminobutírico, cistationina, cistina, homoserina, ácido mugénico, ornitina, fitosideróforos, betaína, estaquidrina.	Inhibición de los nematodos y el crecimiento de las raíces; estimulación del crecimiento microbiano, quimioatrayentes, osmoprotectores, secuestrantes de hierro.
Ácidos alifáticos	acético, acetónico, aconítico, aldónico, butírico, cítrico, eritrónico, fórmico, fumárico, glucónico, glutárico, glicólico, isocítrico, láctico, maléico, málico, malónico, oxálico, oxalacético, oxaloglutárico, piscídico, propiónico, pirúvico, siquímico, succínico, tartárico, tetrónico, valérico.	Regulación del crecimiento vegetal; quimioatrayentes; estimulación del crecimiento microbiano.
Ácidos aromáticos	<i>p</i> -hidroxibenzóico, cafeico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, gálico, gentísico, protocatéquico, sinápico, ácido siríngico.	Regulación del crecimiento vegetal; quimioatrayentes.
Fenoles	flavonoides, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonoides, acetosiringona.	Regulación del crecimiento vegetal, interacciones alelopáticas; defensa de la planta; fitoalexinas; quimioatrayentes; inicio de las interacciones simbióticas leguminosa-rizobio, micorrícica y actinorrícica; estimulación del crecimiento microbiano; estimulación de la degradación xenobiótica bacteriana.
Ácidos grasos	linoleico, linolénico, oleico, ácido palmítico, ácido esteárico.	Regulación del crecimiento vegetal.
Vitaminas	ácido <i>p</i> -aminobenzoico, biotina, colina, ácido <i>n</i> -metionilnicotínico, niacina, pantotenato, piridoxina, riboflavina, tiamina.	Estimulación del crecimiento microbiano.
Esteroles	Campesterol, colesterol, sitosterol, estigmasterol.	Regulación del crecimiento vegetal.
Enzimas y proteínas	amilasas, invertasas, fosfatasas, poligalacturonasas, proteasas, hidrolasas, lectinas.	Defensa de la planta, degradación de factores Nod.
Hormonas	auxinas, etileno y su precursor 1-aminociclopropano-1- carboxílico (ACC), putrescina, jasmonato, ácido salicílico.	Regulación del crecimiento vegetal.
Otros	Compuestos no identificados miméticos de las acil-homoserina lactonas, saponina, escopoletina, especies reactivas del oxígeno, nucleótidos, calistegina, trigonelina, xantonas, estrigolactonas.	<i>Quorum quenching</i> , regulación del crecimiento vegetal; defensa de plantas; adhesión microbiana; estimulación del crecimiento microbiano; inicio de las interacciones micorrícicas.

^a Adaptada de Faure *et al.* (2009)

(Shen *et al.*, 2011). En sentido opuesto, una elevada concentración en el suelo de determinados elementos puede modificar la exudación radicular hacia el aumento de compuestos con capacidad para inmovilizarlos en la rizosfera y evitar su entrada en la planta, como sucede con la alta secreción de ácidos orgánicos que se produce para quelar el aluminio cuando éste alcanza concentraciones tóxicas en el suelo (Roberts, 2006; Ryan *et al.*, 2001). La presencia en la rizosfera de moléculas elicitoras de los mecanismos de defensa, como el ácido salicílico, el metil-jasmonato o el óxido nitroso, pueden alterar también la cantidad y perfil de exudados de la planta (Badri *et al.*, 2008).

Las interacciones, sean positivas (facilitación) o negativas (alelopáticas), que se producen entre las plantas que cohabitan en un mismo suelo están mediadas en gran medida por los exudados radiculares (Bais *et al.*, 2006). Un ejemplo de interacción positiva es la observada entre especies hiperacumuladoras y no hiperacumuladoras de selenio, que cuando crecen en vecindad en un suelo con exceso de este elemento ambas resultan beneficiadas en su desarrollo. Ello se debe a que los exudados radiculares de la especie hiperacumuladora inmovilizan el selenio en formas orgánicas no tóxicas para la especie no hiperacumuladora; y, a su vez, los exudados radiculares de la segunda facilitan la toma de selenio por la especie hiperacumuladora (El Mehdawi *et al.*, 2012). Como ejemplo de interacción negativa mediada por los exudados radiculares se podría citar a las momilactonas producidas por el arroz, que son compuestos diterpenoides con un efecto alelopático sobre la especie arvense *Echinochloa crus-galli* (Xu *et al.*, 2012).

1.1.2. INFLUENCIA DE LA PLANTA SOBRE LA MICROBIOTA RIZOSFÉRICA.

El primer indicio irrefutable del importante papel que los exudados radiculares tienen en la determinación de la estructura de la comunidad bacteriana rizosférica se consiguió con dos líneas transgénicas de *Lotus corniculatus*, modificadas para producir dos opinas diferentes: manopina y cucumopina (Oger *et al.*, 1997). En ese estudio se observó cómo en la rizosfera de cada línea transgénica aumentaban, en términos de abundancia relativa, exclusivamente aquellas bacterias capaces de metabolizar la opina concreta que producía la planta, permaneciendo inalterados el

resto de los grupos bacterianos. A lo largo de los años se venían acumulando evidencias que indicaban que la estructura y composición de la rizobiota microbiana era particular de cada especie de planta, pero éstas procedían fundamentalmente de estudios basados en el aislamiento de microorganismos. La primera demostración del hecho con técnicas independientes de cultivo se logró en un estudio con plantas de fresa, colza y patata, cultivadas en un mismo suelo y en condiciones de campo (Smalla *et al.*, 2001). En él se observó que los perfiles de DGGE del suelo rizosférico diferían entre los tres cultivos en cuanto a la intensidad y presencia de bandas, existiendo bandas comunes y otras exclusivas de cada planta. Así, por ejemplo, en la fresa se detectó una banda correspondiente a bacterias del género *Nocardia* que no aparecía en el suelo rizosférico de la colza o de la patata.

Mediante los exudados radiculares, principalmente, cada especie de planta determina la dimensión y composición de su microbiota rizosférica. Los exudados radiculares son fuente de carbono y energía para los microorganismos y, además, pueden ejercer sobre ellos efectos estimuladores o inhibidores del crecimiento, efectos quimiotácticos, modular la expresión génica e, incluso, interferir en los fenómenos de *quorum sensing* (Faure *et al.*, 2009). Mientras que cierto tipo de exudados radiculares son nutrientes o quimioatrayentes para la generalidad de los microorganismos, otros sólo lo son para grupos muy concretos, confiriéndoles a estos una ventaja selectiva para colonizar la rizosfera de aquellas plantas que los producen (Savka *et al.*, 2002). Es más, debido a que los genotipos de una misma especie de planta pueden presentar diferencias en el perfil de exudados radiculares, la estructura de su comunidad microbiana rizosférica puede ser también diferente (Berg y Smalla, 2009; Gschwendtner *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011).

En sentido opuesto, la planta puede impedir el crecimiento o actividad de poblaciones específicas de microorganismos mediante exudados radiculares con actividad antimicrobiana. Estos pueden ser de muy diversos tipos, e incluyen especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, ácidos orgánicos, terpenoides, flavonoides e isoflavonoides, entre otros (Bais *et al.*, 2006). Otro grupo de exudados radiculares por los que la planta actúa sobre la microbiota rizosférica son los inhibidores del *quorum sensing*, que bien son miméticos de las moléculas que median ese proceso en las bacterias o son enzimas con capacidad para inactivarlas.

Las leguminosas, por ejemplo, pueden degradar N-acil-homoserina lactonas (AHL) mediante la excreción de lactonasas o AHL-hidrolasas (d'Angelo-Picard *et al.*, 2005; Delalande *et al.*, 2005). En otros casos, como el de *Arabidopsis thaliana*, la propia planta es capaz de absorber las moléculas inductoras del *quorum sensing*, modificando así su concentración en la rizosfera y, por tanto, su efectividad (von Rad *et al.*, 2008).

Pero no sólo la planta influye en la composición de su microbiota rizosférica mediante los exudados radiculares, sino que existen también mecanismos de retroalimentación en virtud de los cuales determinados microorganismos pueden ejercer una notable influencia sobre la rizodeposición. Así quedó demostrado cuando plantas de *Medicago sativa* y *Arabidopsis thaliana* fueron inoculadas con las cepas bacterias *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 (simbionte de la primera) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (patógeno de la segunda). De acuerdo a la identidad de los participantes en la interacción, el tipo de exudados podía resultar modificado. En este sentido, la interacción de *M. sativa* con *S. meliloti* y de *A. thaliana* con *P. syringae* hizo variar, respecto a las plantas control sin inocular, el tipo de proteínas secretadas por la raíz. Sin embargo, la combinaciones alternativas de planta y bacteria no tuvieron tal efecto (De la Pena *et al.*, 2008).

Por otro lado, en las especies microbianas se observan diferentes rangos en cuanto a su capacidad para colonizar la rizosfera (Hartmann *et al.*, 2009). Como ejemplos dispares se pueden citar, por una parte, a la bacterias del género *Pseudomonas* y los hongos del género *Trichoderma*, que aparecen en la rizosfera de virtualmente todas las especies de plantas; mientras que en el otro extremo se encuentra la especie bacteriana *Stenotrophomonas maltophilia*, fundamentalmente asociada a la rizosfera de las crucíferas por secretar éstas altas cantidades del aminoácido metionina, requerido por esta bacteria para su crecimiento.

En resumen, los exudados radiculares determinan la dimensión y estructura de la microbiota rizosférica porque tienen efectos selectivos, promotores o inhibidores, sobre los diferentes microorganismos presentes en el suelo (Hartmann *et al.*, 2009) (Figura 1.1.); y dicha estructura es específica de cada especie de planta porque la cantidad y tipo de exudados liberados están bajo su control genético (Ryan *et al.*,

2009). No obstante, el tipo de suelo es otro factor determinante en la composición de la microbiota rizosférica (Fierer y Jackson, 2006; Tamames *et al.*, 2010), ya que sus características físico-químicas pueden afectar a las comunidades bacterianas directamente por ser favorables o desfavorables para determinados microorganismos; o indirectamente, mediante su influencia sobre la rizodeposición de la planta (Garbeva *et al.*, 2004; Hinsinger *et al.*, 2009).

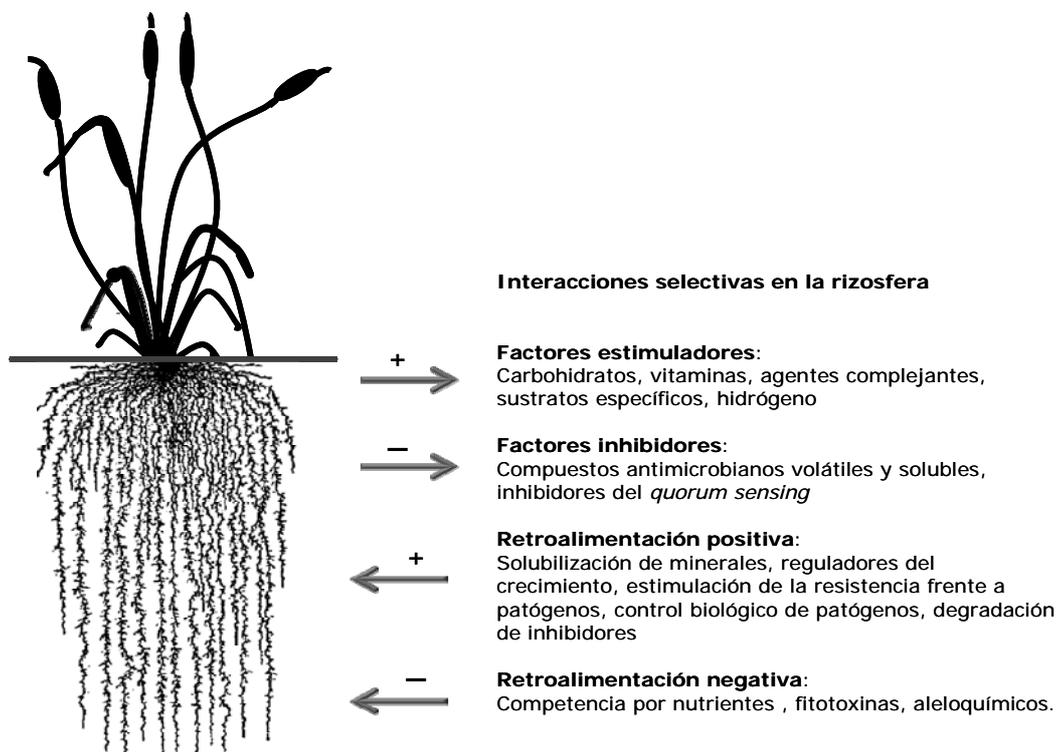


Figura 1.1. Factores estimuladores e inhibidores de las comunidades microbianas rizosféricas producidos por la planta, y fenómenos de retroalimentación entre los microorganismos y la planta (adaptado de Hartmann *et al.*, 2009).

1.1.3. GRUPOS PRINCIPALES DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS.

La práctica totalidad de los grupos generales de microorganismos están representados en la rizosfera, incluyendo bacterias, arqueas, virus y hongos (Buee *et al.*, 2009). Muchos de ellos pertenecen a taxones bien conocidos y definidos, pero gracias al avance de las técnicas metagenómicas y su creciente empleo en los estudios de ecología microbiana, día a día se descubren microorganismos rizosféricos

nunca antes descritos, especialmente bacterias (da Rocha *et al.*, 2009; Kielak *et al.*, 2009).

1.1.3.1. Bacterias.

La abundancia de bacterias cultivables en la rizosfera es entre uno y dos órdenes de magnitud superior a la que se encuentra en suelo no rizosférico (Buee *et al.*, 2009). Los estudios basados en el aislamiento de bacterias revelaban como grupos más abundantes a las Proteobacterias, Actinobacterias y Firmicutes, pudiendo alcanzar algunas cepas densidades de hasta 10^7 UFC por gramo de suelo (Nijhuis *et al.*, 1993). Con la aplicación de las técnicas independientes de cultivo se ha podido profundizar mucho más en la estructura taxonómica de las poblaciones bacterianas rizosféricas. Los análisis en muy diversas especies de plantas siguen señalando a las Proteobacterias y Actinobacterias como los grupos preponderantes (p. ej.: (Green *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007). Sin embargo, en determinadas plantas, otras bacterias pueden estar en altas densidades, como las Acidobacterias (Lee *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2007), las bacterias del grupo Verrucomicrobia (Lee *et al.*, 2008; Stafford *et al.*, 2005) y las del grupo *Cytophaga* (Chow *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008).

Las bacterias rizosférica pueden resultar en sus acciones neutras o, como en el caso de las fitopatógenas, deletéreas para la planta. Pero en su gran mayoría ejercen efectos positivos, mejorando el crecimiento de la planta o la fertilidad y estructura del suelo. Las bacterias con efectos positivos para la planta se encuadran globalmente en las denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés). Entre ellas, las hay que permanecen habitualmente asociadas a la superficie de la raíz; otras que son endofitas, ya que penetran en los tejidos de la planta pero quedan en los espacios intercelulares; y, por último, aquellas que penetran en las células y forman con la planta órganos especializados, como los rizobios y *Frankia*, que forman nódulos fijadores de nitrógeno con las leguminosas y las plantas actinorrícicas, respectivamente (Franche *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2008). El beneficio para la planta puede llegar a través de diversas vías, bien mediante la producción o degradación de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (fitohormonas), mediante la solubilización y fijación de nutrientes; o por ejercer efectos protectores contra los patógenos vegetales, sean estos debidos a la inducción

de los mecanismos de resistencia sistémica en la planta, por exclusión competitiva o por antibiosis (Spaepen *et al.*, 2009).

Ciertas rizobacterias pueden interactuar con el crecimiento y fisiología de la planta degradando o produciendo moléculas reguladoras del crecimiento, y algunas son capaces de producir más de un tipo de ellas (Boiero *et al.*, 2007; Karadeniz *et al.*, 2006). Como ejemplo, se puede citar a la auxina ácido indol-3-acético (AIA), sintetizada por aproximadamente el 80% de las rizobacterias (Khalid *et al.*, 2004), que juega un papel clave en la conformación de la arquitectura radicular al estar involucrado en el desarrollo de las raíces secundarias, en la diferenciación del tejido vascular y en el gravitropismo de la raíz (Aloni *et al.*, 2006; Fukaki *et al.*, 2007). Otras rizobacterias, especialmente las pertenecientes a la clase *Proteobacteria*, poseen actividad 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) oxidasa que cataliza la conversión del ácido ACC, precursor de la biosíntesis del etileno, en NH₃ y α -cetobutirato. El etileno lo produce la planta en condiciones de estrés, y tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular (Spaepen *et al.*, 2009). Mediante dicha actividad enzimática las bacterias logran disminuir la cantidad de etileno sintetizado por la planta al degradar al precursor y, en consecuencia, se produce un mayor desarrollo de la raíz (Glick *et al.*, 2007). Tanto con la producción de AIA como con la actividad ACC oxidasa, las bacterias rizosféricas logran que la planta tenga una mayor densidad radicular y, por tanto, una mayor capacidad de absorción de agua y nutrientes. Con ello facilitan la resistencia de la planta a ciertos tipos de estrés ambiental, como puede ser la sequía (Yang *et al.*, 2009).

Un gran número de rizobacterias mejoran la nutrición de la planta poniendo a su disposición una mayor cantidad de nutrientes; entre ellos, nitrógeno y fósforo, pero también otros no menos relevantes para el crecimiento vegetal, como puede ser el hierro. Existe una gran diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno con capacidad para interactuar con la planta. Entre ellas son sobradamente conocidas los rizobios y *Frankia*, formadoras de simbiosis nodulares con las leguminosas y las plantas actinorrícicas (Igual *et al.*, 2006; Rivas *et al.*, 2011; Valverde y Igual, 2011; Velázquez *et al.*, 2006), y las cianobacterias, que se encuentran dentro de órganos especializados asociadas a muchas plantas fanerógamas y criptógamas, a hongos y a algas (Meeks y Elhai, 2002). Estas asociaciones son el elemento clave del ciclo del

nitrógeno en los ecosistemas terrestres, y pueden tener gran relevancia agronómica y ecológica sustituyendo o complementando la aplicación de fertilizantes químicos (Mulas *et al.*, 2011). Pero otras muchas bacterias fijadoras de nitrógeno pueden colonizar la rizosfera de la planta (*Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Bacillus* spp., etc.) o vivir en ella como endofitos (*Azoarcus* spp., *Burkholderia* spp., *Herbaspirillum* spp., *Gluconacetobacter* spp., etc.) (Franche *et al.*, 2009). La cantidad de nitrógeno fijado que la planta recibe mediante estos últimos tipos de asociación es considerablemente menor que con las primeras pero, no obstante, en determinados casos puede suponer una destacable contribución para su desarrollo (Hurek *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2008; Sevilla *et al.*, 2001).

En condiciones de deficiencia de fósforo algunas rizobacterias pueden movilizar el que se encuentra en el suelo en formas insolubles mediante la liberación de fosfatasas y ácidos orgánicos. La capacidad solubilizadora de fósforo es una característica frecuente, llegándose a encontrar hasta en un 40% de las bacterias rizosféricas (Igual *et al.*, 2001; Richardson y Simpson, 2011), y su asociación con la planta puede rendir importantes beneficios para ésta (Peix *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2006). De igual forma, cuando hay una baja disponibilidad de hierro en el entorno ciertas rizobacterias sintetizan sideróforos —moléculas de bajo peso molecular con gran afinidad por el hierro férrico— para extraerlo de los minerales del suelo a los que está ligado. El ejemplo clásico de sideróforo de origen bacteriano es la pioverdina producida por el grupo de las pseudomonas fluorescentes. Se ha demostrado que la planta puede absorber el complejo Fe-pioverdina, mejorando así su nutrición férrica (Vansuyt *et al.*, 2007). Sin embargo, el principal beneficio de estas bacterias para la planta parece deberse más a la exclusión de patógenos que producen en la rizosfera, al sustraerles el hierro disponible mediante quelación con los sideróforos, que a un efecto nutricional directo (Lemanceau *et al.*, 2009).

Sobre la estructura de la comunidad bacteriana rizosférica influye la especie de planta (Grayston *et al.*, 1998; Smalla *et al.*, 2001), e incluso el cultivar (genotipo) de la misma (Andreote *et al.*, 2009; van Overbeek y van Elsas, 2008); pero también otros factores como el estado fenológico de la planta (Herschkovitz *et al.*, 2005; Lerner *et al.*, 2006), el tipo de suelo (Latour *et al.*, 1996; Marschner *et al.*, 2004;

Seldin *et al.*, 1998) y la estacionalidad (Dunfield y Germida, 2003; van Overbeek y van Elsas, 2008).

1.1.3.2. Hongos.

La rizosfera es el nicho ecológico preferencial para los hongos del suelo, que viven en ella como saprofitos o están íntimamente asociados a la planta como simbiontes micorrícicos.

La comunidad de hongos saprofitos está formada tanto por levaduras como por hongos filamentosos, con representantes de los grandes fila y sub-fila terrestres (Ascomycota, Basidiomycota y Mucoromycotina) (Buee *et al.*, 2009). En el suelo rizosférico de determinados ecosistemas, como los dominados por praderas, la biomasa de estos hongos llega a sumar, de media, un 39% de la biomasa microbiana total (Joergensen, 2000). Su función principal reside en la descomposición de los substratos sólidos más recalcitrantes a la degradación, como la celulosa, hemicelulosa y lignina (van der Wal *et al.*, 2007). Sin embargo, determinados hongos tienen otros efectos también positivos para la planta, como la actividad supresora de patógenos y producción de fitohormonas que realiza *Trichoderma* spp. (Vinale *et al.*, 2008). El tipo de suelo por una parte (Gomes *et al.*, 2003), y la especie de planta y su estado fenológico determinan, a través de de los exudados radiculares, la composición de hongos saprofitos de la rizosfera (Broeckling *et al.*, 2008; Broz *et al.*, 2007; Houlden *et al.*, 2008).

Los hongos micorrícicos, formadores de simbiosis mutualistas con las plantas, permiten a estas un mejor desarrollo al aportarles a través de la red micelial nutrientes y agua procedentes de zonas del suelo no exploradas por las raíces (Bonfante y Anca, 2009). Dentro de los hongos micorrizógenos se distinguen los formadores de ectomicorrizas y de endomicorrizas. En las ectomicorrizas, que son las predominantes en las plantas leñosas, las hifas del hongo no penetran en las células vegetales. Sin embargo, en las endomicorrizas el hongo establece simbiosis intracelulares con las células radiculares. Entre estas últimas se encuentran las micorrizas ericoides y las orquidiodes, restringidas respectivamente a plantas del orden Ericales y de la familia Orchidaceae; y las micorrizas arbusculares.

Las endomicorrizas arbusculares, incluidas actualmente en el filum Glomeromycota (Redecker, 2002), establecen simbiosis con el 80% de las especies de plantas terrestres y son las de mayor trascendencia para la producción de los agrosistemas (Gianinazzi *et al.*, 2010). Al contrario que en otras simbiosis, en ésta no existe una clara especificidad entre los simbiosites, situación que queda reflejada en el hecho de que muchas especies de micorrizas arbusculares tiene una distribución global, asociadas a muy distintas especies de plantas y en ecosistemas muy diversos (Opik *et al.*, 2006). Así, el micelio externo de un mismo hongo puede interconectar los sistemas radicales de las distintas plantas que cohabitan un mismo suelo, como también se conectan entre sí distintos micelios fúngicos por anastomosis (Mikkelsen *et al.*, 2008). El resultado es la formación de una vasta red de conexiones de importancia capital para el funcionamiento de los ecosistemas (van der Heijden y Horton, 2009).

Aunque en ciertos casos la interacción entra la planta y el hongo pueda resultar neutra o incluso parasítica (Klironomos, 2003; Smith y Smith, 2011), la generalidad es que el establecimiento de la simbiosis redunde en un notable beneficio para la planta. Las micorrizas arbusculares mejoran principalmente la nutrición fosfórica de la planta, aunque también la nitrogenada; la protegen contra la sequía y otros tipos de estrés abióticos, y también contra patógenos (Gianinazzi *et al.*, 2010; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Richardson *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2011). Asimismo, mejoran la estructura del suelo y la adherencia de la planta a éste (Barea *et al.*, 2002).

Diversos factores afectan a la extensión de la micorrización y la presencia de propágulos en el suelo. La alta disponibilidad de fósforo, y por tanto la alta fertilización fosfórica, afecta negativamente al establecimiento y funcionamiento de esta simbiosis (Breuillin *et al.*, 2010); pero otras prácticas agrícolas también ejercen efectos adversos, como el arado, que fragmenta la red micelial y reduce la diversidad de micorrizas arbusculares, o el cultivo de especies vegetales con efectos alelopáticos para los hongos micorrizógenos (Gianinazzi *et al.*, 2010).

1.1.3.3. Arqueas.

Diferentes estudios han demostrado que las arqueas son habitantes comunes de la rizosfera, aunque generalmente con una preponderancia baja (Buee *et al.*, 2009). Al

contrario que en bacterias, la estructura taxonómica de la comunidad de arqueas en la rizosfera no parece estar relacionada con la especie de planta (Sliwinski y Goodman, 2004). En ambientes anoxigénicos pueden llegar a ser muy abundantes, como sucede en la rizosfera del arroz y ciertos macrófitos, donde intervienen activamente en los procesos de producción de metano y nitrificación (Chen *et al.*, 2008b; Herrmann *et al.*, 2008).

1.1.3.4. Virus.

En términos generales, el estudio de la virología de la rizosfera está en sus etapas iniciales (Swanson *et al.*, 2009), aunque se ha demostrado que la presencia en los suelos de virus bacteriófagos puede llegar a ser notablemente alta (Nakayama *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2005).

Los virus bacteriófagos son, potencialmente, de gran importancia para la ecología y evolución de la microbiota bacteriana rizosférica, dada su capacidad para transferir genes entre sus hospedadores y a la mortandad que causan en las bacterias (Swanson *et al.*, 2009). A través de estas acciones el componente vegetal del ecosistema puede resultar finalmente afectado al modular los bacteriófagos las poblaciones y actividad de las bacterias PGPR, de las fitopatógenas, y de aquellas otras que participan en el reciclado de nutrientes (Kimura *et al.*, 2008; Ronning *et al.*, 2010). Lógicamente, su presencia en la rizosfera está asociada al hospedador bacteriano adecuado, como lo demuestra el hecho de que en campos de leguminosas la incidencia de fagos de rizobios es mayor que en los suelos de otros cultivos (Sharma *et al.*, 2005).

1.2. LA FERTILIZACIÓN FOSFÓRICA.

1.2.1. EL FÓSFORO EN EL SUELO.

El fósforo ocupa el décimo primer lugar entre los elementos más abundantes de la corteza terrestre. En el suelo se encuentra como fósforo inorgánico o formando parte de la materia orgánica, como fósforo orgánico. El fósforo inorgánico está contenido en los minerales derivados de la roca madre, fundamentalmente en apatitas, estrengita y variscita, que son muy estable en cuanto a su solubilidad; y en minerales secundarios de fósforo que incluyen fosfatos de calcio, hierro y aluminio, cuyas tasas

de disolución varían en función del pH y el tamaño de las partículas (Oelkers y Valsami-Jones, 2008). Por su parte, el fósforo orgánico se encuentra en formas estabilizadas como inositol fosfatos y fosfonatos; y en formas activas como monoesteres y diésteres de ortofosfato, y polifosfatos orgánicos (Condrón *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2002). Las plantas absorben el fósforo en forma de ión ortofosfato, bien como H_2PO_4^- o de HPO_4^{2-} (Marschner, 1995).

En términos generales, el fósforo inorgánico representa entre el 35% y 70% del total de fósforo presente en el suelo, y el orgánico entre el 30% y el 65% ((Shen *et al.*, 2011). Sin embargo, a medida que evoluciona el suelo el contenido de fósforo orgánico aumenta a expensas del inorgánico, según lo observado en cronosecuencias de suelos (Richardson *et al.*, 2004). En los suelos más evolucionados, alrededor del 80% del fósforo total estaría en forma orgánica (Schachtman *et al.*, 1998); y, de éste, el contenido en la biomasa microbiana puede suponer desde el 1% hasta más del 10%, siendo ésta una reserva importante por su alta tasa de renovación y evitar que se fije en formas minerales poco soluble (Richardson, 2001; Seeling y Zasoski, 1993).

No obstante, el ión fosfato, al contrario que el nitrato, es poco móvil y está en baja concentración en la solución del suelo debido a las fuertes y múltiples interacciones que establece con los constituyentes del mismo, que comprenden la adsorción por los minerales del suelo (óxidos metálicos y arcillas), la precipitación en minerales de tipo apatita, y la inmovilización en la materia orgánica y como fitato (Hinsinger, 2001). Por ello, la concentración de fósforo disponible en la solución del suelo generalmente está por debajo de 10 μM , que es muy inferior a la que se encuentra en los tejidos vegetales (Shen *et al.*, 2011). Así, en los primeros estados de la formación del suelo, los ecosistemas terrestres carecen principalmente de nitrógeno, mientras que en los suelos evolucionados es el fósforo el elemento limitante (Vitousek y Farrington, 1997).

1.2.2. ADQUISICIÓN DE FÓSFORO POR LA PLANTA.

El fósforo es un elemento químico esencial para la vida por, entre otras razones, formar parte de los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos de membrana, por estar involucrado en el transporte y almacenamiento de energía en la célula en forma de

ATP, y por intervenir en las reacciones de fosforilación-defosforilación que regulan el metabolismo celular (Marschner, 1995).

Sólo una pequeña fracción del fósforo presente en el suelo es soluble en agua y, por tanto, está en forma asimilable por las plantas. El fósforo disuelto en la solución del suelo tiene que ser renovado permanentemente desde fases o fracciones químicas de desigual solubilidad. Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos bioquímicos y fisiológicos para hacer frente a la escasez de fósforo disponible en el suelo, bien para forzar su solubilización o para mejorar su absorción (Vance *et al.*, 2003). Por su parte, los microorganismos rizosféricos son parte integral de ciclo del fósforo en el suelo y con su actividad colaboran eficientemente en la nutrición fosfórica de las plantas (Figura 1.2.).

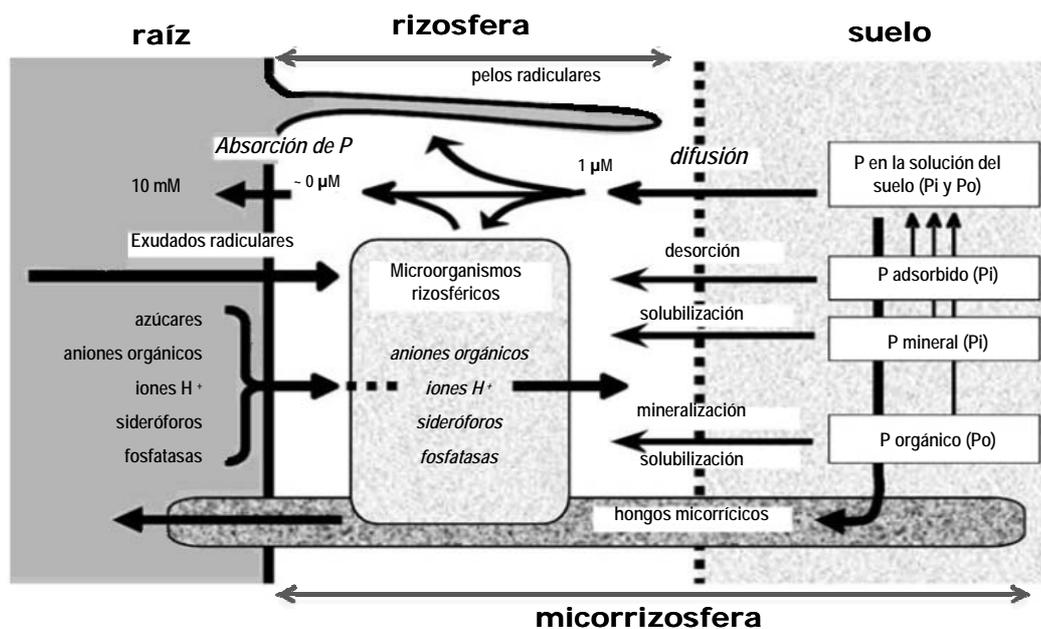


Figura 1.2. Procesos fisiológicos y químicos que influyen en la disponibilidad y transformación del fósforo en la rizosfera. *Pi*, fósforo inorgánico; *Po*, fósforo orgánico (adaptado de Richardson *et al.*, 2009).

Para aumentar su eficiencia en la adquisición del fósforo la planta puede modificar la arquitectura radicular, mediante cambios tanto en la morfología como en la topología y en los patrones de distribución de las raíces, con el fin de explorar un

mayor volumen de suelo (Caradus, 1981 ; Föhse *et al.*, 1988; Lynch, 2011). Pero también puede excretar ácidos orgánicos que solubilizan algunas formas del fósforo, bien directamente o indirectamente al producir cambios en el pH del suelo (Gerke y Meyer, 1995; Imas *et al.*, 1997); o excretar fosfatasas, que ayudan a la mineralización de este elemento desde la materia orgánica (Plaxton y Tran, 2011; Tarafdar y Claassen, 1988). Asimismo, ciertas especies o genotipos de plantas han desarrollado transportadores con alta afinidad por el fosfato, para capturarlo eficientemente a las bajas concentraciones en las que está en la solución del suelo (Shen *et al.*, 2011). Estos mecanismos están bajo el control genético de la planta (Hammond *et al.*, 2004) y son, por tanto, susceptibles de mejora mediante cruzamiento o manipulación biotecnológica, como se ha realizado en el trigo (Manske *et al.*, 2002)

Por su parte, los microorganismos rizosféricos incrementan la capacidad de la planta para adquirir el fósforo del suelo mediante diferentes mecanismos. Aparte del trascendental papel de los hongos micorrícicos, que proporcionan fósforo desde lugares del suelo no accesibles para las raíces (Smith y Read, 1997; Smith y Smith, 2011), muchas rizobacterias pueden incrementar el crecimiento de la raíz y el desarrollo de los pelos radiculares mediante efectos hormonales, bien produciendo fitohormonas o alterando el balance hormonal de la planta, con lo que aumentan en ésta la capacidad de exploración y su superficie de absorción (Hayat *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2009). Las rizobacterias excretan protones, ácidos orgánicos de bajo peso molecular y sideróforos, que solubilizan las formas precipitadas de fósforo inorgánico mediante, respectivamente, acidificación, reacciones de intercambio de ligandos, o de quelación de iones metálicos, como el hierro, que están comúnmente asociados en el suelo con complejos de fósforo. Así como también producen fosfatasas y fitasas, que mineralizan el fósforo contenido en la materia orgánica haciéndolo disponible para la planta (Richardson y Simpson, 2011; Ryan *et al.*, 2001; Tarafdar y Claassen, 1988; Whitelaw *et al.*, 1999).

1.2.3. EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y PERSPECTIVAS DE LOS FERTILIZANTES FOSFÓRICOS.

1.2.3.1. El agotamiento de las reservas de fosfato de roca.

La escasez de fósforo asimilable es un serio problema que afecta a la producción agrícola a nivel mundial, por lo que es, tras el nitrógeno, el segundo entre los macronutrientes más aplicados con el abonado químico (Igual y Rodríguez-Barrueco, 2007).

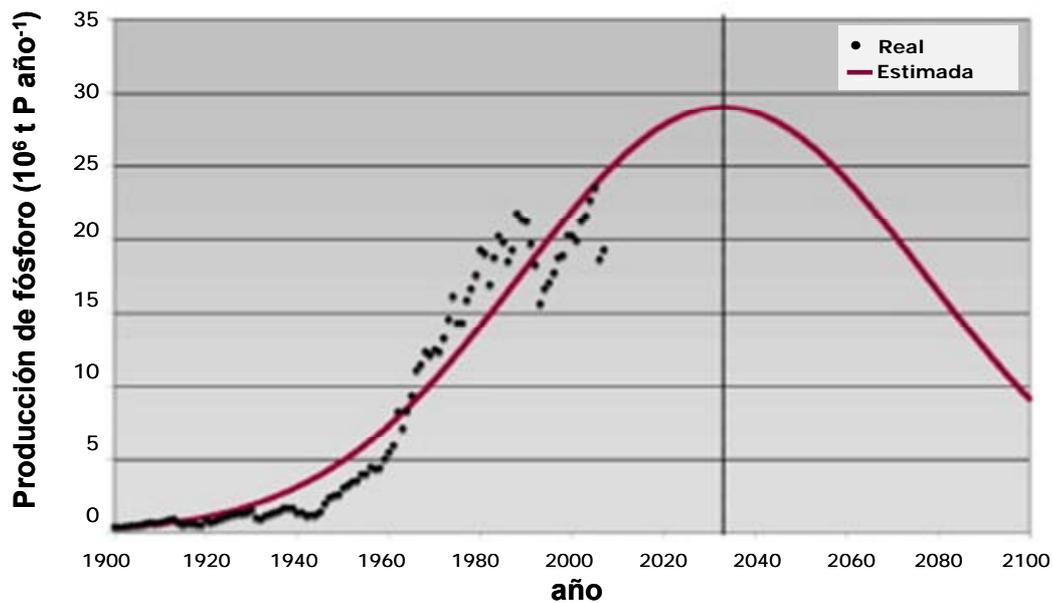


Figura 1.3. Gráfico mostrando la producción mundial de fertilizantes fosfóricos entre los años 1900 y 2007, y la estimación de la misma hasta el año 2100. La línea vertical indica la producción máxima estimada (adaptado de Cordell *et al.*, 2009).

La producción agrícola se ha sustentado históricamente sobre los niveles naturales que poseía el suelo más el añadido mediante el estercolado. Para mantener la producción de alimentos al nivel requerido por la explosión demográfica ocurrida durante los siglos XIX y XX, la agricultura comenzó a utilizar otras fuentes de fósforo, como el guano y el fosfato de roca (Igual y Rodríguez-Barrueco, 2007). El guano, procedente de la costa del Perú e islas del Pacífico Sur, era un recurso limitado cuyo abastecimiento declinó a finales del siglo XIX. El fosfato de roca quedó entonces como la principal fuente de fósforo para la agricultura, aumentando paulatinamente su empleo durante el siglo XX, y ya de forma muy acusada desde los

años cincuenta (Cordell *et al.*, 2009) (Figura 1.3.). Aunque el propio fosfato de roca puede ser aplicado directamente al suelo como abono, la industria moderna de fertilizantes lo procesa a formas químicas más concentradas, como el superfosfato, y lo combina con otros nutrientes, como nitrógeno y potasio, para obtener los habituales abonos minerales complejos.

Los principales yacimientos de fosfato de roca se encuentran en Marruecos, los EE. UU., China y Rusia, que en conjunto controlan el 70% de los depósitos mundiales de fosfato (Gilbert, 2009). En otros países existen yacimientos importantes, pero está en duda que su explotación sea económicamente viable al precio actual de los fertilizantes, por ser de inferior pureza química y/o de difícil extracción. Debido al carácter estratégico del fosfato de roca, China ha impuesto barreras arancelarias a su exportación. Por su parte, los yacimientos del Sahara Occidental ocupados por Marruecos están en un área geopolíticamente sensible y, aunque este fosfato de roca se exporta *de facto*, su comercio no cuenta con el apoyo legal internacional. En el caso de los EE. UU., han pasado de ser un país netamente exportador a importador, para proteger unas reservas que podrían agotarse en relativamente pocos años (Cordell *et al.*, 2009).

En todo caso, las reservas de fosfato de roca son finitas y están controladas por un limitado número de países. A ello hay que añadir una creciente demanda de países en vías de desarrollo, como China e India, donde la mejor situación económica está cambiando los hábitos alimenticios de la población hacia un mayor consumo de 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 industria de los biocombustibles compiten ahora por el fósforo antes destinado a la producción de alimentos. Este conjunto de causas ha 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 (Cordell *et al.*, 2009; Gilbert, 2009).

1.2.3.2. Riesgos ambientales de los fertilizantes fosfóricos.

La fertilización fosfórica rinde evidentes beneficios económicos para la agricultura, pero no está exenta de efectos negativos para el medio ambiente. El

desarrollo económico producido tras la Segunda Guerra Mundial y el bajo precio de los fertilizantes llevó en los países desarrollados a una aplicación de fósforo que excedía claramente las necesidades de los cultivos (Delgado y Scalenghe, 2008). La sobrefertilización fosfórica se convirtió en un serio problema medioambiental debido a la eutrofización de las aguas superficiales (Kleinman *et al.*, 2011). Ciertos cálculos indican que, en Europa, el 40% del fósforo que contienen las aguas continentales procede de estos fertilizantes (Igual y Rodríguez-Barrueco, 2007). Es más, el exceso de fósforo en los ecosistemas terrestres se ha relacionado con una pérdida de diversidad del componente vegetal más acusada que la que podría producirse por exceso de nitrógeno (Wassen *et al.*, 2005).

La materia prima de los fertilizantes fosfóricos, el fosfato de roca, contiene varios metales pesados entre sus constituyentes menores, cadmio entre ellos (Mortvedt, 1996). La propia producción de ácido fosfórico, eslabón inicial en el proceso de fabricación de los fertilizantes, emite fluoruros; y como producto colateral se forma fosfoyeso, que concentra los metales pesados y elementos radioactivos —U, Th y ^{226}Ra , principalmente— presentes de forma natural en el fosfato de roca (Martínez-Aguirre *et al.*, 1994; Scholten y Timmermans, 1996). Si no son adecuadamente tratados, la liberación de estos subproductos causa graves alteraciones en el medioambiente.

Las aplicación excesiva de nitrógeno y de fósforo altera los ciclos biogeoquímicos de esos elementos, causando esta práctica un fuerte impacto negativo sobre los ecosistemas (Hinsinger *et al.*, 2011; Rockstrom *et al.*, 2009). La sobrefertilización modifica la estructura y función de la comunidad microbiana (Beauregard *et al.*, 2010; Marschner *et al.*, 2006) y las propiedades físico-químicas del suelo (Acton y Gregorich, 1995), influyendo a largo plazo en la calidad del suelo y el flujo de nutrientes (Cruz *et al.*, 2009).

Durante los últimos cincuenta años, el empleo de fertilizantes nitrogenados y fosfóricos ha crecido de forma comparativamente mayor que la cantidad producida de alimentos (Figura 1.4.), lo que implica un uso ineficiente de estos fertilizantes (Vitousek *et al.*, 2009). Las previsiones para las próximas décadas indican que será necesario incrementar la fertilización para satisfacer la demanda global de alimentos

(Tilman *et al.*, 2001a; Vance *et al.*, 2003), lo que agravará los problemas medioambientales derivados de la producción de fertilizantes químicos y de su excesiva aplicación a los agroecosistemas. Por tanto, aunque resulte perentorio intensificar la producción agrícola para satisfacer las necesidades alimentarias de una población mundial en continuo crecimiento, debe evitarse que sea a expensas de una mayor fertilización química.

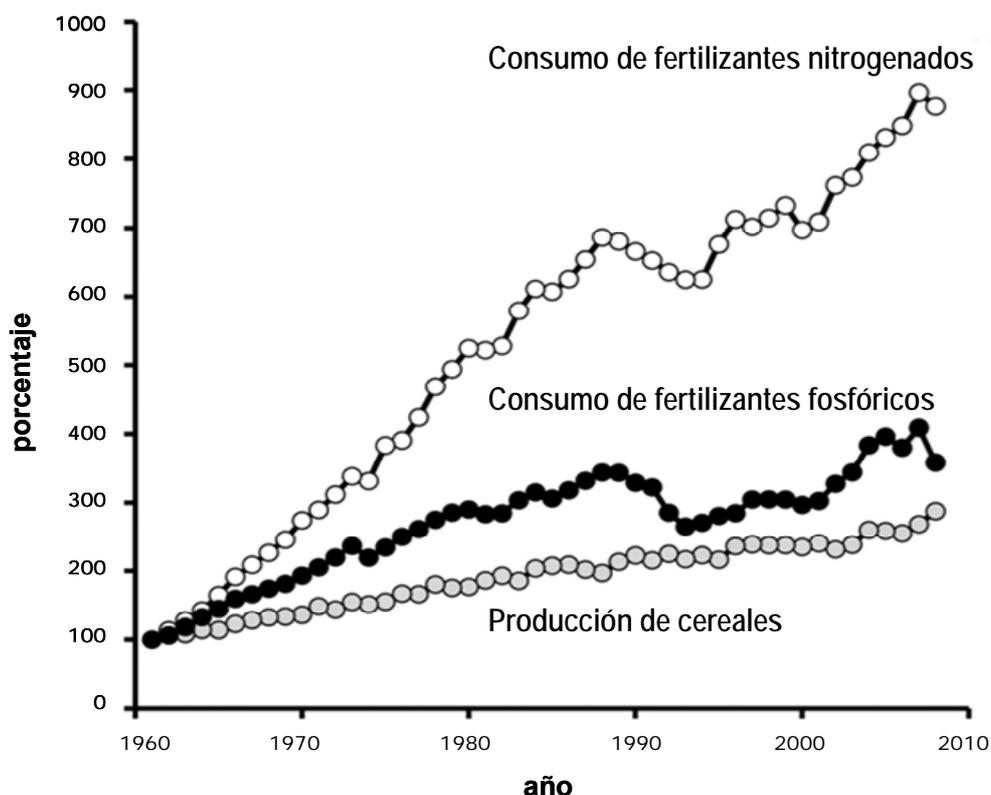


Figura 1.4. Aumento porcentual de la producción mundial de cereales y del consumo de fertilizantes nitrogenados y fosfóricos en el período 1961-2008. Los valores absolutos en el año 1961 fueron: 876,9 Tg de cereales, 11,6 Tg de nitrógeno y 4,8 Tg de fósforo (adaptado de Hinsinger *et al.*, 2011).

1.2.3.3. Aprovechamiento del fósforo y diversidad vegetal.

Los medios para alcanzar una intensificación ecológica de los agrosistemas (Cassman, 1999) pueden estar en la obtención de genotipos de plantas con una mayor eficiencia en el uso del fósforo (Lynch, 2007; Vance *et al.*, 2003) y en una mejor utilización de la diversidad vegetal buscando el *efecto de sobreproducción* (Tilman, 1999). El efecto de sobreproducción viene explicado por dos procesos que resultan en un mejor uso de los recursos: *complementariedad de nicho* y *facilitación* (Fridley, 2001; Loreau y Hector, 2001). La complementariedad de nicho puede definirse como la disminución del grado de competencia interespecífica y exclusión competitiva que se logra cuando las especies hacen un uso diferencial de los recursos. Así, dos o más especies pueden usar un mismo recurso en diferente tiempo, espacio o forma (Fridley, 2001). La facilitación ocurre cuando una especie incrementa el crecimiento o supervivencia de otra(s) porque mejora las condiciones abióticas y/o bióticas del medio para la segunda (Callaway, 1995; Loreau, 2000). Un ejemplo de facilitación es la realizada por las plantas que establecen simbiosis fijadoras de nitrógeno, que aumentan la disponibilidad de este nutriente para las especies vecinas. Estas interacciones positivas son de especial valor cuando los recursos están limitados, como ocurre en suelos pocos fértiles y en los agroecosistemas con bajos insumos.

En ecología, la hipótesis del gradiente de estrés propone que las interacciones positivas (facilitación) aumentarán en importancia e intensidad cuanto más acusado sea el estrés ambiental (Brooker *et al.*, 2005). Se han realizado numerosos estudios, tanto en ecosistemas naturales como en agroecosistemas, que demuestran los beneficios que la diversidad de especies tiene sobre el uso de los nutrientes, centrados mayoritariamente en las interacciones entre gramíneas y leguminosas respecto al uso del nitrógeno. Comparativamente, los trabajos enfocados a desentrañar estas interacciones en relación al fósforo son muy escasos (Hinsinger *et al.*, 2011). Sin embargo, este campo de investigación ha adquirido un inusitado interés al comprobarse que cultivos mixtos de maíz y haba presentaban un efecto de sobreproducción en un suelo pobre en fósforo —incrementos de la cosecha del 43% para el maíz y del 26% para el haba—, que desaparecía cuando se aplicaba una fertilización intensa con este macronutriente (Li *et al.*, 2007).

Las razones por las que pueden producirse interacciones positivas cuando dos o más especies crecen conjuntamente en condiciones de limitación de fósforo son varias y no excluyentes entre sí. Las leguminosas, por ejemplo, excretan en su rizosfera gran cantidad de protones (Hinsinger *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 1997), carboxilatos (Neumann y Romheld, 1999; Pearse *et al.*, 2006) y fosfatasa (Nuruzzaman *et al.*, 2006) que aumenta la disponibilidad de fósforo para sí mismas y para las especies asociadas. Pero además, como se ha demostrado en cultivos mixtos de gramíneas y leguminosas, la competencia por el nitrato del suelo que ejerce la gramínea hace incrementar la tasa de fijación de nitrógeno a la leguminosa y, con ello, se produce una mayor acidificación de su rizosfera que finalmente revierte en una mayor solubilización del fósforo (Cu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2003). Por la otra parte, las gramíneas excretan grupos hidroxilo que alcalinizan la rizosfera y liberan el fósforo adsorbido a los óxidos de hierro y las arcillas (Devau *et al.*, 2010), mejorando así la nutrición fosfórica de las leguminosas (Betencourt *et al.*, 2012).

Respecto a la estructura de la comunidad microbiana rizosférica, algunos estudios apuntan a una clara distinción entre la asociada a cultivos mixtos y aquellas asociadas a las mismas plantas cuando crecen separadamente (Li *et al.*, 2010a; Song *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007a, 2007b). No obstante, debido a la redundancia funcional de los microorganismos (Zak *et al.*, 1994), un cambio en la estructura de la comunidad microbiana no presupone un cambio sustantivo en las actividades biológicas que desempeña. Así, los cambios en la abundancia de una o más especies microbianas pueden no tener efectos apreciables sobre una función determinada (Miethling *et al.*, 2003). Sin embargo, algunos trabajos han demostrado que las modificaciones generales de la estructura de la comunidad microbiana rizosférica se pueden correlacionar con cambios en ciertas actividades bioquímicas del suelo, como la actividad fosfatasa (Kandeler *et al.*, 2002). La influencia que la planta ejerce en su rizosfera sobre la comunidad microbiana puede traducirse en diferencias en la abundancia de determinados grupos funcionales de microorganismos, como ocurre con los productores de fitasas, que parecen ser más abundantes en la rizosfera de las gramíneas que en la de las leguminosas (Jorquera *et al.*, 2008). En el caso de cultivos mixtos de gramíneas y leguminosas, las últimas podrían aprovecharse del fósforo

orgánico liberado por las fitasas producidas por los microorganismos rizosféricos asociados a las primeras (Hinsinger *et al.*, 2011).

1.3. AGROECOSISTEMAS DE PASTOS

1.3.1. LOS PASTOS COMO SISTEMAS MODELO EN ECOLOGÍA.

Las comunidades de pastos con manejo extensivo se han convertido en un modelo para los estudios ecológicos, y en ellas se ha demostrado que la producción primaria se reduce con la pérdida de diversidad (Hector *et al.*, 1999; Hooper y Dukes, 2004; Hooper *et al.*, 2005; Roscher *et al.*, 2005; Tilman *et al.*, 2001b).

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 y Brady, 1974). Asimismo, en los ecosistemas terrestres las plantas y la biota del suelo tienen un fuerte vínculo como productores y descomponedores. Las plantas proveen de carbono orgánico a la microbiota edáfica y ésta, a su vez, descompone la materia orgánica y mineraliza el nitrógeno, elemento esencial para las primeras (Sugiyama *et al.*, 2008). Dada la influencia de la planta en la composición y estructura de las comunidades microbianas rizosféricas, la diversidad de especies y grupos funcionales del componente vegetal determina la heterogeneidad y diversidad de los grupos descomponedores en la microbiota del suelo (Sugiyama *et al.*, 2008). No obstante, las asociaciones estructurales entre el componente vegetal y la microbiota edáfica aún no son bien conocidas (De Deyn y Van der Putten, 2005; Hooper *et al.*, 2005; Wardle *et al.*, 2004).

Numerosos trabajos demuestran el efecto sinérgico de la mezcla de gramíneas y leguminosas sobre algunas propiedades de los ecosistemas, principalmente aquellas relacionadas con el aprovechamiento del nitrógeno (Fornara y Tilman, 2008; Hector *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2010b). Las interacciones positivas que establecen las leguminosas con el resto de plantas son generalmente más acusadas que las que se puedan establecer entre otros grupos funcionales, debido al nitrógeno que aportan al sistema mediante la fijación simbiótica (Kirwan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007; Mulder

et al., 2002; Nyfeler *et al.*, 2009; Spehn *et al.*, 2002; Temperton *et al.*, 2007). Pero ejercen también otros efectos no relacionados con la fijación simbiótica del nitrógeno, como incrementar la actividad de los microorganismos del suelo implicados en la mineralización del nitrógeno (Spehn *et al.*, 2000); o contribuir, especialmente en el caso de las leguminosas perennes, a la extracción de agua desde capas u horizontes del suelo más profundos gracias a su sistema radical pivotante (Sekiya y Yano, 2002; Skinner *et al.*, 2004).

En general, la coexistencia de gramíneas y leguminosas contribuye al mejor funcionamiento del sistema porque permite la exploración del suelo a diferentes profundidades gracias a la diferente estructura radicular que presentan (Hooper y Vitousek, 1997), y a una mayor productividad por su distinta fenología a lo largo de las estaciones (Luscher *et al.*, 2005), o entre años (Nyfeler *et al.*, 2009; Nyfeler *et al.*, 2011).

1.3.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y ECOLÓGICA DE LOS PASTOS.

Las superficies herbáceas comprenden alrededor del 26% de la superficie terrestre, y un 80% de las tierras cultivables, representando una amplia variedad de ecosistemas como las estepas, sabanas y pampas (Steinfeld *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2006). Históricamente, los pastos han sido un pilar básico en el desarrollo de las sociedades por ser la base de la producción ganadera; situación que aún perdura, ya que el 68% de los pastos del planeta sustentan economías de carácter local, situadas principalmente en países en vías de desarrollo. Los pastos proveen el sustento de muchas sociedades rurales (DeFries y Rosenzweig, 2010), en las cuales viven más de 800 millones de personas con bajas rentas, y 200 millones más viven en áreas semiáridas y marginales que son altamente dependientes de los pastos para su sustento (Ayantunde *et al.*, 2011; Kemp y Michalk, 2007; McDermott *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2005).

Además de ser la fuente de alimento para la ganadería, estos biomas aportan otros beneficios no menos importantes desde un punto de vista ecológico y ambiental. Entre estos están su actuación como sumideros de CO₂. Del total de carbono orgánico contenido en la superficie terrestre, el 30% está acumulado en los suelos de pastos (Boval y Dixon, 2012), y su capacidad potencial de secuestro de carbono se

estima en $3 \cdot 10^8$ Tm año⁻¹, lo que supone un 4% del total de las emisiones de CO₂ (Powers *et al.*, 2011). Asimismo, son un gran reservorio de biodiversidad, ya que una gran parte de los ecosistemas de pastizales han persistido durante milenios y, por ello, poseen un gran número de especies endémicas (Bond y Parr, 2010; Mayle *et al.*, 2007).

Debido a la importancia que a nivel global tienen los pastos, y al incremento de la producción de carne y leche que se requerirá para satisfacer la demanda impuesta por el crecimiento demográfico, es perentorio mejorar su manejo para que puedan cumplir eficientemente sus múltiples funciones. En los últimos años, la estrategia para el manejo de estos agrosistemas incide en la reducción de los insumos para favorecer el reciclaje de los nutrientes y la biodiversidad y, en definitiva, a lograr una producción sostenible con impactos ambientales positivos (Ash *et al.*, 2011; Boval y Dixon, 2012; Orr y O'Reagain, 2011; Yeates *et al.*, 1997).

1.3.2.1. Evolución histórica de los sistemas de pastos en Europa.

Hasta el final de la Segunda Guerra Mundial, las naciones europeas eran de carácter eminentemente rural, con una economía basada en la agricultura. El tamaño de las explotaciones era, en general, pequeño (de 3 a 15 ha); y su actividad estaba enfocada a la autosuficiencia: siembra de diferentes tipos de cultivos, mantenimiento de praderas naturales y cria de ganado variado (Lelievre y Volaire, 2009). En el centro y norte de Europa los cultivos fundamentales eran cereales de invierno, leguminosas y especies de hoja ancha, que se rotaban en ciclos de cuatro años (leguminosa-cereal-especies de hoja ancha-cereal) o tres años (leguminosa-cereal-especies de hoja ancha); y, como variante de este esquema, se sembraban leguminosas perennes que se mantenían varios años, siendo la alfalfa (*Medicago sativa* L.), esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.) y zulla (*Hedysarum coronarium* L.) las especies más habituales.

En la región mediterránea la rotación era de dos años, alternando leguminosas de grano-cereal en las zonas de suelos más profundos y cereal-barbecho en el resto. Los pastizales, por lo común, no se sometían a ningún manejo; y las especies sembradas para forraje eran anuales, destacando: cebada (*Hordeum vulgare* L.), avena (*Avena*

sativa L.), veza (*Vicia* spp.), raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) y trébol de Alejandría (*Trifolium alexandrinum* L.)

El gran desarrollo económico producido tras la Segunda Guerra Mundial se reflejó también en la estructura agraria europea. La mecanización, el empleo masivo de fertilizantes nitrogenados, de pesticidas y herbicidas, junto con la introducción de cultivares de soja y maíz bien adaptados a las condiciones prevalentes en Europa, integraron a la actividad agraria en los mercados. Con ello se produjo un aumento en el tamaño de las explotaciones y una alta especialización por cultivos y zonas (Lelievre y Volaire, 2009).

En las regiones más productivas del centro de Europa los pastos desaparecieron, y en aquellas especializadas en la producción animal se introdujeron especies mejoradas de raigrás inglés (*Lolium perenne* L.) y raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.). Estas especies cuando son fertilizadas intensivamente con nitrógeno son más productivas que las leguminosas, y por ello las desplazaron de las rotaciones de cultivos. La alfalfa, aunque disminuyó su utilización, fue la única leguminosa que permaneció con importancia en el sistema rotacional. En praderas artificiales, algunas leguminosas quedaron como integrantes secundarios de mezclas simples con gramíneas: raigrás inglés-trébol blanco (*Trifolium repens* L.) en las zonas húmedas, y dactilo (*Dactylis glomerata* L.)-alfalfa en zonas más secas. Las gramíneas perennes se volvieron dominantes en las praderas naturales como resultado de la alta fertilización nitrogenada, y sólo en los suelos pobres, donde la producción ganadera era menos intensiva, las praderas naturales mantuvieron su estructura.

En la Europa mediterránea, dependiendo de la disponibilidad de riego y la profundidad del suelo, se produjo también la especialización de los sistemas. La ganadería extensiva quedó como la actividad preponderante en las zonas con suelos más pobres y sin opciones de riego. El sistema está basado en las praderas naturales y los pastizales, donde las gramíneas perennes y las leguminosas son los principales componentes. En los lugares con suelos más profundos pueden introducirse pastos semi-intensivos formados principalmente por mezclas de dactilo o festuca alta (*Festuca arundinacea*) con leguminosas como la alfalfa, la esparceta o la zulla. Su

objetivo es compensar las variaciones estacionales de cantidad y calidad del pasto para disponer de alimento para el ganado en las épocas menos favorables.

En las zonas más áridas de la cuenca mediterránea, donde el cultivo de cereales ha declinando paulatinamente debido a su baja producción, los sistemas agropastorales tradicionales han evolucionado hacia una ganadería extensiva con un enfoque diferente, que consiste en agregar valor añadido a los productos tradicionales básicos: carnes de calidad certificada, quesos y chacinas con denominación de origen, etc. En algunos lugares de estas zonas se han introducido mezclas complejas de leguminosas anuales y gramíneas (cultivares de dactilo y festuca alta adaptados a la sequía, principalmente) para formar pastizales semipermanentes (Lelievre y Volaire, 2009).

1.3.2.2. Los sistemas de pastos en Castilla y León. La dehesa.

El sector ganadero de Castilla y León ocupa los primeros puestos en censos y producciones de ovino, bovino y porcino a nivel nacional; y, dentro del contexto regional, el aporte económico de la producción ganadera es netamente superior al de la producción agrícola (Ciria Ciria y Ciria García de la Torre, 2004). Esta producción ganadera se sustenta gracias a la importante extensión de pastos que posee la región, en torno a $9,4 \cdot 10^6$ ha, lo que supone el 18,6% de la superficie nacional de pastos. Por provincias, León (793.231 ha) y Salamanca (765.260 ha) son las que cuentan con las mayores superficies, y las que aportan un mayor porcentaje a la Producción Final Ganadera de la región. En la provincia de Salamanca, el 90% de la superficie de pasto corresponde a pastos con arbolado ralo y a la dehesa (Ciria Ciria y Ciria García de la Torre, 2004).

La dehesa es el sistema agrosilvopastoral propio del Oeste de la 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 sostenible (Olea y San Miguel-Ayanz, 2006). Frente a estos condicionantes abióticos, la dehesa representa una estrategia de eficiencia y diversificación de estructuras, cuyo fin es aprovechar todos los recursos de su ambiente con el mínimo aporte posible de insumos externos. Gracias a esta diversificación y eficiencia, la dehesa es un agroecosistema muy versátil que ha sido

capaz de satisfacer las necesidades del hombre desde la Edad Media hasta nuestros días (Gómez Gutiérrez, 1992; Joffre *et al.*, 1999).

No sólo por su vertiente socioeconómica es importante la dehesa, sino también desde un punto de vista medioambiental. Como sumidero de carbono puede equiparse a otros biomas de la Tierra destacados en este aspecto (Pereira *et al.*, 2007); y, además, posee una gran diversidad de plantas vasculares (Díaz-Villa *et al.*, 2003), mamíferos (Carrete y Donazar, 2005), aves (Peris Álvarez, 1992), reptiles (Martin y López, 2002) e invertebrados (Galante *et al.*, 1991; Reyes-López *et al.*, 2003), lo que convierte a la dehesa en el gran reservorio de biodiversidad del área mediterránea, y hábitat de un buen número de especies en peligro de extinción (Bugalho *et al.*, 2011).

Los pastos, junto con el arbolado, son el componente esencial y definitorio de la dehesa, y la principal fuente de alimento para el ganado. Debido a los rigores del clima mediterráneo, los pastos naturales de la dehesa los forman principalmente especies anuales, aunque en las zonas de topografía más baja y adecuadamente pastoreadas se forman densos prados (“majadales”) donde son importantes las especies pascícolas perennes. El manejo de los pastos de dehesa está enfocado a incrementar la calidad nutricional, que viene determinada por la densidad de leguminosas y su capacidad fijadora de nitrógeno (Ferreira y Castro, 2011) —aporte de proteínas—; y no tanto a maximizar la producción, que está condicionada por las precipitaciones y, en consecuencia, es muy variable interanualmente (Gómez Gutiérrez y Calabuig, 1992; Vázquez de Aldana *et al.*, 2008).

Las leguminosas pascícolas, incluso una vez agostadas, tienen una calidad nutricional lo suficientemente alta para satisfacer los requerimientos del ganado, reduciendo o evitando tener que realizar otros aportes a su dieta. Sin embargo, es necesario mantener en el suelo un nivel adecuado de fósforo biodisponible (8-12 ppm) para lograr una adecuada cobertura y desarrollo de este grupo funcional de plantas. Como complemento a los pastos naturales de la dehesa, es habitual encontrar pastos artificiales para disponer de heno en invierno y verano. En este caso es requerido un abonado N-P-K. Por tanto, un apropiado manejo de los pastos de dehesa

debe estar basado en tres pilares fundamentales: un pastoreo racional, las leguminosas, y la fertilización fosfórica (Olea y San Miguel-Ayanz, 2006).

1.3.2.3. Especies pascícolas perennes.

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. En cambio, las especies pascícolas perennes son capaces de extender y regular el período productivo, ya que pueden rebrotar rápidamente al inicio del otoño, y también utilizar más eficientemente la humedad residual al final de la primavera. Además de hacer un uso más eficiente del agua, evitan en mayor medida la erosión del suelo y reducen los costos asociados a las labores de labranza y siembra que ocasionan las especies anuales; razones que, en su conjunto, aumentan la sostenibilidad económica y agronómica de los sistemas ganaderos mediterráneos (Lelievre y Volaire, 2009).

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 leguminosa, la alfalfa, la esparceta o pipirigallo y la zulla (Lelievre y Volaire, 2009).

1.3.2.3.1. El dactilo (Dactylis glomerata L.)

El dactilo es una gramínea vivaz de porte típicamente amacollado, con período de crecimiento activo durante la primavera y el otoño. Posee una buena adaptación a diferentes condiciones climáticas y es relativamente tolerante a la sombra (USDA, 2012). Tiene una buena producción tanto en cantidad como en calidad, y aptitud para siega y pastoreo. Generalmente se siembra en mezclas con otras gramíneas y con leguminosas forrajeras tanto para praderas de diente como para siega. Para praderas de diente, suele emplearse en mezclas con raigrás inglés, festuca alta y trébol blanco, con alfalfa e incluso con trébol subterráneo. Para praderas de siega de corta duración, principalmente con raigrás italiano y trébol violeta.

El crecimiento del dactilo es muy rápido, y su calidad bromatológica es buena, siendo muy apetecible para el ganado antes de su encañado. Por sus características de alto rendimiento, calidad nutricional y tolerancia a la sombra, es una especie que viene usándose como forraje desde hace más de 100 años, principalmente en Europa (Casler *et al.*, 2000), Norte América y Japón. En China se ha utilizado ampliamente en pastos cultivados, con buena adaptabilidad, y donde juega un importante papel en la producción ganadera y en la sostenibilidad ambiental (Peng *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2010).

1.3.2.3.2. La alfalfa (Medicago sativa L.)

La alfalfa es una leguminosa vivaz, basófila, de rápido crecimiento y alta tasa de rebrote. Forma una estructura de crecimiento denominada corona, con capacidad de rebrote basal, y posee una profunda raíz pivotante que le permite adaptarse bien a las condiciones de sequía (USDA, 2012).

Es considerada una de las principales plantas forrajeras por su adaptación a suelos y climas diferentes, y por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico cuando se encuentra en simbiosis con las cepas de rizobio adecuadas (Guiñazú *et al.*, 2010). La inclusión de este cultivo en los pastos mejora la producción de forraje y la calidad por su gran contenido en proteína útil y alta palatabilidad (Kreuger y Vigil, 1979). Se dedica principalmente a la siega, bien como cultivo puro o formando praderas en mezcla con otras especies forrajeras, como el dactilo y la festuca alta, o incluso con cereales con función de cultivo protector y complemento nutritivo.

Como leguminosa, demanda altas cantidades de fósforo por el coste energético que lleva asociado la fijación simbiótica de nitrógeno (Aerts y Chapin, 2000; Oelmann *et al.*, 2011), y un aporte adecuado de este nutriente incrementa el rendimiento, el número y tamaño de los nódulos y la tasa de fijación de nitrógeno en esta especie (Azcón *et al.*, 1988).

1.4. BIOINDICADORES DE LA CALIDAD DEL SUELO Y ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA.

La importancia del suelo como recurso natural se reconoce desde hace décadas, quedando reflejada la preocupación por protegerlo en las múltiples leyes y recomendaciones que han venido emitiendo los gobiernos de los diferentes países y los organismos internacionales (Bone *et al.*, 2010). Sin embargo, al contrario que en el caso del agua o del aire donde la calidad se puede acotar a la ausencia de contaminantes, el concepto de calidad del suelo no es fácil de definir dada la heterogeneidad y complejidad intrínsecas de sus componentes bióticos y abióticos, y de las interacciones entre ellos (Sojka y Upchurch, 1999). Por ello, las definiciones para este concepto que aparecen en la literatura científica son múltiples, enfatizando diferentes aspectos de acuerdo al enfoque agronómico, de riesgo ambiental o meramente ecológico que adopten (Bone *et al.*, 2010). Una de las definiciones de calidad o salud del suelo que quizá goza de un mayor consenso entre la comunidad científica es la propuesta por (Doran *et al.*, 1996): *“la capacidad continuada del suelo para, dentro de los límites definidos por el ecosistema y el uso de la tierra, mantener su funcionamiento, mantener la calidad del aire y del agua y promover la salud humana, animal y vegetal”*.

Para evaluar la calidad del suelo y monitorizar los cambios debido al manejo agrícola y otras perturbaciones de origen natural o antropogénico se han propuesto índices matemáticos que, al igual que ocurre con la propia definición de calidad del suelo, son numerosos y generalmente están elaborados para condiciones locales y objetivos concretos (Bastida *et al.*, 2008). Pero dada la diversidad de propiedades físico-químicas, bioquímicas y microbiológicas del suelo, todos ellos integran necesariamente varios indicadores (parámetros) que definen parte de esas propiedades.

La inclusión de diferentes tipos de indicadores es un requisito ineludible cuando se pretende estudiar la calidad o evolución de un suelo, ya que un determinado factor puede afectar profundamente a unos determinados parámetros y poco o nada a otros (Bastida *et al.*, 2008; Frankenberger y Dick, 1983; Gelsomino *et al.*, 2006; Nannipieri *et al.*, 1990). Pero no todos los parámetros medibles de un suelo tienen igual valor como indicadores, siendo más útiles cuanto más sensible son para detectar las tendencias o patrones de cambio, y cuanto mejor puedan relacionarse con otros factores del sistema, como los climáticos (Nortcliff, 2002).

Entre los indicadores o parámetros físico-químicos del suelo más útiles en tal cometido están el pH y la estabilidad de los agregados, aunque generalmente su utilidad queda restringida a suelos agrícolas, donde el manejo puede modificar estas propiedades en el corto plazo. El pH resulta alterado por el encalado y por el abonado con fertilizantes amoniacales, e influye sobre la solubilidad de los minerales, la disponibilidad de nutrientes para las plantas y la actividad de los microorganismos. Un agregado consiste en la unión de varias partículas finas del suelo (materiales orgánicos, arcillas, arenas, limos, etc.), y se forman por las interacciones entre las plantas y los microorganismos, y los productos de éstas con el componente mineral. Los agregados influyen decisivamente en la aireación, en la capacidad de retención de agua y en la resistencia del suelo a la erosión; y tanto el laboreo como las enmiendas orgánicas pueden modificar su estabilidad (Arias *et al.*, 2005).

Sin embargo, el indicador más ampliamente usado en el campo agronómico es el contenido de materia orgánica (o carbono orgánico) del suelo, que es una mezcla de componentes biogénicos que incluye, en proporciones variables, microorganismos y material vegetal no descompuesto (Arias *et al.*, 2005). La materia orgánica influye en las propiedades físico-químicas del suelo y en la disponibilidad de nutrientes. Como parte de ella, es común valorar el carbono contenido en la biomasa microbiana, que se considera un indicador más sensible a los cambios que el carbono orgánico total y, además, permite conocer la dimensión del componente microbiano (Bastida *et al.*, 2008); aunque esto último puede determinarse por otras metodologías, entre ellas mediante el análisis de los ácidos grasos presentes en el suelo.

Pero, sin duda, una clase de indicadores de gran valor son los parámetros bioquímicos, que, de forma directa o indirecta, guardan siempre relación con la actividad microbiana. Los parámetros bioquímicos del suelo son generalmente muy sensibles a las perturbaciones (Gil-Sotres *et al.*, 2005; Yakovchenko *et al.*, 1996), y sus determinaciones son relativamente rápidas y fáciles de realizar (Nannipieri *et al.*, 2002; Paz-Ferreiro *et al.*, 2011). Entre los que tienen un carácter más general, están la tasa de respiración del suelo (o respiración microbiana), la actividad deshidrogenasa y la tasa de mineralización del nitrógeno. Por su parte, como parámetros más específicos se emplean frecuentemente las actividades enzimáticas

relacionadas con los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre: β -glucosidasa, ureasa, fosfatasas y arilsulfatasa, respectivamente.

Pero además de lo reseñado, los estudios sobre la calidad y evolución de los suelos requieren un grado de conocimiento de la estructura y diversidad de las poblaciones microbianas, ya que, como se ha mencionado, el componente microbiano influye decisivamente sobre la mayoría de las propiedades del suelo (Bastida *et al.*, 2008). Para adquirir esta información se dispone de múltiples herramientas, como el análisis del perfil de ácidos grasos (Zelles, 1999), las técnicas moleculares basadas en reacciones de PCR, o los análisis metagenómicos, transcriptómicos y proteómicos del suelo (Sorensen *et al.*, 2009).

A continuación, se pasa a exponer más detalladamente algunos de los parámetros determinados durante la realización del presente estudio.

1.4.1. RESPIRACIÓN DEL SUELO.

En términos generales, la respiración puede definirse como la oxidación biológica de la materia orgánica a CO₂. En su conjunto, los suelos del planeta contienen alrededor de 2,1-2,3·10¹² Tm de carbono orgánico (Batjes, 1996), siendo la mayor reserva de carbono de la biosfera. La mineralización de esta materia orgánica por los microorganismos heterótrofos rige los ciclos biogeoquímicos de los principales nutrientes, afectando con ello a la producción vegetal y a la composición de la atmósfera (Sinsabaugh *et al.*, 2008). La respiración de la microbiota edáfica es el eslabón fundamental que cierra el ciclo del carbono en los ecosistemas terrestres, retornándolo a la atmósfera en forma de CO₂ (Schlesinger y Andrews, 2000). No obstante, parte del CO₂ desprendido desde el suelo proviene de otros procesos distintos a la respiración microbiana, como son los fermentativos y los procesos anaeróbicos que emplean NO₃⁻ o SO₄²⁻ como aceptores de electrones.

La medida de la respiración basal del suelo refleja tanto la cantidad como la calidad de las fuentes de carbono o, expresado de otra forma, el carbono potencialmente mineralizable presente en el suelo. Asimismo, constituye un índice integrado del potencial de la microbiota para degradar el componente orgánico bajo condiciones ambientales específicas, reflejando la actividad global o energía gastada por la misma (Anderson y Domsch, 1990; Kennedy y Papendick, 1995). Además de

por el contenido de carbono del suelo, este parámetro se ve afectado por múltiples factores tales como la climatología, las propiedades físicas del suelo, los nutrientes biodisponibles o las prácticas agrícolas (Alef, 1995; Campbell *et al.*, 1992; Pell *et al.*, 2006).

Tanto la tasa de respiración del suelo como la medida de la biomasa microbiana son indicadores sensibles que permiten valorar la respuesta de los ecosistemas a factores externos. Generalmente, la biomasa microbiana está estrechamente correlacionada con el contenido de carbono orgánico del suelo; por ello, en los estudios comparativos de suelos que difieren en el contenido de materia orgánica es habitual emplear índices basados en estos parámetros, como la relación carbono orgánico/biomasa microbiana (Anderson y Domsch, 1989); o el cociente metabólico ($q\text{CO}_2$), también denominado respiración específica, que es la tasa de respiración del suelo normalizada por unidad de biomasa microbiana (Anderson y Domsch, 1985). El cociente metabólico es un indicador de la eficiencia relativa de los microorganismos en el uso del carbono orgánico del suelo (Anderson y Domsch, 1993; Wardle y Ghani, 1995).

1.4.2. MINERALIZACIÓN DEL NITRÓGENO.

El proceso de mineralización del nitrógeno puede definirse como la conversión del nitrógeno orgánico a formas minerales (amonio y nitrato) aprovechables por las plantas y los microorganismos. Sin embargo, en sentido estricto, se denomina mineralización a la conversión del nitrógeno orgánico en nitrógeno amoniacal, y nitrificación a la oxidación de éste a nitrato.

Simultáneamente al proceso de mineralización ocurre el proceso opuesto, la inmovilización del nitrógeno (Powlson y Barraclough, 1993), que se produce fundamentalmente a partir del amonio (Recous *et al.*, 1988). Por tanto, la mineralización neta es el balance entre la cantidad total de nitrógeno mineralizado desde las formas orgánicas y la cantidad que es incorporada en la materia orgánica, principalmente por la asimilación microbiana (Murphy *et al.*, 2003). El resultado de este balance es de gran importancia para la producción vegetal de los ecosistemas, ya que de él depende la cantidad de nitrógeno mineral que queda disponible para las plantas.

Tanto la mineralización como la inmovilización del nitrógeno son procesos de tipo multienzimático, y ambos están mediados siempre por los microorganismos (Ladd y Jackson, 1982; Nannipieri *et al.*, 1990). Lógicamente, en ambos procesos influye de forma determinante la disponibilidad de carbono en el suelo, por ser la base del metabolismo microbiano; pero también resultan afectados por factores de tipo ambiental, como la humedad del suelo y la temperatura (Hassink, 1994), que influyen directamente sobre tasa de mineralización de la materia orgánica por los microorganismos y, por tanto, de forma indirecta en el ciclo de otros elementos, como el nitrógeno (Guntiñas *et al.*, 2012; Schimel y Bennett, 2004).

1.4.3. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

Los principales agentes que intervienen en la mineralización de la materia orgánica del suelo son las enzimas extracelulares, requiriéndose, debido a la heterogeneidad estructural de los biopolímeros, la interacción de distintas clases hasta llegar a la liberación final de los componentes monoméricos. (Burns, 1983 ; Sinsabaugh *et al.*, 1991). La enzimología de los suelos se estudia desde hace más de un siglo para profundizar en el conocimiento de los procesos que rigen la descomposición de la materia orgánica y el reciclado de los nutrientes, así como también para evaluar la respuesta de los ecosistemas a las alteraciones de origen natural o antropogénico (Finzi *et al.*, 2006; Lipson *et al.*, 2005; Nannipieri *et al.*, 2002; Sinsabaugh *et al.*, 2005). Generalmente, las enzimas que catalizan las etapas finales de la mineralización de la materia orgánica son las estudiadas con más asiduidad, por ser su cinética fácil de determinar y porque los productos de sus reacciones son las sustancias solubles asimilables por los organismos (Caldwell, 2005; Kirk y Farrell, 1987; Ljungdahl y Eriksson, 1985).

Las enzimas presentes en el suelo provienen tanto de las plantas como de los animales y microorganismos que lo habitan (Tabatabai, 1994). La vegetación contribuye de forma directa a la actividad enzimática del suelo mediante la excreción de diversas enzimas, e indirectamente mediante la influencia que ejerce sobre la composición y actividad de la microbiota rizosférica (Sanon *et al.*, 2009; Skujins, 1967). Sin embargo, son las enzimas extracelulares producidas por los microorganismos las que constituyen el grueso de la actividad enzimática global

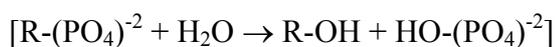
(Ladd, 1978) y, debido a que los microorganismos basan su nutrición en ellas, los valores de sus actividades se interpretan como indicadores de la demanda nutricional microbiana (Caldwell, 2005; Moorhead y Sinsabaugh, 2006; Olander y Vitousek, 2000; Schimel y Weintraub, 2003).

Pese a la utilidad de estos parámetros, debe tenerse en cuenta que su determinación en el laboratorio (*ex situ*) presenta una serie de limitaciones, ya que sólo proporcionan información de la actividad potencial, y no de la real en las condiciones ambientales que prevalecen en cada suelo (*in situ*). Asimismo, los sustratos que se emplean en las determinaciones enzimáticas no son representativos de los complejos del suelo. Ni siquiera los métodos más recientes desarrollados para las determinaciones *in situ* han encontrado la forma de medir las actividades enzimáticas sin la adición de sustratos artificiales (Wallenstein y Weintraub, 2008).

Las actividades fosfatasa, ureasa, arilsulfatasa y β -glucosidasa son empleadas habitualmente para monitorizar, respectivamente, el ciclo del fósforo, del nitrógeno, del azufre y del carbono; y la actividad deshidrogenasa como índice de la actividad oxidativa total de los microorganismos. Este conjunto de actividades enzimáticas refleja muy apropiadamente las propiedades de fertilidad de los suelos y son sensibles al manejo de los mismos (Baligar *et al.*, 1991a; Baligar y Wright, 1991; Baligar *et al.*, 1991b; Baligar *et al.*, 1999).

1.4.3.1. Fosfatasas.

El fósforo contenido en la materia orgánica del suelo es generalmente abundante, pero sólo resulta aprovechable por las plantas cuando se hidroliza y libera como ortofosfato gracias a la actividad de las fosfatasas (Condron *et al.*, 2005). Por ello, las fosfatasas juegan un papel crítico en el ciclo del fósforo (Speir y Ross, 1978), y su actividad se relaciona directamente con la fertilidad potencial de los suelos (Dick y Tabatabai, 1992; Dick *et al.*, 2000; Eivazi y Tabatabai, 1977). La actividad fosfatasa global del suelo es el resultado de la actividad parcial de un amplio grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres fosfato:



Las fosfatasas son secretadas tanto por las plantas como por los microorganismos en respuesta a una demanda de fósforo, o bien se liberan de forma pasiva desde las células muertas (Quiquampoix y Mousain, 2005). En el suelo son mayoritarias las fosfatasas de origen microbiano (Eivazi y Tabatabai, 1977). No obstante, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de adaptación a la escasez de fósforo, entre los que se encuentran la producción y exudación por las raíces de fosfatasas ácidas (del Pozo *et al.*, 1999; Haran *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Tarafdar y Jungk, 1987), cuya cantidad difiere entre especies y genotipos (Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2002; Ndakidemi, 2006). Las leguminosas, por ejemplo, secretan más que los cereales, probablemente debido a los altos requerimientos de fósforo que implica el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno (Yadav y Tarafdar, 2001).

Entre los diferentes tipos de fosfatasas, las fosfodiesterasas (E.C. 3.1.4), y las fosfomonoesterasas ácidas (E.C. 3.1.3.2) y alcalinas (E.C. 3.1.3.1) se consideran las predominantes en la mayoría de los suelos (Tabatabai, 1994); siendo, no obstante, la actividad fosfomonoesterasa superior a la actividad fosfodiesterasa (Eivazi y Tabatabai, 1977). Las fosfomonoesterasas actúan sobre compuestos de bajo peso molecular con enlaces monoéster, como mononucleótidos, azúcar-fosfatos y polifosfatos (Reid *et al.*, 1971); y son, entre el conjunto de fosfatasas, las mejor estudiadas debido a que una gran fracción del fósforo orgánico en el suelo está en forma de monoesterfosfatos. El pH del suelo determina la actividad fosfomonoesterasa predominante, ácida o alcalina, aunque no existe un consenso sobre cual es el óptimo para cada una de ellas (Trasar-Cepeda y Gil-Sotres, 1987).

Además de por el pH, la actividad fosfomonoesterasa resulta condicionada por otros factores, como el tipo de vegetación y de microbiota edáfica, el contenido en materia orgánica del suelo (Aon y Colaneri, 2001), las entradas de nutrientes (especialmente de fósforo), y la presencia de activadores o inhibidores enzimáticos (Acosta-Martínez y Tabatabai, 2000; Eivazi y Tabatabai, 1977; Juma y Tabatabai, 1977). Por otra parte, los factores ambientales, como la temperatura y la humedad, dan lugar a variaciones estacionales de dicha actividad enzimática (Sparling *et al.*, 1986; Speir y Ross, 1978). También, el manejo del suelo influye decisivamente sobre la actividad de las fosfatasas (Ndakidemi, 2006; Staddon *et al.*, 1998; Wright y Reddy, 2001). No obstante, y a pesar de los numerosos estudios realizados, aún falta

una información detallada sobre la regulación de la actividad fosfatasa del suelo y, especialmente, de su relación con la disponibilidad de fósforo (Turner y Haygarth, 2005).

1.4.3.2. β -glucosidasas.

Las glicosidasas son enzimas que juegan un papel clave en las fases iniciales de descomposición de los compuestos orgánicos. Estas enzimas rompen los enlaces glicosídicos de los glicósidos, oligosacáridos y polisacáridos, y de carbohidratos complejos (Eivazi y Tabatabai, 1988; Kiss *et al.*, 1975). Sus productos de reacción son fuentes de energía para los microorganismos del suelo (Eivazi y Tabatabai, 1988).

Entre las glicosidasas más importantes presentes suelo están la α -D-glucosidasa, la α -D-galactosidasa, la β -D-galactosidasa y la β -D-glucosidasa (Dey y Pridham, 1972; Eivazi y Tabatabai, 1988). En la fase final de la degradación de la celulosa, la enzima β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) hidroliza los β -D-glucopiranosidos liberando glucosa. De las enzimas que intervienen en el ciclo del carbono, la β -glucosidasa es la más abundante, y su actividad la más fácil de detectar en los suelos (Debosz *et al.*, 1999; Rastin *et al.*, 1988). Procede fundamentalmente de los microorganismos heterótrofos (Hayano y Tubaki, 1985) aunque, una vez liberada, puede permanecer activa adsorbida a las arcillas y coloides húmicos (Busto y Pérez-Mateos, 1995, 2000).

La determinación de la actividad β -glucosidasa es importante para conocer la calidad del suelo ya que juega un papel crucial en la utilización de la biomasa produciendo estructuras orgánicas más simples que facilitan, posteriormente, la actuación de otras actividades enzimáticas (Jiang *et al.*, 2010; Sardans *et al.*, 2008). En general, la actividad β -glucosidasa es un índice apropiado para conocer el potencial de descomposición de materia orgánica que tiene el suelo (Caravaca *et al.*, 2002). No obstante, en ciertos casos su actividad genera efectos fitopatológicos en el ecosistema (Davis *et al.*, 1953; Melouk y Horner, 1973), ya que algunas agliconas son precursoras de sustancias tóxicas para determinadas especies ((Patrick, 1955).

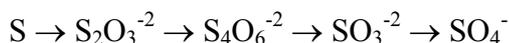
La actividad β -glucosidasa es muy sensible a los diferentes manejos del suelo (Gil-Sotres *et al.*, 2005), a la fertilización orgánica (Bandick y Dick, 1999; Pascual *et*

al., 1999), a los cambios de pH (Acosta-Martínez y Tabatabai, 2000) y a diversos tipos de contaminación (Makoi y Ndakidemi, 2008).

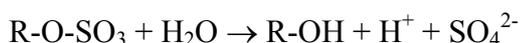
1.4.3.3. Arilsulfatasas.

El azufre es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, y es esencial para los seres vivos por mantener la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, la actividad catalítica de importantes enzimas, y por estar involucrado en numerosas reacciones redox debido a su relativa facilidad de oxidación (Marschner, 1995).

El azufre se encuentra en los suelos muy mayoritariamente en forma orgánica, aunque la proporción de azufre inorgánico puede variar considerablemente dependiendo del tipo de suelo (Zhao y McGrath, 1994). El azufre de la fracción orgánica es mineralizado hasta sulfato (McLaren *et al.*, 1985), que es la forma asimilable por las plantas, mediante la acción de diversas enzimas conocidas genéricamente como sulfatasas, según las siguientes reacciones:



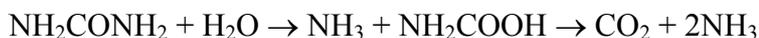
Tanto los animales como las plantas y los microorganismos producen sulfatasas, aunque en el suelo predominan fundamentalmente las de origen microbiano (Kertesz, 2000). Entre ellas, la arilsulfatasa (E.C. 3.1.6.1) fue la primera (Tabatabai y Bremner, 1970a) y la más extensamente estudiada. Esta enzima hidroliza los éster sulfatos orgánicos produciendo sulfato, según la siguiente reacción:



La actividad arilsulfatasa del suelo presenta una alta correlación con la actividad microbiana (Sinsabaugh, 1994), el pH (Acosta-Martínez y Tabatabai, 2000) y el contenido de materia orgánica y de arcilla del suelo (Acosta-Martínez *et al.*, 2007; Klose y Tabatabai, 1999; Prietzel, 2001; Tabatabai, 1994). Además, dicha actividad se ve afectada por la fertilización con azufre (Prietzel, 2001), y puede variar de acuerdo al tipo de vegetación (Cregut *et al.*, 2009; Knauff *et al.*, 2003). Se producen también variaciones estacionales de su actividad relacionadas con la humedad del suelo (Bergstrom *et al.*, 1998b; Whalen y Warman, 1996).

1.4.3.4. Ureasa.

La ureasa, o urea amidohidrolasa (EC 3.5.1.5), cataliza la hidrólisis de enlaces C-N peptídicos en amidas lineales para dar amonio y carbamato (Tabatabai, 1982), el cual se descompone espontáneamente en otra molécula de amonio y CO₂ según las reacciones siguientes:



Es una de las actividades más estudiadas dentro de la enzimología de los suelos por su relación con el ciclo del nitrógeno y por su influencia sobre la eficiencia de la fertilización con urea. Su origen es básicamente microbiano y su actividad extracelular (Dick *et al.*, 1996; Kizilkaya y Hepsen, 2004; Tabatabai, 1994), aunque también la producen las plantas (Polacco, 1977). La ureasa extracelular puede asociarse a los complejos organo-minerales, adquiriendo mayor estabilidad que cuando se encuentra libre en la solución del suelo (Burns, 1986). Así, los complejos humus-ureasa son altamente resistentes a los agentes desnaturalizantes, como las temperaturas extremas, y al ataque proteolítico (Nannipieri *et al.*, 1978); mientras que la ureasa libre en la solución del suelo es degradada rápidamente por las enzimas proteolíticas (Pettit *et al.*, 1976; Zantua y Bremner, 1977). La actividad ureasa se ha utilizado frecuentemente para evaluar los cambios debidos al manejo del suelo (Gil-Sotres *et al.*, 2005), ya que su actividad puede variar por las prácticas de fertilización química (Chakrabarti *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 1999), por la aplicación de estiércol animal (Kandeler y Eder, 1993) y como consecuencia del arado (Saviozzi *et al.*, 2001). Entre los factores ambientales, la temperatura influye decisivamente en la actividad de esta enzima (Tabatabai, 1977; Yang *et al.*, 2006).

1.4.3.5. Deshidrogenasa.

La actividad deshidrogenasa del suelo refleja la actividad total oxidativa de los microorganismos sobre la materia orgánica. Es el resultado global de diferentes deshidrogenasas que participan en el metabolismo respiratorio, en el ciclo del citrato y en el metabolismo del nitrógeno (von Mersi y Schinner, 1991). Son enzimas exclusivamente intracelulares (Dick *et al.*, 2005) presentes en todas las células vivas. Al no acumularse extracelularmente en el suelo, su medida refleja la cantidad de microorganismos viables y su capacidad oxidativa en el momento de la determinación (Trevors, 1984).

La actividad deshidrogenasa, por estar estrechamente ligada a los procesos de respiración, es sensible a las condiciones de oxido-reducción y, por tanto, se ve afectada por la temperatura y por la razón agua:aire del suelo (Brzezinska *et al.*, 1998; Doelman y Haanstra, 1979). Numerosos trabajos reportan la correlación de la actividad deshidrogenasa con determinados parámetros bioquímicos y metabólicos, como el número de células microbianas, la respiración del suelo, la concentración de ATP, y el contenido de materia orgánica (Malkomes, 1991; Nannipieri *et al.*, 1990). Esta actividad enzimática se ha empleado como indicador de la actividad microbiana en, entre otros, suelos de zonas semi-áridas mediterráneas (García *et al.*, 1994), suelos de bosques mediterráneos (Quilchano y Marañón, 2002), y en diversos suelos agrícolas para evaluar la respuesta a distintos manejos (Bergstrom *et al.*, 1998a; Beyer *et al.*, 1992).

1.4.4. ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DEL SUELO: PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS.

La bicapa lipídica de la membrana celular de todos los organismos contiene fosfolípidos, formados por una molécula de glicerol a la que se unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato. Cada especie presenta un patrón de ácidos grasos característico. En microbiología, estos patrones vienen empleándose para realizar la adscripción taxonómica de los aislados, pero también tienen una importante aplicación en los estudios de ecología microbiana, ya que permiten caracterizar la estructura de las poblaciones en muestras ambientales (Zelles, 1999). Es más, gracias a la profundidad que se logra en el análisis del componente microbiano del suelo, se pueden desarrollar índices de calidad del suelo basados en esta metodología (Puglisi *et al.*, 2005).

El análisis de la estructura de las poblaciones microbianas se realiza bien mediante el perfil conjunto de los ácidos grasos polares y no polares presentes en la muestra; o centrándose únicamente en los fosfolípidos polares, que son separados del resto mediante extracción en fase sólida (columnas de sílica). Tanto unos como otros son metilados tras la extracción, y finalmente separados, identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases. En el suelo, cuando mueren las células los fosfolípidos son desfosforilados en pocos minutos (White, 1993); por

tanto, los que se extraen proceden exclusivamente de microorganismos vivos; mientras que cuando se extrae todo el conjunto de ácidos grasos, parte de ellos pueden provenir de microorganismos muertos recientemente. No obstante, los ácidos grasos de cadena corta ($C < 20$), que son los predominantes en la membranas celulares microbianas, se descomponen rápidamente en el suelo y, por tanto, también derivan en su gran mayoría de los microorganismos que están vivos en el momento de la extracción (Jandl *et al.*, 2005; Kaur *et al.*, 2005). Parte de los ácidos grasos presentes en el suelo provienen, lógicamente, de células vegetales o animales; sin embargo, éstos se diferencian de los característicos de microorganismos en que, por lo general, tienen una longitud de cadena mayor ($C > 20$) (Jandl *et al.*, 2005).

Dentro del conjunto de ácidos grasos de origen microbiano, se distinguen aquellos que están presentes en todos los microorganismos y otros que son diagnósticos de determinados grupos. Así, por ejemplo, existen ácidos grasos característicos de bacterias Gram positivas, de bacterias Gram negativas, de actinobacterias, de hongos saprofitos y de hongos micorrícicos (Olsson, 1999; Zelles, 1999); y dentro de los de origen bacteriano, algunos pueden relacionarse con grupos aún más específicos por su predominio en ellos (Scott *et al.*, 2010). Con los ácidos grasos diagnósticos se determina la estructura de las comunidades; mientras que con la suma de todos, comunes y diagnósticos, se evalúa la biomasa microbiana total en la muestra (Zelles *et al.*, 1992). Las determinaciones de biomasa microbiana realizadas mediante el análisis de ácidos grasos guardan en general una buena correlación con las obtenidas por otras técnicas más convencionales, como la valoración del carbono o nitrógeno microbiano mediante el método de fumigación-extracción con cloroformo (Acosta-Martínez *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2010; Leckie *et al.*, 2004; Schutter *et al.*, 2001). No obstante, cuando se realizan comparaciones entre los grupos microbianos, se debe tener en consideración que el número de ácidos grasos exclusivos de hongos es menor que los específicos de bacterias, lo que puede llevar a una infravaloración de la proporción de biomasa fúngica en relación a la bacteriana. Sin embargo, se ha demostrado que la cantidad de ácidos grasos de origen fúngico está altamente correlacionada con el ergosterol presente en el sustrato, lo que indica la validez de esta técnica para cuantificar también la biomasa fúngica (Klamer y Baath, 2004).

En resumen, la determinación del perfil de ácidos grasos de un suelo proporciona información cuantitativa sobre la composición general de la comunidad microbiana y su biomasa. Mediante esta técnica se pueden analizar detalladamente los cambios que producen en la microbiota edáfica los distintos manejos del suelo, la composición de la cubierta vegetal o la presencia de contaminantes, entre otros factores (Chaudhary *et al.*, 2011; Drijber *et al.*, 2000; Larkin *et al.*, 2006; Meriles *et al.*, 2009; Stromberger *et al.*, 2007; Wortmann *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

El objetivo general del presente trabajo fue caracterizar las propiedades microbiológicas y bioquímicas de un suelo de pradera en el agroecosistema de dehesa, para lo que se establecieron parcelas experimentales con distintas proporciones de siembra de una leguminosa y una gramínea modelo: *Medicago sativa* (alfalfa) y *Dactylis glomerata* (dactilo).

Dada la importancia del fósforo en el ecosistema de dehesa, y su previsible escasez en el futuro, se incluyó como factor de estudio adicional la fertilización fosfórica para conocer sus efectos sobre los parámetros a estudio.

Por tanto, los objetivos específicos propuestos son:

1. El estudio de la dinámica temporal y estacional de las propiedades microbiológicas del suelo.
2. El estudio de la dinámica temporal y estacional de las propiedades bioquímicas del suelo.
3. El estudio de los efectos de la cobertura vegetal y la fertilización fosfórica sobre las propiedades microbiológicas del suelo.
4. Estudio de los efectos de la cobertura vegetal y la fertilización fosfórica sobre las propiedades bioquímicas del suelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA EXPERIMENTAL.

3.1.1. SUELOS.

Los suelos de la finca se encuentran principalmente desarrollados sobre materiales del Mioceno Medio, formado por conglomerados rojos con matriz arcillosa muy abundante. Los clastos son de naturaleza variable que comprende cuarzo, cuarcita y esquistos inmersos en una matriz de arena fina o gruesa. La finca se divide en una parte de dehesa propiamente dicha, y el resto es arable. En la zona arable predominan los Luvisoles, que presentan un horizonte Bt argílico; son arenosos en superficie, con disminución de contenido de arena en profundidad y aumento del contenido de arcilla, muy pobres en materia orgánica y nitrógeno. En dicha zona se encuentran dos tipos de Luvisoles: crómicos y cálcicos. Los Luvisoles cálcicos se formaron por el proceso de descarbonatación previo a la formación y evolución de esos suelos, con horizontes A y Bt superficiales con ausencia de carbonato cálcico y horizontes con acumulación de caliza en profundidad. Los luvisoles crómicos presentan como características generales textura areno-arcillosa, color rojo amarillento a rojo oscuro en profundidad, presencia frecuentes de gravas redondeadas de cuarcita y estructura arcillosa a partir de 70 cm.

La zona donde se realizó el experimento corresponde a un Luvisol crómico, y se trata de un lote empleado generalmente para el cultivo de cereales. Se encuentra ubicado en una ladera con pendiente menor al 4%, y el perfil está compuesto por cuatro horizontes: Ap - Bt₁ - Bt₂ - B/C₁ (Blanco *et al.*, 1989).

3.1.2. VEGETACIÓN.

La finca experimental Muñovela se encuentra en la provincia corológica CARPETANO-IBERICO-LEONESA, sector SALMANTINO. La vegetación clímax corresponde a asociaciones terminales de la serie supramediterránea salmantina silicícola de la encina (*Genisto hystricis* – *Querceto rotundifoliae* sigmetum). Esta tendencia, se encuentra modificada por la intervención antrópica, que combinada con

las situaciones morfológicas existentes, generan gran heterogeneidad. Se destaca, la presencia de especies con tendencia basófila, tales como: *Thymus zygis* L., *Brachipodium distachyum* (L.) Beauv., *Salvia verbenaca* L., *Bromus madritensis* L. y *Trisetum flavescens* (L.) Beauv., entre otras. En la actualidad, la superficie no dedicada al cultivo se restringe a zonas de ladera o monte, y prados-pastizales situados en zonas de vaguada.

La superficie dedicada al monte está ocupada por la encina (*Quercus rotundifolia* Lam.), en sistema de monte aclarado, matorral de la misma y submatorral de *Dorycnium pentaphyllum* Scop., *Thymus zygis* L. y *Th. mastichina* L., con algunos ejemplares aislados de *Crataegus monogyna* Jacq. bien desarrollados en las márgenes de un arroyo que discurre por la finca.



Figura 3.1. Fotografía aérea de la zona de ubicación de las parcelas experimentales. Finca Muñovela (IRNASA-CSIC), término municipal de Barbadillo (Salamanca). Coordenadas geográficas: 40°54'16'' N, 5°46'20'' W; Altitud: 824m. Escala aproximada 1:4500 [Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC); Junta de Castilla y León].

3.1.3. CONDICIONES CLIMÁTICAS.

El clima de la zona es seco y continental. Los datos de los años 1999 a 2008 registrados en la estación meteorológica situada en la propia finca —proporcionados por la Agencia Estatal de Meteorología— están reflejados en los Anexos, e indican una precipitación promedio anual de 389,8 mm, ocurriendo el máximo de precipitaciones en el mes de octubre y el mínimo en julio. La temperatura media mensual más baja se registró en el mes de enero (4,05 °C), mientras que la más alta se registró en el mes de julio (20,83 °C). Los valores en los años de realización del experimento (2009 y 2010) son similares a los promedios del periodo 1999-2008 en lo que se refiere a las temperaturas, pero difieren considerablemente respecto a las precipitaciones. Así, con la excepción de algunos meses, la precipitaciones mensuales durante el año 2009 fueron netamente inferiores a la media interanual 1999-2008, pudiéndose calificar al año 2009 como de muy seco. Sin embargo, en 2010 la precipitación anual fue mayor que en los períodos anteriores.

3.2. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES Y TOMA DE MUESTRAS.

3.2.1. ESTABLECIMIENTO DE LAS PARCELAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se establecieron un total de 40 parcelas experimentales de 9 m² de superficie (3x3 m), separadas por pasillos de 0,6 m de ancho entre parcelas, y de 1 m entre los bloques.

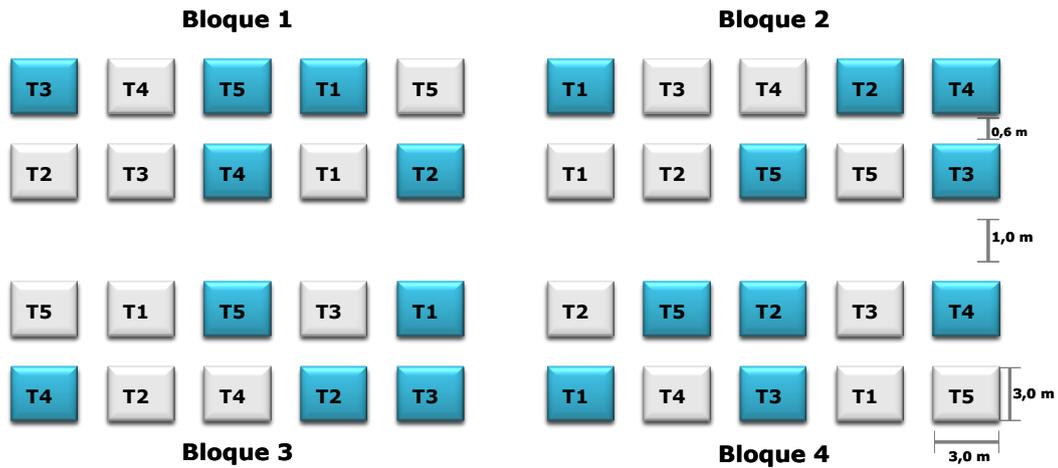
Las parcelas se sembraron con una gramínea (dactilo; *Dactylis glomerata* var. Trerano) y una leguminosa (alfalfa; *Medicago sativa* var. Aragón) en monocultivo y en siembra mixta. En monocultivo, las dosis de siembra para la gramínea (G) y la leguminosa (L) fueron de 20 kg ha⁻¹ y 35 kg ha⁻¹, respectivamente. En las siembras mixtas se aplicaron porcentajes del 25, 50 y 75% sobre la dosis de siembra utilizada en los monocultivos, para conseguir distintos predominios entre la gramínea y la leguminosa en la cobertura vegetal. La siembra se realizó el día 7 de marzo de 2008.

Durante el resto del año 2008 todas las parcelas se mantuvieron en condiciones idénticas de fertilización, para que ésta no influyese en el establecimiento de la

cubierta vegetal. Esta fertilización fue la recomendada habitualmente en la zona, consistiendo en 30 unidades de N ha⁻¹ como nitrosulfato amónico (26% de N), que se aplicó a los tres meses de la siembra (1 de julio de 2008). El 27 de marzo de 2009, se distribuyeron las parcelas en dos lotes, que en adelante tendrían una fertilización fosfórica diferencial. A las parcelas destinadas a recibir una alta fertilización fosfórica se les aplicó una dosis de fertilizante 15-120-80, que consistía en: 15 unidades de N ha⁻¹, como nitrosulfato amónico (26% de N); 120 unidades de P₂O₅ ha⁻¹, como superfosfato simple (18% de P₂O₅); y 80 unidades de K ha⁻¹, como KCl (60% K₂O). A la otra mitad de las parcelas se les aplicó una fertilización basal sin fósforo, 15-0-80. Este mismo esquema de fertilización se repitió antes del inicio de la primavera del año 2010. Adicionalmente, a las parcelas con alta fertilización fosfórica se les aplicó un abonado de 120 unidades de fósforo (0-120-0) al final del verano de cada año.

Por tanto, el ensayo tuvo un diseño factorial, con dos factores experimentales: factor fertilización fosfórica (P) y factor tipo de cobertura vegetal (T). El factor fertilización fosfórica comprendió 2 niveles: fertilización basal sin fósforo (-P), o fertilización basal enriquecida en fósforo (+P). El factor tipo de cubierta vegetal comprendió 5 niveles, de acuerdo a la proporción de de siembra de la gramínea (G) y la leguminosa (L):

- **T1:** gramínea en monocultivo (G100), con una dosis de siembra de 20 kg ha⁻¹.
- **T2:** gramínea al 75% y leguminosa al 25% (G75:L25); con dosis de siembra de 15 kg ha⁻¹ y 8,75 kg ha⁻¹, respectivamente.
- **T3:** gramínea al 50% y leguminosa al 50% (G50:L50); con dosis de siembra de 10 kg ha⁻¹ y 17,5 kg ha⁻¹, respectivamente.
- **T4:** gramínea al 25% y leguminosa al 75% (G25:L75); con dosis de siembra de 5 kg ha⁻¹ y 26,25 kg ha⁻¹, respectivamente.
- **T5:** leguminosa en monocultivo (L100), con dosis de siembra de 35 kg ha⁻¹.



Abril 2008 (germinación)

Primavera



Verano

Otoño

Figura 3.2. Esquema representando la distribución de las parcelas según el diseño factorial del experimento (T1 a T5, tratamientos de siembra; -P, gris; +P, azul); y fotografías mostrando el aspecto en el momento de la germinación y en las diferentes estaciones del año.

El diseño experimental fue en bloques aleatorizados mediante arreglo factorial (5*2) asimétrico de tipo balanceado, efecto fijo, de medidas repetidas en el tiempo con diez tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento para un total de 40 unidades experimentales (parcelas) distribuidas en cuatro bloques (Figura 3.2.). La variable de bloqueo fue la pendiente del terreno. Las parcelas fueron regadas por aspersión desde finales del mes de mayo hasta finales del mes de septiembre, aplicando una lámina de agua semanal de 17 mm, aproximadamente.

3.2.2. MUESTREO DE LOS SUELOS.

Los datos incluidos en esta memoria corresponden a seis muestreos consecutivos realizados durante los años 2009 y 2010, coincidentes con los meses de abril, julio y octubre, que en adelante se denominarán como muestreos de primavera, verano y otoño, respectivamente.

Los suelos se extrajeron con una sonda cilíndrica de acero de 4,8 cm de diámetro interno, introducida hasta los 10 cm de profundidad. En cada parcela se realizaron cuatro extracciones en lugares aleatorios, pero siempre situados a una distancia de los márgenes de la parcela superior a 0,5 m, para evitar el efecto borde. Las cuatro extracciones se combinaron y mezclaron homogéneamente para obtener una única muestra de suelo representativa de cada unidad experimental.

Una vez en el laboratorio, los suelos fueron tamizados (2 mm) en húmedo para eliminar piedras y restos orgánicos, dividiéndose cada muestra en cuatro alícuotas: una, destinada al análisis de ácidos grasos del suelo, se conservó liofilizada hasta su utilización; otra, destinada a la determinación de los parámetros bioquímicos, se conservó a 4 °C hasta el momento de su utilización, periodo que nunca sobrepasó los 10 días desde el muestreo; una tercera, destinada a la determinación de los parámetros generales del suelo, se seco al aire, en oscuridad y a temperatura ambiente; y la cuarta se utilizó para determinar el contenido de humedad del suelo — por diferencia de peso tras su secado en estufa a 105 °C—, que sirvió como factor de corrección en los cálculos para poder expresar los resultados en peso seco de suelo.

3.3. ANÁLISIS DE LOS SUELOS.

Los resultados de todos los análisis descritos en esta sección están reflejados en los Anexos, ordenados por año y estación de los muestreos, y por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica de las parcelas experimentales.

3.3.1. ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA: PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL SUELO.

La estructura de la comunidad microbiana del suelo se estudió mediante la determinación del perfil de ácidos grasos, realizándose siguiendo la metodología descrita por Marschner, 2007 (Marschner, 2007).

En ello se emplearon las alícuotas de suelo liofilizadas. La liofilización se realizó a partir de las muestras húmedas tamizadas (<2 mm), que se introdujeron en recipientes estériles de plástico de 50 ml de capacidad hasta completar la mitad de su contenido, congelándose a continuación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, las muestras congeladas se dispusieron en la cámara de secado de un liofilizador TELSTAR mod. Lioalfa-6, prolongándose la liofilización durante 72 horas. Una vez terminada, las muestras se conservaron herméticamente cerradas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

Todo el material utilizado en los procesos posteriores fue de vidrio, y los tapones de rosca de los tubos de ensayo poseían junta interna de teflón. Para evitar la contaminación entre muestras sucesivas, el material de vidrio se lavó con agua desionizada y detergente libre de fosfatos (DERQUIM, Panreac), posteriormente se sometió a un tratamiento térmico a $420\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 horas en horno de mufla y, finalmente, se lavó dos veces con cloroformo. Todos los reactivos fueron de grado analítico o de grado HPLC, y el agua de calidad milliQ.

3.3.1.1. Extracción y purificación de los ácidos grasos.

El procedimiento analítico consta de: una *etapa de saponificación*, con la que se consigue la lisis de las células presentes en el suelo, la liberación de los ácidos grasos de los lípidos celulares y la conversión en sus correspondientes sales sódicas; una *etapa de metilación*, en la que dichas sales sódicas se convierten en ésteres metílicos, para aumentar la volatilidad de los ácidos grasos de cara a su análisis cromatográfico; una *etapa de extracción*, en la que los ésteres metílicos de los ácidos grasos se transfieren de la fase acuosa acídica a la fase orgánica; y una *etapa de lavado*, en la

que se eliminan del extractante los ácidos grasos libres y los agentes residuales mediante lavado acuoso alcalino.

Se partió de 6 g de suelo liofilizado por muestra, contenidos en un tubo de ensayo, a los que se añadió 6 ml del reactivo de saponificación [150 g NaOH l⁻¹, en solución metanol:agua (1:1 v/v)]. Tras el cierre de los tubos y agitación en vórtex, se colocaron al baño María a 100 °C durante 30 minutos. Posteriormente, una vez enfriados en baño de hielo, se centrifugaron a 2,500 rpm durante 3 min, tras lo cual el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo.

Para realizar las siguiente etapa, al sobrenadante obtenido se le adicionaron 5 ml del reactivo de metilación [metanol:HCl 6N (1:1,2 v/v)]. Los tubos se agitaron en vórtex y se colocaron al baño María a 80 °C durante 10 minutos. Tras enfriarlos en baño de hielo, se procedió a la extracción líquido-líquido, para la cual fueron añadidos 1,25 ml del reactivo de extracción [hexano:metil tert-butil éter (1:1 v/v)] y agitados los tubos en un agitador rotatorio durante 10 minutos. Acabado el paso anterior, se realizó una centrifugación a 2.500 rpm durante 3 min, transfiriéndose después la fase orgánica superior a un nuevo tubo para realizar la etapa del lavado alcalino.

Para ello, se añadieron a los tubos con la fase orgánica 4 ml del reactivo de lavado [15 g NaOH l⁻¹, en agua], y éstos se agitaron y centrifugaron como en la etapa anterior. La fase orgánica fue de nuevo transferida a otro tubo de ensayo, y en él se procedió a su evaporación mediante corriente de nitrógeno.

Una vez completada la total evaporación de la fase orgánica, a cada muestra se le añadieron 10 µl del estándar interno [800 µg ml⁻¹ del metil éster del ácido nonadecanoico 19:0, en hexano] y 490 µl del reactivo de extracción; agitándose después los tubos suavemente, de forma manual, para resuspender los metil ésteres de los ácidos grasos contenidos en la muestra. Finalizado todo el proceso, las muestras se transfirieron a viales cromatográficos, conservándose a -20 °C hasta su análisis.

3.3.1.2. Análisis cromatográfico.

La separación y cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases en un equipo Agilent 7890A, equipado con

detector de ionización de llama y columna capilar HP-ULTRA 2 (J&W Scientific Inc.) de 25 m de longitud; 0,20 mm de diámetro interno y 0,33 μm de espesor de la fase estacionaria.

El volumen de muestra inyectado fue de 2 μl . La inyección se realizó en modo split-splitless con una proporción 1:45. Como gas portador se utilizó H_2 de alta pureza, con una presión de 9 psi en cabeza de columna y una velocidad lineal media de 26.165 cm/seg. Las temperaturas del inyector y el detector fueron 250 y 300 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. El programa de temperaturas del horno cromatográfico fue: temperatura inicial 170 $^{\circ}\text{C}$; rampa de temperatura de 170 $^{\circ}\text{C}$ a 260 $^{\circ}\text{C}$, con una tasa de incremento de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; y temperatura final de 310 $^{\circ}\text{C}$ durante 1,5 minutos.

La identificación en los cromatogramas de los picos correspondientes a los distintos ácidos grasos y la cuantificación de sus áreas se realizó mediante el paquete informático Sherlock[®] 6.0 (MIDI Inc.; Newark, DE, EE.UU.), desarrollado originariamente para la caracterización taxonómica de microorganismos aislados en cultivo puro. El área de cada pico fue primeramente normalizada, dividiéndola por aquella del pico correspondiente al estándar interno; transformándose después a unidades de concentración en base al factor de respuesta del estándar interno, determinado con anterioridad. Tras los correspondientes cálculos se obtuvo la concentración de cada ácido graso en el suelo de partida, expresada como nmol g^{-1} suelo.

Debido a que los ácidos grasos presentes en el suelo pueden proceder tanto de los microorganismos como de las plantas (Drenovsky *et al.*, 2004), del conjunto de ácidos grasos detectados en los análisis cromatográficos sólo se consideraron en este estudio aquellos a los que se les ha atribuido un origen predominantemente microbiano (Bell *et al.*, 2009; Bünemann, 2008; Olsson *et al.*, 1997; Zak *et al.*, 2000). Estos ácidos grasos y su adscripción a los diferentes grupos microbianos están indicados en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Ácidos grasos utilizados en el estudio.

Diagnóstico de:		
Ácido graso ^a		Grupo
i14:0	Bacterias	Gram positivas
14:0 ^b	Bacterias	
i15:0	Bacterias	Gram positivas
a15:0	Bacterias	Gram positivas
15:0 ^b	Bacterias	
i16:0	Bacterias	Gram positivas
16:1 w7c	Bacterias	Gram negativas
16:1 w5c	Hongos	Hongos Micorrícicos Arbusculares
16:0 ^b	General	
16:0 10Me	Bacterias	Actinobacterias
i17:0	Bacterias	Gram positivas
a17:0	Bacterias	Gram positivas
17:1 w8c	Bacterias	Gram negativas
cy17:0	Bacterias	Gram negativas
17:0 10Me	Bacterias	Actinobacterias
18:3 w6,9,12c	Hongos	Hongos Saprofitos
18:2 w6,9c	Hongos	Hongos Saprofitos
18:1 w9c	Hongos	Hongos Saprofitos
18:1 w7c	Bacterias	Gram negativas
18:0 10Me	Bacterias	Actinobacterias
cy19:0	Bacterias	Gram negativas

^a La nomenclatura de los ácidos grasos está basada en número de átomos de carbono:número de dobles enlaces, seguido por la posición del doble enlace desde el extremo metilo de la molécula. Las configuraciones *cis* y *trans* están indicadas por las letras c y t, respectivamente; las ramificaciones en posiciones iso y anteiso están indicadas por los prefijos i y a, respectivamente; el sufijo 10Me indica un grupo metílico unido al décimo átomo de carbono desde el extremo carboxílico; el prefijo cy indica la presencia en la molécula de un anillo de ciclopropano.

^b Utilizado exclusivamente en el cálculo de la biomasa microbiana total.

La biomasa microbiana total (nmol g^{-1} suelo) se calculó sumando las concentraciones de todos los ácidos grasos seleccionados. La abundancia relativa de cada grupo microbiano (bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas, actinobacterias, hongos saprofitos y hongos micorrícicos arbusculares) se calculó sumando las concentraciones de todos los ácidos grasos que son diagnósticos del grupo y dividiendo por la biomasa microbiana total, expresándose como porcentaje molar (%mol). Para los análisis estadísticos, los valores de abundancia relativa fueron transformados en arcoseno de la raíz cuadrada para aproximarlos a la normalidad.

3.3.2. PROPIEDADES GENERALES DEL SUELO.

3.3.2.1. pH

El pH se midió por el método de la pasta saturada con agua desionizada. La muestra de suelo se colocó en un vaso de precipitados, añadiéndose agua desionizada a la vez que se iba agitando con una varilla de vidrio, hasta obtener una pasta espesa en la que no debe haber exceso de agua. Se dejó reposar 30 minutos, midiéndose a continuación el pH de la pasta suelo:agua en un pH-metro CRISON micropH 2002.

3.3.2.2. Carbono total.

El carbono total se determinó por el método de oxidación húmeda de Walkley y Black, partiendo de 1 g de suelo seco y molido en molino de bolas. La muestra se digiere, en presencia de 20 ml de H_2SO_4 concentrado y 10 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N, tras lo cual se lleva a un matraz aforado de 100 ml, enrasando con agua destilada. El dicromato no consumido en el proceso se valora mediante volumetría con la sal de Mohr 0,2 N. Los blancos de reacción (sin suelo) se preparan paralelamente a la muestra siguiendo la misma metodología. Conociendo que 1 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ consumido equivale a 3,9 mg de carbono, se calculó el contenido de carbono del suelo.

Los resultados se expresaron en $\text{g C } 100 \text{ g}^{-1}$ suelo.

3.3.2.3. Nitrógeno total.

Para la determinación del nitrógeno total se partió de 2 g de suelo seco y molido en molino de bolas, que se colocó en matraces Kjeldahl. La mineralización del nitrógeno orgánico se efectuó por digestión húmeda, añadiendo H₂SO₄ concentrado y una pequeña cantidad de catalizador SO₄K₂/Se/SO₄Cu. Los blancos de reacción (sin suelo) se preparan paralelamente a la muestra siguiendo idéntica metodología. Una vez realizada la digestión a 350 °C en un bloque digestor y enfriada, la solución se enrasa a 100 ml con agua destilada en un matraz aforado. De allí se tomó una alícuota de 5 ml en la que se determinó el contenido de amonio colorimétricamente en un autoanalizador Bran+Luebbe AutoAnalyzer3 siguiendo la metodología recomendada por el fabricante, que básicamente consiste en la reacción de la muestra con salicilato e hipoclorito sódico, empleando nitroprusiato como catalizador, para producir un componente azulado cuya absorbancia se midió a 660 nm.

Los resultados se expresaron en g N 100 g⁻¹ suelo.

3.3.2.4. Fósforo inorgánico asimilable.

El contenido en fósforo inorgánico asimilable de los suelos se determinó por el método Olsen. Se partió de 2,5 g de suelo seco tamizado (<2mm), del que se extrae el fósforo con 50 ml de una solución 0,5 M de NaHCO₃ (pH 8,5), en agitación rotatoria durante 30 minutos. La solución extractante se filtra, y de ella se toma una alícuota de 10 ml, a la que se añaden otros 10 ml de una solución de (NH₄)Mo₇O₂₄:HCl (para neutralizar el pH) y 2 ml de una solución de SnCl₂. Una vez desarrollado el color, se midió la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro CARY 50 PROBE, cuantificándose el fósforo frente a una recta de calibrado preparada con patrones de concentración conocida.

Los resultados se expresaron en µg P g⁻¹ suelo.

3.3.3. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS.

3.3.3.1. Actividades enzimáticas.

3.3.3.1.1. Actividad fosfatasa (fosfomonoesterasa).

El método empleado para determinar la actividad fosfomonoesterasa del suelo (por brevedad, en adelante denominada fosfatasa) fue el descrito por (Eivazi y Tabatabai, 1977) ampliando el tiempo de incubación a dos horas debido a la baja

actividad enzimática que presentaban los suelos estudiados. El método se basa en la incubación del suelo en presencia de *p*-nitrofenil fosfato (PNP) y la posterior determinación colorimétrica del *p*-nitrofenol (PNF) liberado por la actividad enzimática.

El procedimiento parte de 1 g de suelo fresco tamizado (<2 mm), al que se adicionaron 4 ml de tampón MUB, pH 6,5 [20 mM THAM; 20 mM ácido maleico; 14,6 mM ácido cítrico y 20,4 mM H₃BO₃] y 1 ml de una solución de PNP 0,025 M. Las muestras se incubaron 2 horas a 37 °C. Tras la incubación, y para realizar la extracción del PNP liberado por la reacción enzimática, se agregaron en agitación y por este orden: 1 ml de CaCl₂ 0,5 M —para complejar la materia orgánica y evitar la dispersión de las arcillas— y 4 ml de NaOH 0,5 M. En paralelo al proceso descrito se prepararon blancos de reacción, en los que el PNP se incorpora tras la incubación y adición de las soluciones de CaCl₂ y NaOH. La suspensión así obtenida fue filtrada a través de papel de filtro Whatman 2v para proceder a su lectura espectrofotométrica (Figura 3.4.).

La absorbancia de los extractos se midió a 400 nm en un espectrofotómetro CARY 50 PROBE, que sería el utilizado en el resto de las determinaciones posteriormente descritas. Las lecturas de absorbancia de los blancos de reacción se restaron a las de las muestras, cuantificándose finalmente la reacción frente a una curva de calibrado de concentraciones conocidas de PNF. Para cada muestra de suelo las determinaciones se realizaron por duplicado.

Los valores de actividad enzimática se expresaron en $\mu\text{moles de PNF g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$.

3.3.3.1.2. Actividad glucosidasa (β -D-glucosidasa).

El método empleado para determinar la actividad β -D-glucosidasa del suelo (por brevedad, en adelante denominada glucosidasa) fue el descrito por (Eivazi y Tabatabai, 1988), ampliando el tiempo de incubación a dos horas. El método se basa en la incubación del suelo en presencia de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (PNG) y la posterior determinación colorimétrica del PNF liberado por la actividad β -D-glucosidasa.

La metodología es similar a la descrita en el caso anterior salvo en los reactivos que se adicionan antes y después de la incubación. En este caso, antes de la

incubación se adicionan 4 ml de tampón MUB, ajustado a pH 6,0; y, como sustrato de la enzima, 1 ml de una solución de PNG 0,025 M; y después de la incubación, 1 ml de CaCl₂ 0,5 M y 4 ml de una solución tampón THAM 100 mM, pH 12. La valoración del *p*-nitrofenol liberado se realizó de forma similar a la descrita para la actividad fosfatasa.

Los valores de actividad enzimática se expresaron en $\mu\text{moles de PNF g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$.

3.3.3.1.3. Actividad arilsulfatasa.

Se determinó mediante la cuantificación colorimétrica del *p*-nitrofenol liberado después de incubar el suelo con *p*-nitrofenil sulfato (PNS), de acuerdo a la metodología propuesta por (Tabatabai y Bremner, 1970a), pero ampliando el tiempo de incubación a 2 horas. La metodología es similar a la descrita anteriormente para la determinación de la actividad fosfatasa, salvo en los reactivos que se adicionan antes de la incubación, que en este caso son 4 ml de tampón acetato 0,5 M, pH 5,8; y, como sustrato de la enzima, 1 ml de una solución de PNS 0,025 M. Los pasos posteriores y la valoración del PNF liberado se realizaron de forma similar a la descrita para la actividad fosfatasa.

Los valores de actividad enzimática se expresaron en $\mu\text{moles de PNF g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$.

3.3.3.1.4. Actividad ureasa.

Se han desarrollado numerosos métodos para la determinación de la actividad ureasa en suelos basados, principalmente, en la determinación del amonio liberado tras la incubación del suelo con urea. Entre ellos está el método propuesto por (Kandeler y Gerber, 1988), que fue el empleado en este estudio, ampliando el tiempo de incubación de dos a cuatro horas.

Para esta determinación, se tomaron 5 g de suelo húmedo tamizado (<2 mm), al que se adicionaron en agitación 2,5 ml de una solución de urea 0,08 M. Tras una incubación de 4 h a 37 °C, se agregaron 50 ml de una solución de KCl 1 M en HCl 0,01 M, mezclándose la suspensión de suelo en un agitador rotatorio durante 30 min. Por último, la suspensión se filtró a través de papel Whatman 2v. En los blancos de reacción, antes de la incubación se adicionaron 2,5 ml de agua destilada en lugar de

la solución de urea, y ésta se incorporó inmediatamente antes de la adición de la solución de KCl (Figura 3.4.).

La determinación del amonio liberado se realizó mediante el siguiente método colorimétrico: a 1 ml del filtrado se le adicionaron 9 ml de agua destilada, 5 ml de solución salicilato sódico/NaOH y 2 ml de solución de dicloroisocianuro sódico (0.1 %). La solución salicilato sódico/NaOH se preparó mezclando volúmenes iguales de solución de salicilato sódico (17% de salicilato sódico y 0,12% nitroprusiato sódico), NaOH 0.3 M y agua destilada. Después de 30 min., se midió la absorbancia a 690 nm, cuantificándose el amonio producido frente a una curva de calibrado de concentraciones conocidas. Para cada muestra de suelo las determinaciones se realizaron por duplicado.

Los valores de actividad enzimática se expresaron en $\mu\text{moles de NH}_4\text{-N g}^{-1}$ suelo h^{-1} .

3.3.3.1.5. Actividad deshidrogenasa.

Para la determinación de la actividad deshidrogenasa del suelo se siguió la metodología propuesta por (Masciandaro *et al.*, 2000), pero aumentando el tiempo de incubación a 36 horas. Para ello, el suelo se incubó en oscuridad con la sal soluble 2-*p*-iodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-*p*-feniltetrazolio (INT). Dicha sal se emplea como aceptor artificial de electrones, cuya reducción da lugar al compuesto coloreado iodonitrotetrazolio formazán (INTF), determinándose espectrofotométricamente la concentración de éste.

El procedimiento analítico partió de 2 g. de suelo húmedo tamizado (<2 mm), adicionándole 0,4 ml de una solución de INT (0,4%). Las muestras se incubaron en oscuridad a 20 °C durante 36 horas. Después de la incubación, se agregaron 5 ml de solución extractante tetracloroetileno:acetona (1:1,5 v:v), agitándose la suspensión en vórtex y, posteriormente, centrifugándose a 3,500 rpm durante 10 min. Mediante la centrifugación se forma un sistema bifásico en el que el estrato inferior, de color rosa, contiene el INTF formado en la reacción.

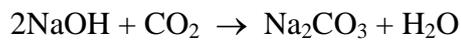
La fase inferior se tomó con una pipeta Pasteur, procediéndose a la cuantificación del INTF mediante lectura espectrofotométrica a 490 nm y comparación frente a una

curva de calibrado preparada con dicho compuesto (Figura 3.4.). Para cada muestra de suelo las determinaciones se realizaron por duplicado.

La actividad enzimática se expresaron en nmoles de INTF g^{-1} suelo h^{-1} .

3.3.3.2. Respiración microbiana del suelo.

En este trabajo se empleó el método más habitual de cuantificación de la actividad respiratoria del suelo, que consiste su incubación en un sistema cerrado, atrapando el CO_2 desprendido mediante una solución de NaOH, según la siguiente reacción estequiométrica:



En concreto, se siguió la metodología descrita por (Hernández y García, 2003), consistente en la incubación de 75 g de suelo fresco tamizado (<2mm) en frascos de vidrio de 1.000 ml de capacidad con cierre hermético, en el fondo de los cuales se depositaron 10 ml de NaOH 0,5 M en un recipiente abierto (Figura 3.4). Como blanco de la reacción se emplea igual volumen de la solución de NaOH, pero dentro de frascos sin suelo. Tras un periodo de incubación de 7 días a 20° C, el CO_2 producido se cuantificó mediante una valoración con HCl 0,1 M del NaOH no consumido, después de haber precipitado los carbonatos presentes en la disolución de NaOH con, aproximadamente, 2 ml de BaCl_2 al 20%.

Los resultados obtenidos se expresaron como μg de C- CO_2 g^{-1} suelo día^{-1} .

3.3.3.3. Mineralización de nitrógeno, y nitrógeno inorgánico asimilable.

La capacidad de mineralización de nitrógeno de los suelos se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por (De Boer y Kester, 1996) que, resumidamente, consiste en cuantificar el nitrato inorgánico contenido en el suelo al inicio y al final de un periodo de incubación en condiciones estandarizadas, siendo la diferencia entre estas dos medidas la cantidad de nitrógeno mineralizada en ese tiempo.

Para la realización de la técnica se emplearon 10 g de suelo fresco tamizado (<2 mm) por muestra, que fueron colocados en duquesas de plástico de 100 ml de capacidad (Figura 3.4). Antes del inicio de la incubación, el suelo fue humedecido con agua destilada estéril hasta el 60% de la capacidad de campo, y se mezcló con

Respiración del suelo



Actividad Fosfatasa



Actividad Ureasa



Actividad Deshidrogenasa



Mineralización de Nitrógeno



Actividad Arilsulfatasa

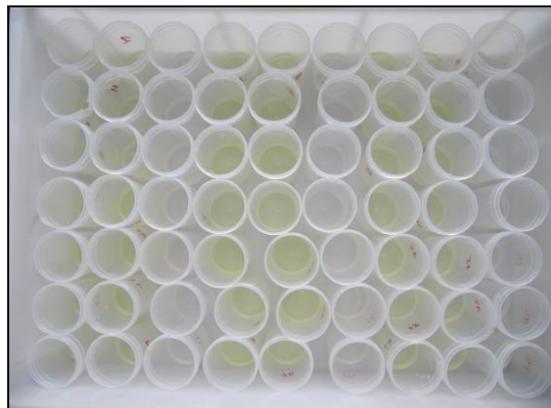


Figura 3.4. Fotografías mostrando distintos pasos de los procesos analíticos realizados.

arena de cuarzo lavada y esterilizada (suelo:arena; 4:1 v:v), para facilitar la aireación y evitar así que se produjesen reacciones de tipo anaerobio durante el proceso de incubación (Craswell y Waring, 1972). Inmediatamente antes del inicio de la incubación, el peso de las duquesas con la mezcla suelo:arena fue anotado, y su boca cubierta con Parafilm para evitar la evaporación excesiva de agua, sin comprometer con ello las condiciones aerobias de su interior. En este punto, una mitad del lote de muestras fue congelado a -20°C para paralizar la actividad microbiana, sirviendo posteriormente para determinar la concentración inicial de nitrógeno inorgánico.

La incubación se prolongó durante 60 días, a 20°C de temperatura. El grado de humedad de los suelos se mantuvo constante durante ese periodo. Para ello, las duquesas se pesaron semanalmente, pulverizándose agua destilada estéril en su interior hasta alcanzar el peso inicial si así lo requerían.

Transcurrido el periodo de incubación se procedió a la extracción del nitrógeno inorgánico de los suelos, tanto del lote incubado como del que permaneció congelado, que se realizó añadiendo a cada duquesa 50 ml de una solución de KCl 1M, y agitándola durante 1 hora en un agitador rotatorio. Finalmente, el extractante fue filtrado a través de papel Whatman 2V.

La cuantificaciones del nitrato y del amonio contenidos en el extractante se realizaron colorimétricamente, en un autoanalizador Bran+Luebbe AutoAnalyzer3, siguiendo la metodología descrita por el fabricante. La diferencias en el contenido de nitrógeno inorgánico ($\text{N-NO}_3 + \text{N-NH}_4$) entre las muestras congeladas y las incubadas corresponden al nitrógeno mineralizado durante el periodo de incubación. Para cada muestra de suelo las determinaciones se realizaron por duplicado.

La tasa de mineralización de nitrógeno se expresó como $\mu\text{g de N g}^{-1}\text{ suelo día}^{-1}$.

Asimismo, los valores obtenidos en el lote congelado sirvieron para evaluar el contenido de nitrógeno inorgánico asimilable de los suelos en el momento del muestreo, y estos valores se expresaron como $\mu\text{g N-NO}_3\text{ g}^{-1}\text{ suelo}$ y $\mu\text{g N-NH}_4\text{ g}^{-1}\text{ suelo}$.

3.3.4. OTRAS DETERMINACIONES.

Las determinaciones incluidas en esta sección se realizaron en el análisis inicial del suelo de la zona donde quedarían establecidas las parcelas experimentales, y fueron hechos sobre muestras tamizadas (<2mm) y secadas a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras de suelo se tomaron a intervalos regulares a lo largo de dos transectos, combinándose para dar un total de cuatro muestras independientes representativas de la zona. Los resultados de estos análisis se muestran al final de los Anexos.

3.3.4.1. Análisis granulométrico.

El análisis granulométrico del suelo se realizó, a partir de 20 gramos de muestra, según el método de la pipeta de Robinson. En un primer paso se produce la oxidación de la materia orgánica (con H₂O₂) y la destrucción de los carbonatos (con HCl 1N); seguido de la dispersión de la muestra con una solución de calgón (37,7 g l⁻¹ de hexametáfosfato sódico y 6 g l⁻¹ de carbonato sódico), en agitación durante 12 horas.

La muestra así tratada se pasa posteriormente a una probeta de 1 litro, enrasando con agua y agitando con una varilla de vidrio durante 1 minuto. La suspensión se deja decantar en la probeta durante cinco minutos. A continuación, se tomaron 20 ml de la suspensión con una pipeta Robinson, depositándose en una capsula de porcelana, y ésta en un baño de arena calefactado hasta la total evaporación del líquido (cápsula 1, limo+arcilla). El contenido de la probeta se vuelve a agitar con la varilla de vidrio y se repite el proceso anterior, pero esta vez dejando un tiempo de reposo de sólo 1 minuto (cápsula 2, arcilla). Por último, el contenido de la probeta se decantó y lavó con agua tantas veces como fue necesario hasta que el agua de lavado quedó clara, indicando la total eliminación de limos y arcillas. El resto de la muestra se pasa a una cápsula de porcelana, donde se evapora el agua en el baño de arena, tamizándose posteriormente el contenido de forma secuencial por tamices de 2 mm y 0,2 mm y pesando la fracción retenida en cada uno (arena gruesa y arena fina, respectivamente).

Con los diferentes pesos se calcula el contenido de arcilla (cápsula 2), limo (diferencia de peso entre cápsulas 1 y 2), arena fina y arena gruesa, expresándose el resultado en porcentaje.

3.3.4.2. Cationes asimilables.

La determinación de la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ asimilables se realizó partiendo de 5 g de suelo seco tamizado (<2mm), a los que se añadieron 100 ml de solución extractora de acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1N; pH 7,0); agitándose después la suspensión en un agitador rotatorio durante 30 minutos. Acabada la agitación, la suspensión se filtró a través de papel Whatman 2V, y en el filtrado se midieron las concentraciones de los mencionados cationes en un espectrómetro de absorción atómica Varian Fast Sequential SpectrAA-220.

Los resultados para cada catión se expresaron como $\mu\text{g g}^{-1}$ suelo.

3.3.4.3. Capacidad de intercambio catiónico.

La capacidad de intercambio catiónico se realizó por percolación del suelo con acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1N; pH 7,0), para extraer los cationes Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ ; y posteriormente, tras lavado de la muestra con etanol, el NH_4^+ se extrajo por lixiviado con una solución acidificada de NaCl 5M. Las concentraciones de los cationes en el primer extracto se determinaron en un espectrómetro de absorción atómica Varian Fast Sequential SpectrAA-220. La concentración de NH_4^+ se determinó en un autoanalizador Bran+Luebbe AutoAnalyzer3 siguiendo la metodología recomendada por el fabricante.

La capacidad de intercambio catiónico del suelo se expresó en cmol (+) kg^{-1} .

3.3.4.4. Contenido de carbonatos.

El contenido de carbonatos se determinó en 1 g de suelo seco tamizado (<2 mm) por el método del calcímetro de Bernard, basado en una volumetría de gases. Resumidamente, a la muestra de suelo se le añaden 10 ml de HCl, y el volumen de CO_2 desprendido de la reacción del ácido con los carbonatos se mide en la bureta del aparato. El calcímetro fue previamente calibrado con 0,2 g de CaCO_3 , seco y finamente pulverizado.

Los resultados se expresaron como % de CaCO_3 .

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

El primer tratamiento estadístico de los datos microbiológicos —biomasa microbiana y abundancia relativa (%mol) de los distintos grupos de microorganismos— y bioquímicos tuvo como objetivo evaluar la existencia en ellos de diferencias a lo largo de las estaciones y años que comprende el estudio, para lo que se empleó un análisis de la varianza de medidas repetidas, considerando cada parcela experimental como un sujeto —independientemente de su tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica— y los diferentes muestreos como la variable intra-sujetos. Este análisis se realizó con el programa estadístico SPSS 19.0 para Windows[®] (SPSS Inc. Chicago, USA).

Una vez comprobada la existencia de una evolución temporal significativa en los parámetros microbiológicos o bioquímicos del suelo, el siguiente análisis realizado fue un MANOVA-Biplot de una vía (Amaro *et al.*, 2003). Esta es una técnica estadística multivariante utilizada en situaciones experimentales donde se dispone de varias variables respuesta —los parámetros microbiológicos y bioquímicos, en nuestro caso— y se quiere buscar las diferencias entre varios grupos —los diferentes muestreos realizados—. La técnica calcula regiones de confianza considerando la variabilidad de los ejes, permitiendo así interpretar las diferencias o similitudes existentes en los grupos y, además, interpretar las relaciones entre las variables, y las relaciones entre grupos y variables. A diferencia de otras técnicas, el MANOVA-Biplot proporciona medidas de la calidad de representación tanto de las medias de grupo como de las variables, lo que permite una mejor interpretación de los resultados. Los análisis MANOVA-Biplot se realizaron con el programa informático MultBiplot (Vicente-Villardón, 2010).

Para comprobar la existencia de efectos significativos de los factores experimentales —años y estaciones; o fertilización fosfórica y tipo de cobertura vegetal— sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo, según viene determinada por la abundancia relativa de todos los ácidos grasos (diagnósticos y no diagnósticos), se realizó un Análisis Multivariante Permutacional (PERMANOVA) (Anderson, 2001), con 1000 permutaciones para obtener la mayor sensibilidad posible en el cálculo del estadístico F y de los subsiguientes p -valores. Los análisis PERMANOVA se realizaron con la función Adonis del paquete informático R-vegan (Oksanen *et al.*, 2010; R Development Core Team 2009).

Una vez comprobado el efecto significativo de los factores mediante el análisis PERMANOVA, para estudiar las diferencias en la estructura de la comunidad microbiana se empleó la técnica de Escalamiento Multidimensional No Métrico (Nonmetric Multidimensional Scaling; NMDS, por sus siglas en inglés), que es una técnica multivariante de ordenación que representa en un espacio geométrico bidimensional las proximidades existentes entre un conjunto de unidades experimentales (parcelas, en nuestro caso). El análisis NMDS se realizó con el paquete informático R (R Development Core Team 2009).

Para determinar las relaciones de los parámetros microbiológicos, bioquímicos y químicos del suelo con los factores experimentales se realizaron Análisis de la Diferencia Representacional —RDA; por sus siglas en inglés; también denominado Análisis de Redundancia—, que es una técnica de ordenación multivariante de análisis de correlación canónica, empleando para ello los parámetros medidos como las variables respuesta y los distintos niveles de los factores como variables predictoras. Estos análisis se realizaron con el programa informático CANOCO para Windows 4.5[®] v. 4.5 (Microcomputer Power, Ithaca, Nueva York, EE. UU.).

Por último, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para corroborar la significación estadística del efecto de los factores experimentales sobre los diferentes parámetros estudiados; y cuando éstos reflejaron efectos significativos, se procedió a realizar tests *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los niveles de los factores. Los análisis ANOVA se llevaron a cabo mediante el programa estadístico SPSS 19.0 para Windows[®] (SPSS Inc. Chicago, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO DE LA DINÁMICA TEMPORAL Y ESTACIONAL DE LAS PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL SUELO.

Con el fin de valorar la existencia o no de una evolución temporal en los parámetros microbiológicos y bioquímicos del suelo, el primer análisis de los resultados fue un test ANOVA de medidas repetidas. Una vez comprobada la existencia de una evolución temporal en dichos parámetros, el siguiente análisis estadístico realizado fue un MANOVA-Biplot de una vía para poner de manifiesto las diferencias entre los grupos a estudio —muestras— relacionándolas con las variables que definen en mayor medida esas diferencias.

Para la correcta interpretación de la representación gráfica de los MANOVA-Biplot debe considerarse que los grupos (muestras) están representados por la proyección de su centroide en el plano, circundado por la región de confianza para la media al 95%. Las distancias entre los centroides deben interpretarse como disimilaridades entre los grupos o, en otras palabras, la proximidad implica similitud. Las variables (parámetros microbiológicos o bioquímicos) aparecen representadas como vectores, cuyo módulo —longitud del vector— se interpreta en términos de variabilidad y, por tanto, de capacidad informativa de la variable; y los ángulos que forman los vectores entre sí se interpretan en términos de correlación entre las variables. Así, los ángulos agudos indican una correlación positiva; cuando son cercanos a 90° las variables están incorreladas; y cuando los ángulos son cercanos a 180° tienen una correlación negativa.

La relación grupos-variables se estudia a través de la proyección perpendicular del correspondiente centroide sobre las líneas imaginarias definidas por la prolongación de los vectores en ambos sentidos. Esto permite determinar cuales son las variables que más diferencian a los grupos. Si la proyección interseca en un punto situado del origen de coordenadas hacia el sentido del vector —dirección de la flecha—, el valor medio de la variable en ese grupo (muestreo) es superior a la media general; y,

recíprocamente, es menor cuando la intersección se produce en el sentido opuesto al del vector. Cuanto más alejada del origen de coordenadas esté la intersección, mayor o menor, según el sentido, será el valor de la variable.

4.1.1. PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS.

4.1.1.1. Biomasa microbiana y abundancia relativa de los grupos microbianos.

El análisis ANOVA de medidas repetidas de la biomasa microbiana y de la abundancia relativa (% mol) de los distintos grupos de microorganismos —determinados en base a los respectivos ácidos grasos diagnósticos— indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre muestreos para todos estos parámetros (Tabla 4.1.). En la figura 4.1. se muestran los valores alcanzados en los sucesivos muestreos.

Tabla 4.1. Resultado de los análisis ANOVA de medidas repetidas de los parámetros microbiológicos.

	W de Mauchy		Lambda de Wilks	
	Chi-Cuadrado	Sig.	F	Sig.
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
H. Micorrícicos Arbusc.	28.167	0.014	4.246	0.004

La biomasa microbiana presentó una tendencia relacionada con la estacionalidad, siendo superior en primavera que en las otras dos estaciones, así como también en los muestreos del segundo año (2010) respecto a los del primer año (2009). La abundancia relativa de actinobacterias tendió a incrementarse con el tiempo, siendo en los dos primeros muestreos —primavera y verano del 2009— notablemente menor que en los muestreos posteriores. En los otros grupos microbianos, aunque existieron diferencias puntuales entre muestreos, no se pudieron observar tendencias tan claras como las mencionadas.

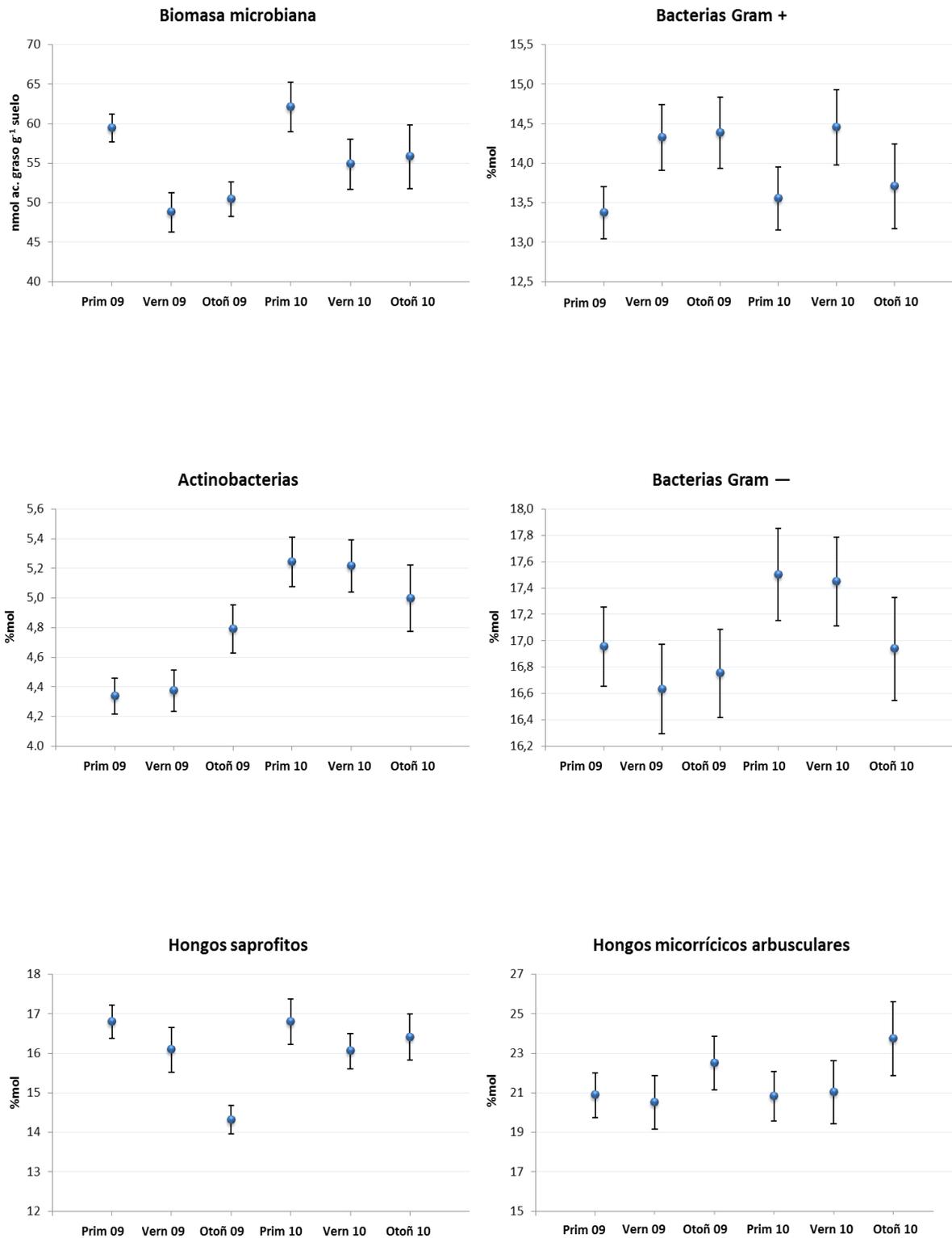


Figura 4.1. Valores de biomasa microbiana total y abundancia relativa (%mol) de los grupos de microorganismos en los seis muestreos sucesivos realizados. Media \pm ESM (N= 40).

De acuerdo al análisis MANOVA-biplot realizado sobre estos parámetros microbiológicos (Figura 4.2.), existe una clara distinción entre los dos años, como se puede inferir de la separación entre los centroides de los muestreos del primer año (2009), todos situados a la derecha del origen de coordenadas, y los del segundo año (2009), que se sitúan a la izquierda. Asimismo, la separación de los muestreos del primer año indica disimilitudes significativas entre ellos, al no solaparse las regiones de confianza, mientras que en el segundo año presentan una mayor similitud, solapándose dichas regiones.

La diferencia entre los dos años se debe fundamentalmente a la menor abundancia relativa de actinobacterias en el primero (2009), especialmente en los muestreos de primavera y verano (Figura 4.1.), como lo indica la situación alejada del origen de coordenadas de sus correspondientes centroides y en sentido opuesto al del vector de las actinobacterias. Sin embargo, la separación entre las estaciones del primer año está causada principalmente por la mayor biomasa microbiana registrada en primavera y la menor abundancia relativa de hongos saprofitos en el otoño, ambas muy destacadas respecto a las otras estaciones (Figura 4.1.).

Conocidas las principales diferencias entre muestreos relacionadas con estos parámetros microbiológicos, el análisis univariante (ANOVA) de los mismos agrupados por estaciones indica que tan sólo en la biomasa microbiana y en la abundancia relativa de hongos saprofitos aparecen diferencias significativas relacionadas con la estacionalidad. Así, la biomasa microbiana fue estadísticamente superior en la estación de primavera que en el verano o el otoño ($p < 0,05$), no existiendo diferencias significativas entre las dos últimas estaciones (Figura 4.3.). Por su parte, la abundancia relativa de hongos saprofitos fue superior en primavera que en otoño ($p < 0,05$); produciéndose en verano unos valores intermedios, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas con las otras estaciones (Figura 4.3.).

4.1.1.2. Estructura de la comunidad microbiana.

El estudio de la evolución temporal de la estructura de la comunidad microbiana del suelo —basado en los datos de abundancia relativa de todos los ácidos grasos, diagnósticos y no diagnósticos— se realizó mediante un análisis NMDS, tras

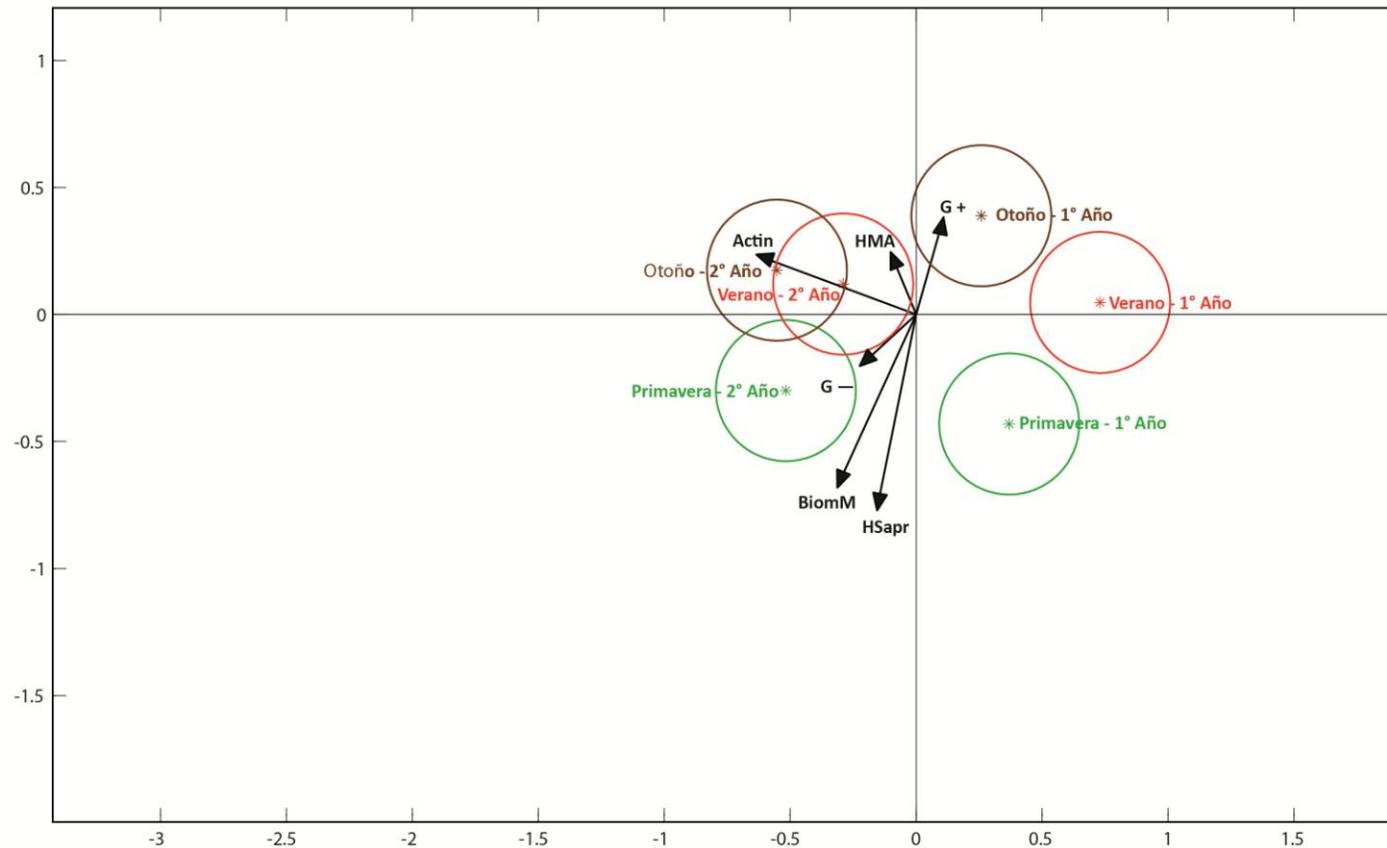


Figura 4.2. Gráfico MANOVA-Biplot mostrando las relaciones entre los parámetros microbiológicos estudiados y los muestreos realizados en primavera, verano y otoño de los años 2009 (*1º Año*) y 2010 (*2º Año*). *BiomM*, biomasa microbiana total; *G+*, bacterias Gram positivas; *Actin*, actinobacterias; *G-*, bacterias Gram negativas; *HSapr*, hongos saprofitos; *HMA*, hongos micorrícicos arbusculares.

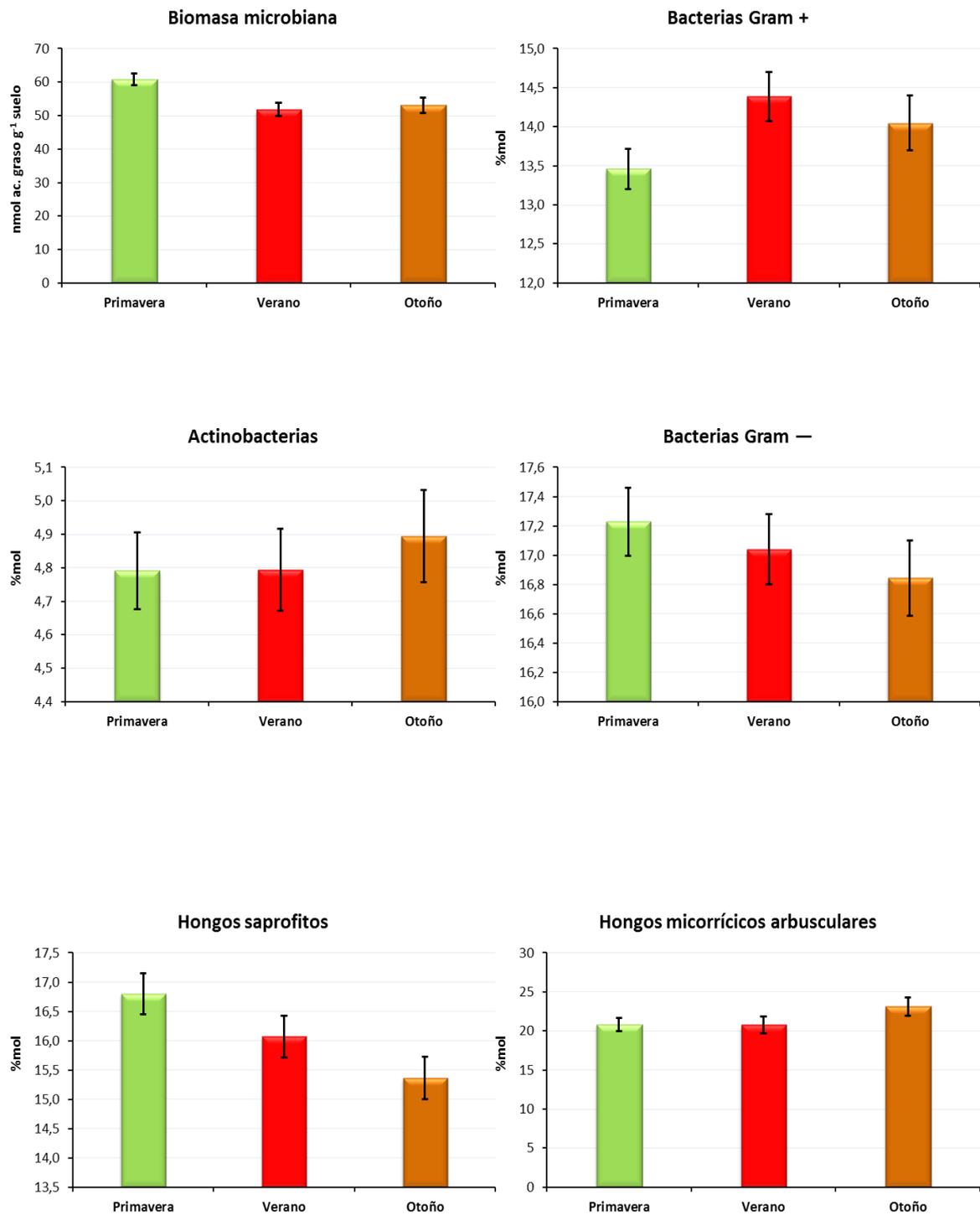


Figura 4.3. Valores de biomasa microbiana total y abundancia relativa (%mol) de los grupos de microorganismos en las estaciones de primavera, verano y otoño. Media \pm ESM ($N= 80$).

verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las estaciones y los años a través de un análisis PERMANOVA.

El análisis PERMANOVA indicó efectos altamente significativos (Tabla 4.2.) que señalan que la estructura de la comunidad microbiana experimenta una evolución que la hace diferir entre las estaciones del año y entre los dos años estudiados. El resultado del análisis NMDS (Figura 4.4.) muestra una clara separación de las parcelas tanto a lo largo del eje 1 como a lo largo del eje 2. Sobre el eje 1 se forma un agrupamiento, a la izquierda del gráfico, compuesto por 8 parcelas de cada estación y año, situándose las restantes hacia la derecha del gráfico. Teniendo en cuenta que para este análisis NMDS cada muestra de suelo se clasificó de acuerdo a la estación y año en que fue tomada —sin considerar los tratamientos de cobertura vegetal ni de fertilización fosfórica que tuviese la parcela de procedencia—, la ordenación observada a lo largo del eje 1 no tiene relación con la temporalidad, sino con el tratamiento de cobertura vegetal aplicado a esas 8 parcelas, como se verá en secciones posteriores de esta memoria.

Tabla 4.2. Resultado del análisis PERMANOVA (1.000 permutaciones) de los efectos de los factores año y estación sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo determinada por la abundancia relativa (%mol) de 21 ácidos grasos.

Factores	G.L.	SS	MS	F	R ²	Sig.
Año	1	0.006962	0.0069625	16.6073	0.06339	0.001
Estación	2	0.004351	0.0021755	5.1891	0.03961	0.001
Residuales	235	0.098522	0.0004192		0.89700	
Total	238	0.109835			1.00000	

A lo largo del eje 2 (vertical) se observa una separación claramente definida por el año en que se realizaron los muestreos, situándose las muestras del primer año (2009; símbolos huecos) hacia la mitad inferior del gráfico, y las del segundo año (2010; símbolos sólidos) hacia la mitad superior. Por otra parte, se constata una separación por estaciones dentro de cada año, tendiendo los símbolos del verano y otoño (triángulos y círculos) a estar agrupados en franjas horizontales, y más dispersos los correspondientes a las primaveras (cuadrados); lo que vendría a indicar que en esta

última estación la variabilidad en la estructura de la comunidad microbiana del suelo es mayor que en verano y otoño.

Tomando en conjunto los resultados de ambos análisis —PERMANOVA y NMDS—, se puede afirmar que la estructura de la comunidad microbiana experimentó una evolución estadísticamente significativa a lo largo del tiempo, tanto entre las estaciones como entre los años.

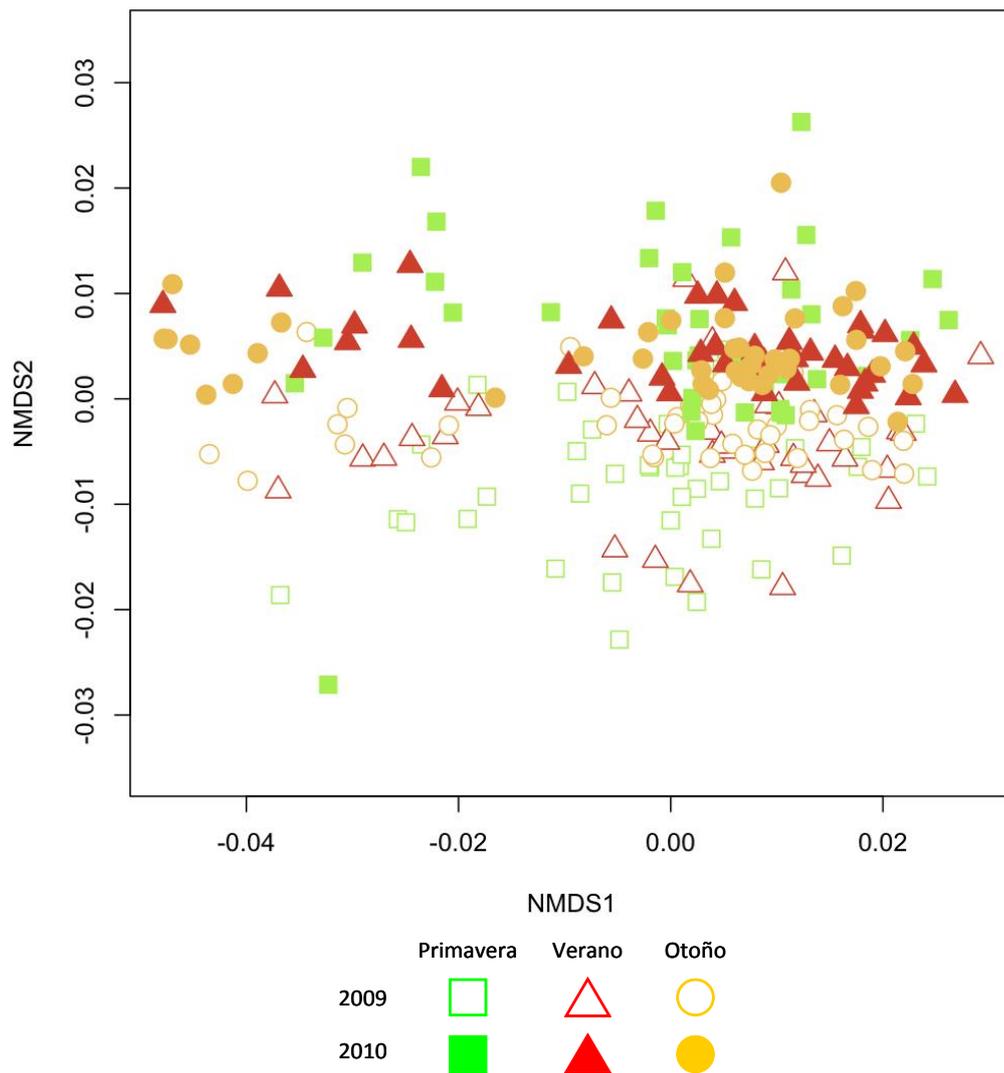


Figura 4.4. Gráfico del análisis NMDS de los perfiles de ácidos grasos de los suelos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010. Cada símbolo representa a una parcela experimental.

4.1.2. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS.

El resultado del test ANOVA de medidas repetidas indica que en los valores de todos los parámetros bioquímicos estudiados existen diferencias estadísticamente significativas entre muestreos (Tabla 4.3.). En los gráficos de la figura 4.5. se muestran los valores alcanzados por los diferentes parámetros bioquímicos en los sucesivos muestreos.

Tabla 4.3. Resultado de los análisis ANOVA de medidas repetidas de los parámetros bioquímicos.

	W de Mauchy		Lambda de Wilks	
	Chi-Cuadrado	Sig.	F	Sig.
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 N	81.317	0.000	60.978	0.000
Respiración	27.572	0.016	27.063	0.000
qCO ₂	37.877	0.001	12.643	0.000

En las actividades glucosidasa y fosfatasa, y en la respiración basal del suelo se observó una clara disminución de sus valores a medida que avanzaba la estación del año (primavera>verano>otoño). En la tasa de mineralización de nitrógeno, los valores de primavera tendieron a ser superiores a los obtenidos en verano y otoño, destacando especialmente la primavera del primer año (2009). En cambio, la actividad arilsulfatasa fue superior en los muestreos de verano que en los realizados en las otras dos estaciones, siendo ésta notablemente alta en el verano del segundo año (2010). El coeficiente metabólico (qCO₂) fue netamente inferior en los muestreos de otoño que en los de primavera y verano. Por el contrario, los valores de las actividades ureasa y deshidrogenasa no presentaron una tendencia definida con respecto a la estacionalidad; destacando los valores extremadamente altos obtenidos en el otoño del primer año (2009), en el caso de la ureasa, y en el verano del segundo año (2010), en el caso de la deshidrogenasa.

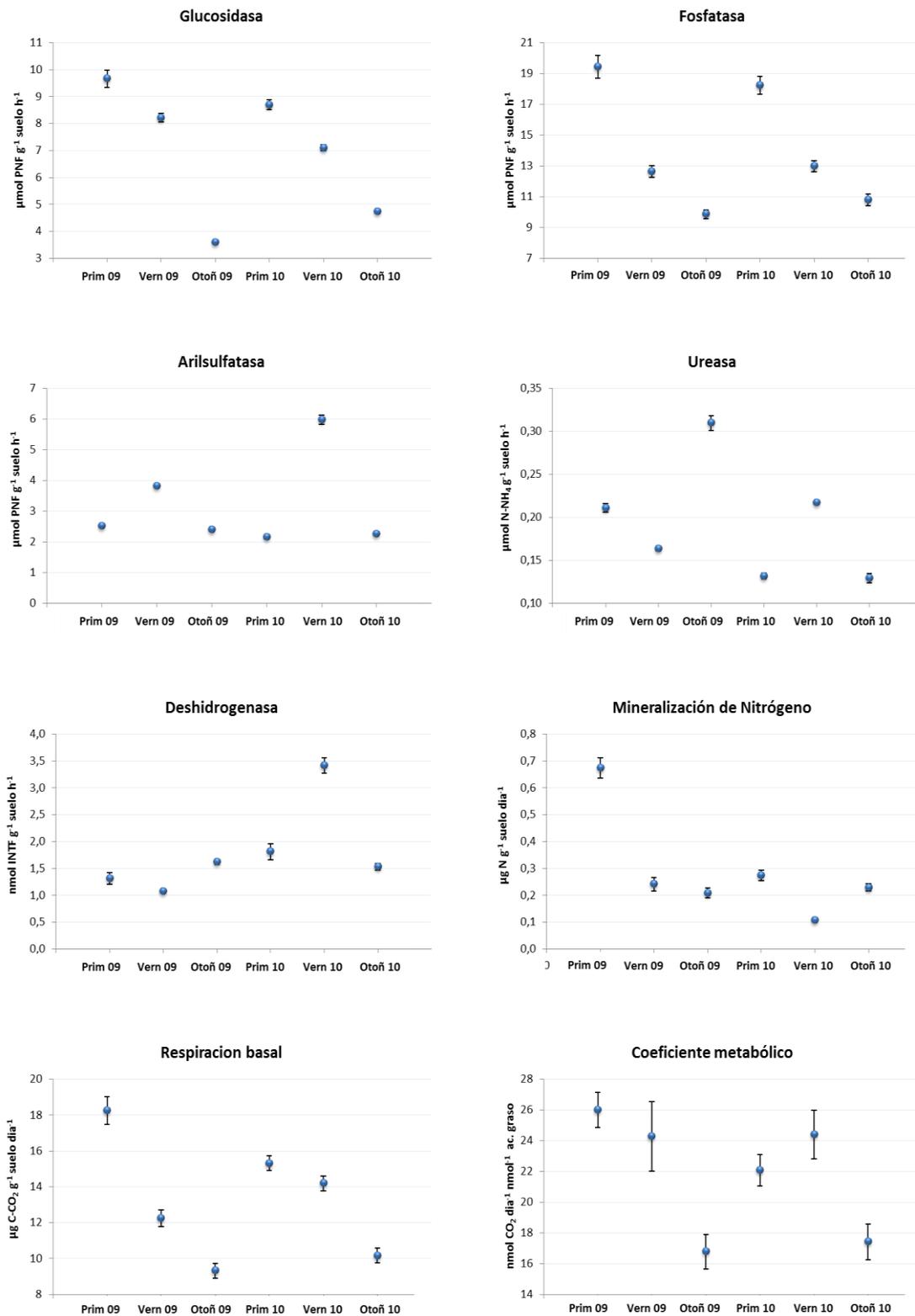


Figura 4.5. Valores de los parámetros bioquímicos en los seis muestreos sucesivos realizados. Media \pm ESM ($N=40$).

El análisis MANOVA-Biplot (Figura 4.6.) muestra una clara separación de las tres estaciones en cuanto a las propiedades bioquímicas del suelo. En la estación de primavera, los muestreos de los dos años presentan entre sí una gran similitud, mientras que en verano y otoño aparecen distinciones entre los muestreos de los años sucesivos. Basándose en el anterior análisis, así como en el análisis univariante (ANOVA) de los diferentes parámetros bioquímicos agrupados por estación, se pueden determinar qué parámetros bioquímicos contribuyen fundamentalmente a las disimilaridades debidas a la estacionalidad.

La primavera queda caracterizada por valores elevados de actividad fosfatasa y glucosidasa, de mineralización de nitrógeno y de respiración basal del suelo, todos ellos estadísticamente superiores ($p < 0,05$) a los obtenidos en las otras dos estaciones (Figura 4.7.).

El verano se caracteriza por valores altos de actividad arilsulfatasa y deshidrogenasa, que fueron estadísticamente superiores a los del resto de las estaciones (Figura 4.7.). Sin embargo, el alto valor medio de la actividad deshidrogenasa se debe en gran medida a los valores obtenidos en el verano del segundo año (2010) que, como se mencionó anteriormente (Figura 4.5.), fueron muy superiores a los obtenidos en cualquier otro muestreo y estación, y son los que contribuyen fundamentalmente a la disimilaridad observada en el gráfico MANOVA-biplot entre los dos verano estudiados. Las actividades glucosidasa y fosfatasa, y la respiración del suelo tuvieron valores intermedios con respecto a las otras estaciones, siendo estadísticamente inferiores a las de la primavera y superiores a las del otoño (Figura 4.7.). En los valores de actividad ureasa y del coeficiente metabólico (qCO_2) no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el verano y la primavera (Figura 4.7.).

Por su parte, el otoño está caracterizado por la alta actividad ureasa, superior a la de las otras estaciones; pero, al igual que sucede en verano con la actividad deshidrogenasa, aquí también influyó determinadamente uno de los dos muestreos, en el que se alcanzaron unos valores extremadamente altos en relación a cualquier otro —en este caso, en otoño de 2009 (Figura 4.5.)—. Respecto al resto de parámetros estudiados, el otoño presentó valores estadísticamente inferiores a las

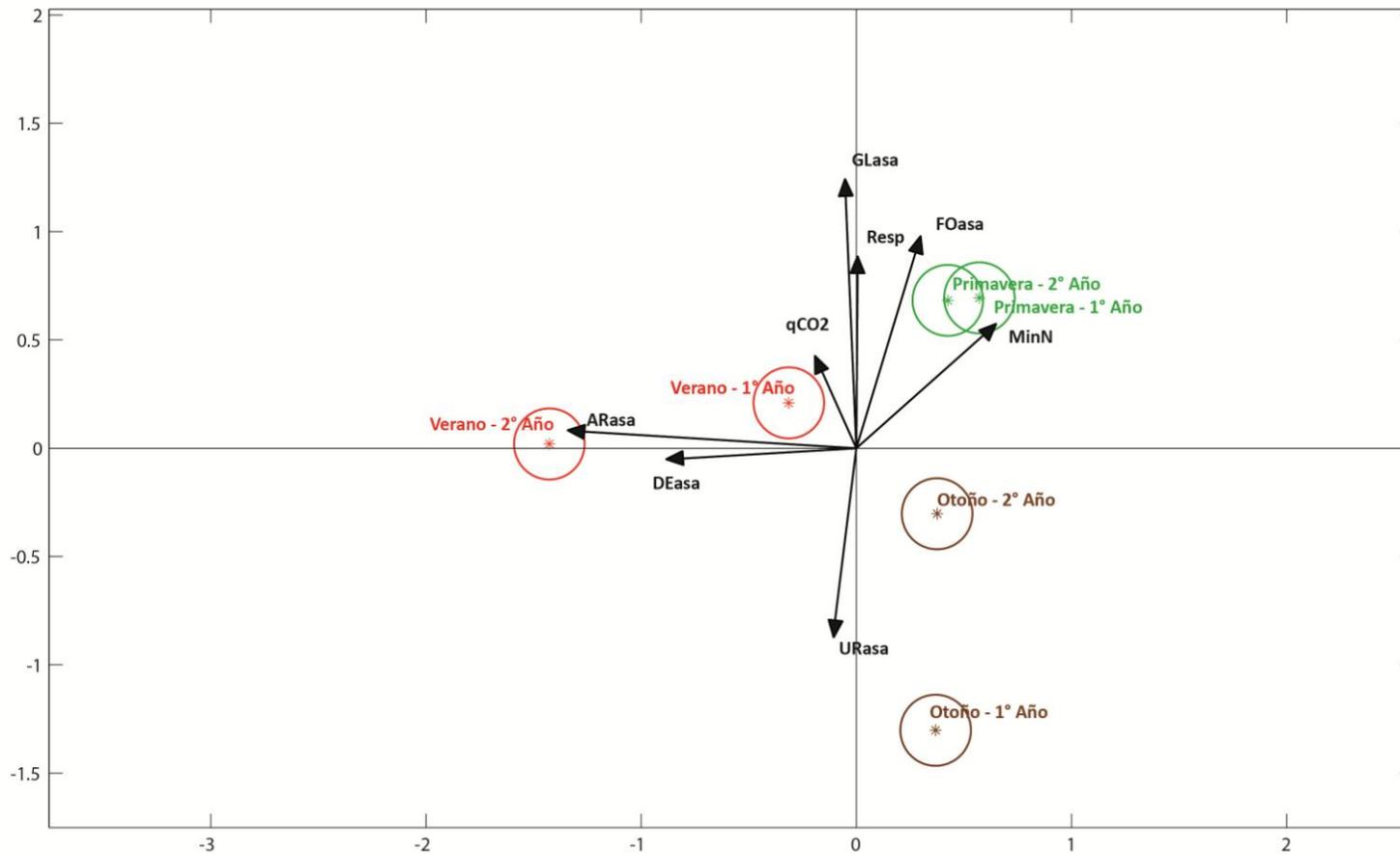


Figura 4.6. Gráfico MANOVA-Biplot mostrando las relaciones entre los parámetros bioquímicos estudiados y los muestreos realizados en primavera, verano y otoño de los años 2009 (*1º Año*) y 2010 (*2º Año*). *GLasa*, glucosidasa; *FOasa*, fosfatasa; *ARasa*, arilsulfatasa; *URasa*, ureasa; *DEasa*, deshidrogenasa; *MinN*, mineralización de nitrógeno; *Resp*, respiración basal; *qCO2*, coeficiente metabólico.

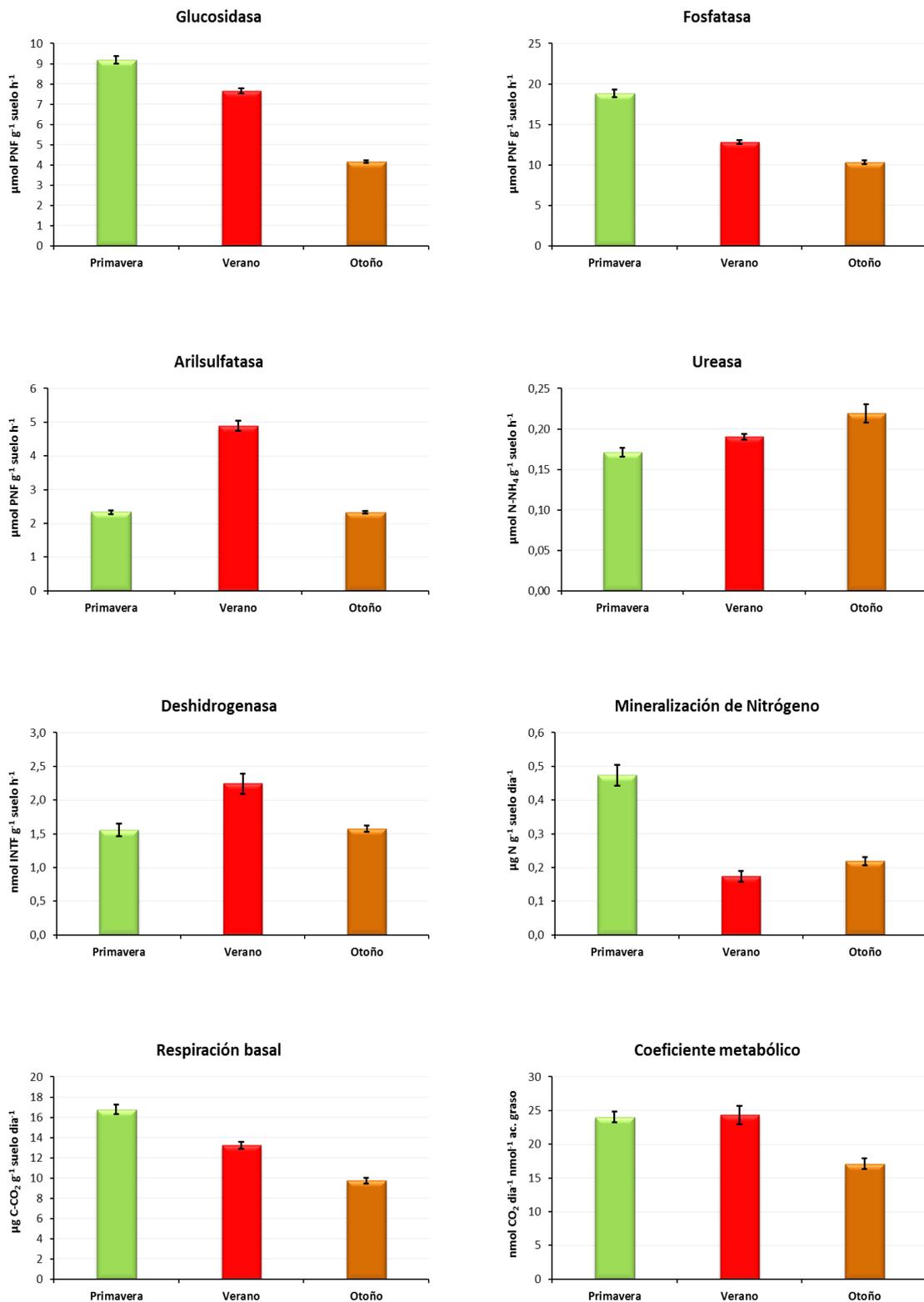


Figura 4.7. Valores de los parámetros bioquímicos en las estaciones de primavera, verano y otoño. Media \pm ESM ($N= 80$).

otras dos estaciones en las actividades fosfatasa y glucosidasa, en el qCO_2 y en la respiración basal del suelo (Figura 4.7.). Sin embargo, las actividades arilsulfatasa y deshidrogenasa en otoño no mostraron diferencias estadísticamente significativas con las de la primavera, ni la mineralización del nitrógeno con el verano (Figura 4.7.).

4.1.3. DISCUSIÓN.

El clima es uno de factores que influyen en mayor medida sobre las propiedades biológicas del suelo (Frank y Groffman, 1998; Wardle, 1998). La temperatura y la humedad afectan al tamaño, estructura y actividad de la microbiota edáfica y a las actividades bioquímicas del suelo (Insam *et al.*, 1989; McGill *et al.*, 1986; Schimel y Clein, 1996). La influencia de los factores climáticos sobre la biología del suelo puede, según ciertos autores, superar en magnitud incluso a la ejercida por el manejo (Zeller *et al.*, 2001). La temperatura, por ejemplo, puede influir sobre las actividades enzimáticas del suelo modificando tanto la cinética enzimática como la proliferación de los microorganismos que las producen (Allison y Treseder, 2008; Henry, 2012; Kang *et al.*, 2009; Trasar-Cepeda *et al.*, 2007; Wallenstein *et al.*, 2009).

No obstante, la intensidad con que los factores climáticos actúan sobre las propiedades biológicas del suelo no es homogénea para todas las regiones climáticas: en zonas áridas y semiáridas, el macroclima actúa de forma más acusada que en las regiones templadas (Parkinson y Coleman, 1991); y en zonas muy húmedas, por la lenta descomposición de la materia orgánica que se da en ellas, la relación entre los factores climáticos y los parámetros biológicos del suelo está más distorsionada (Clark y Gilmour, 1983; Insam *et al.*, 1989).

El clima mediterráneo continental se caracteriza por presentar temperaturas extremas en invierno y verano. Las precipitaciones son escasas (400-500 mm de media anual) y concentradas en las estaciones de primavera y otoño. Estas dos variables abióticas, temperatura y precipitación, condicionan fuertemente el crecimiento vegetal y el resto de procesos biológicos. Aunque en esta zona geográfica el desarrollo de la vegetación pratense está marcadamente condicionado por las precipitaciones (Vázquez de Aldana *et al.*, 2008), en nuestro ensayo las parcelas fueron irrigadas, por lo que su influencia pudo ser menos acusada que en las condiciones naturales de la región.

Dos razones fundamentales concurren en la decisión de irrigar las parcelas: en primer lugar, las necesidades hídricas de la alfalfa —cultivo que requiere un gran aporte de agua durante su periodo vegetativo— y, en segundo lugar, obtener una buena cobertura vegetal para detectar pronto las modificaciones que ésta ejerce sobre la biología del suelo. Sin embargo, aun bajo condiciones de regadío, las precipitaciones pueden ejercer una considerable influencia a través de su relación con la humedad atmosférica y la evapotranspiración. La relación entre la evapotranspiración y las precipitaciones es un factor importante en la estructuración de las comunidades vegetales a escala global y regional (Kreft y Jetz, 2007; O'Brien, 1998) y, por tanto, también lo puede ser sobre las comunidades microbianas edáficas, aunque este aspecto está aún poco estudiado (Drenovsky *et al.*, 2010).

Debido a la notable influencia de los factores climáticos sobre las propiedades biológicas del suelo, el primer análisis de los datos fue enfocado a conocer cuales son los cambios más destacables que se podrían producir por este condicionante abiótico. En el tratamiento estadístico de los datos no se consideró los tratamientos de cobertura vegetal y fertilización fosfórica que tuviesen las parcelas de las que procedían, sino el muestreo (estación y año) en que fueron tomados esos datos. Por tanto, debe tenerse en consideración a la hora de interpretar los resultados que existe una influencia subyacente de los factores experimentales aplicados, que será evaluada en otros apartados de esta memoria.

4.1.3.1. Propiedades microbiológicas.

Los datos experimentales de este trabajo indican una evolución en la biomasa microbiana total de los suelos a lo largo del tiempo (Figura 4.1.), siendo mayor en primavera que en las otras dos estaciones; y, entre los años, mayor en el segundo que en el primero.

Son muy numerosos en la literatura los trabajos que dejan patente la reducción de biomasa microbiana que se produce con condiciones de sequía y/o altas temperaturas (Bell *et al.*, 2009; Drenovsky *et al.*, 2010; Hueso *et al.*, 2012). La humedad del suelo es uno de los principales factores que controlan la supervivencia de los microorganismos y su actividad, de forma tal que los microorganismos no adaptados a las altas tensiones hídricas mueren fácilmente en condiciones de sequía (van

Meeteren *et al.*, 2008). Varias razones contribuyen al efecto negativo de la sequía sobre el tamaño de las poblaciones microbianas, como es la reducida difusión de sustratos solubles y/o la reducida movilidad de los microorganismos que, a su vez, limita aún más su acceso a esos mismos sustratos (Bastida *et al.*, 2006; van Meeteren *et al.*, 2008).

En nuestro caso, hubo una gran diferencia de precipitaciones entre los dos años a estudio, como queda reflejada en la tabla con los datos meteorológicos incluida en los Anexos. El primer año (2009) fue extremadamente seco (239,6 mm de media anual), muy por debajo en cuanto a precipitaciones de la media interanual de los diez años anteriores (389,8 mm), y de la del año 2010 (550,2 mm) que fue, por el contrario, un año extremadamente lluvioso. Por tanto, se puede interpretar que las diferencias observadas entre los años en cuanto a la biomasa microbiana total de los suelos estuvieron causadas en gran medida, si no exclusivamente, por la gran diferencia en las precipitaciones.

Entre las estaciones de verano y otoño no se registraron diferencias significativas dentro de los años (Figura 4-1), ni cuando son tratados conjuntamente los datos de ambos años (Figura 4-3). Las condiciones de temperatura y sequía en verano son, obviamente, más estrictas para los procesos biológicos que en otoño. Sin embargo, en lo relativo al crecimiento microbiano, se debe tener en cuenta que el aporte por la planta de sustratos utilizables por los microorganismos tiende a disminuir a medida que ésta ralentiza su fisiología después de la floración (Aulakh *et al.*, 2001). Por tanto, las mejores condiciones ambientales del otoño no llegan, probablemente, a compensar la limitación que supone la falta de fuentes de carbono para el desarrollo de los microorganismos.

Centrándose en la abundancia relativa de los diferentes grupos de organismos, en el caso de las actinobacterias su presencia en primavera y verano del primer año fue marcadamente inferior al resto de los muestreos. Aunque existen trabajos publicados que puntualmente encuentran una reducción en la presencia de este grupo debida al estrés hídrico (Schmitt y Glaser, 2011), no es lo frecuente, ya que las actinobacterias son conocidas por ser uno de los grupos más abundantes en suelos áridos (Zvyagintsev *et al.*, 2007) y más tolerantes a las condiciones de sequía (Doroshenko

et al., 2005). En consecuencia, en este hecho podrían estar más involucrados los factores relacionados con el componente vegetal del suelo que los condicionantes climatológicos; debido, por ejemplo, a que el suelo fuese pobre en actinobacterias y éstas aumentasen paulatinamente su presencia favorecidas por la implantación de los cultivos. De igual forma, la menor proporción relativa de hongos saprofitos en otoño de 2009 contrasta con la generalmente buena capacidad de resistir las condiciones de estrés hídrico que tiene este grupo (Bell *et al.*, 2009; Dose *et al.*, 2001), aunque en algunos ambientes extremos se han descrito reducciones en su abundancia tras prologados periodos de sequía (Clark *et al.*, 2009).

Por tanto, y según muestra el análisis MANOVA-Biplot (Figura 4-2) los contrastes mayores entre las estaciones se dan en el primer año (2009), debido a la gran diferencia de biomasa microbiana total entre la primavera y las estaciones posteriores, y a la menor abundancia relativa de hongos saprofitos. Mientras, los años se diferencian entre sí por la mayor biomasa microbiana y abundancia relativa de actinobacterias del año 2010 respecto al precedente, caracterizado por ser un año extremadamente seco.

Pero no sólo en la biomasa total y abundancia relativa de los diferentes grupos de microorganismos se dieron diferencias debidas a la estación y al año de los muestreos, sino también en la estructura de la comunidad microbiana del suelo, como lo refleja el análisis PERMANOVA realizado con los veintiún ácidos grasos seleccionados (Tabla 4.2). El análisis NMDS posterior —incluyendo los datos de las 40 parcelas experimentales en cada uno de los muestreos— refleja esta diferencia, agrupando en zonas claramente diferenciadas del gráfico los datos procedentes de uno y otro año; así como una también muestra una evolución en la estructura de la comunidad microbiana relacionada con la estacionalidad ya que, dentro de los agrupamientos de cada año, se observa un patrón de distribución horizontal correspondiente a las diferentes estaciones.

Ello está en consonancia con múltiples trabajos de diferentes autores, que vienen a demostrar que la estacionalidad produce cambios en las poblaciones microbianas a través de la temperatura y humedad del suelo (Bardgett *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2001; Steenwerth *et al.*, 2006; Zogg *et al.*, 1997), ya que estos factores abióticos

afectan diferencialmente a los distintos tipos de microorganismos (Drenovsky *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2003; Williams y Rice, 2007). A ello también contribuyen las plantas con su evolución fenológica a lo largo del ciclo vegetativo, ya que se producen cambios en el perfil de exudados radiculares (Badri *et al.*, 2008; Badri y Vivanco, 2009) que finalmente afectan, también de forma diferencial, al conjunto de microorganismos rizosféricos.

4.1.3.2. Propiedades bioquímicas.

Los resultados de este estudio concuerdan con el grueso de la bibliografía científica en la fuerte influencia que los factores climáticos tienen sobre prácticamente la generalidad de las propiedades bioquímicas del suelo. En ecosistemas mediterráneos, en particular, se han observado variaciones mensuales muy acusadas en diversas propiedades bioquímicas del suelo (Monokrousos *et al.*, 2004; Sardans *et al.*, 2008)

El análisis RDA de estos parámetros (Figura 4.6.) indica, para ambos años, que las actividades glucosidasa y fosfatasa, así como la respiración basal del suelo y la tasa de mineralización de nitrógeno fueron más elevadas en primavera que en verano y otoño. Numerosos trabajos indican el efecto adverso de las altas temperaturas y el estrés hídrico sobre todos o parte de los parámetros mencionados (Debosz *et al.*, 1999; Fioretto *et al.*, 2009; Hueso *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2009; Patrick *et al.*, 2007; Paz-Ferreiro *et al.*, 2010; Sardans *et al.*, 2008), por lo que los valores más elevados que se dan en primavera vendrían explicados por las condiciones climatológicas más benignas de esta estación, especialmente en una región con una estacionalidad tan marcada como es ésta.

El caso de la actividad arilsulfatasa en este experimento, que registró los valores más elevados en verano, contrasta con los de otros autores, que reportan valores más altos en condiciones de temperaturas moderadas y buena humedad (Li y Sarah, 2003; Paz-Ferreiro *et al.*, 2010). La actividad ureasa es frecuentemente más elevada en verano, cuando se dan condiciones de estrés hídrico y/o altas temperaturas (Hueso *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2009; Paz-Ferreiro *et al.*, 2010). En este estudio ello ocurrió en el año 2010, pero no así en el primer año, donde se dio un valor especialmente elevado en otoño (Figura 4.5.), lo que condiciona la separación observada entre los

muestreos de ambos años de acuerdo al análisis MANOVA-biplot. No obstante, en esta actividad enzimática, como en otros parámetros bioquímicos, se pueden dar altos coeficientes de variación en periodos cortos de tiempo (Debosz *et al.*, 1999; Paz-Ferreiro *et al.*, 2010; Paz-Ferreiro *et al.*, 2011), por lo que el resultado mencionado no puede considerarse completamente anómalo. Por último, la actividad deshidrogenasa fue destacadamente alta en el verano del segundo año de 2010. Esta actividad enzimática es sensible a las condiciones de sequía (Quilchano y Marañón, 2002), por lo que su alto valor en ese verano no puede explicarse por las condiciones ambientales, debiendo existir otras razones relacionadas con el componente vegetal del suelo.

4.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA COBERTURA VEGETAL Y LA FERTILIZACIÓN FOSFÓRICA SOBRE LAS PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL SUELO.

En esta sección se procederá al análisis de los efectos ejercidos por los tratamientos de cobertura vegetal y fertilización fosfórica sobre las propiedades microbiológicas, bioquímicas y químicas del suelo. Conocida la fuerte influencia que tiene la estacionalidad, especialmente en el caso de las variables bioquímicas, el estudio se realizará por estaciones, conjuntando en cada caso los datos de ambos años.

Para cada grupo de variables se realizó, mediante el paquete informático CANOCO, un análisis RDA. En su representación gráfica, los distintos niveles de los factores a estudio—tratamientos de las parcelas experimentales, en nuestro caso—vienen señalados por símbolos, situados en su valor (*score*) medio dentro del subespacio de ordenación. Las variables se representan por vectores, cuya módulo (longitud) señala la contribución de la variable en la definición de ese subespacio.

El paquete informático CANOCO permite representar la información resultante del análisis RDA de dos formas distintas: una optimizada para visualizar la correlación entre las variables, y otra optimizada para visualizar la distancia real entre los centroides dentro del subespacio de ordenación definido por las variables. En la primera, de igual forma a lo explicado para el MANOVA-biplot, la proyección perpendicular de los centroides sobre las líneas imaginarias definidas por la prolongación en ambos sentidos de los vectores indica de forma fidedigna el valor medio de la variable en ese tratamiento. Si la proyección interseca en un punto situado del origen de coordenadas hacia el sentido del vector —dirección de la flecha—, el valor medio de la variable en ese tratamiento es superior a la media general; y, recíprocamente, es menor cuando la intersección se produce en el sentido opuesto al del vector. Cuanto más alejada del origen de coordenadas esté la intersección, mayor o menor —según el sentido— será el valor de la variable. En la segunda forma de visualización, la distancia entre los centroides está en relación inversa a la similitud de los tratamientos dentro del subespacio de ordenación definido por las variables.

4.2.1. PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS.

4.2.1.1. Biomasa microbiana y abundancia relativa de los grupos microbianos.

El biplot resultante del análisis RDA de los valores en primavera de los parámetros microbiológicos de los suelos —biomasa microbiana total y abundancia relativa de los diferentes grupos de microorganismos— está representado en la figura 4.8., en su versión optimizada para visualizar las correlaciones entre las variables.

Según se observa en la figura, por el módulo (longitud) de los vectores, todas las variables microbiológicas estudiadas contribuyeron significativamente a definir el subespacio de ordenación. El eje 1 (horizontal) explica una gran parte de la variabilidad de los datos (96,6%), y está relacionado con el factor cobertura vegetal, como se aprecia por la distribución a lo largo de él de los centroides correspondientes a los cinco niveles del factor: del monocultivo de alfalfa (T5; círculos verdes, en la parte izquierda del biplot) al monocultivo de dactilo (T1; cuadrados rojos, en la parte derecha).

Dicho biplot (Figura 4.8.) muestra como la biomasa microbiana total y la abundancia relativa de hongos micorrícicos arbusculares tienden a incrementar sus valores a medida que aumenta la proporción de dactilo en los suelos; mientras que el resto de los grupos de microorganismos lo hacen cuando aumenta la proporción de alfalfa.

El monocultivo de dactilo (T1) rindió unos valores de biomasa microbiana y abundancia relativa de hongos micorrícicos arbusculares estadísticamente superiores a cualquier otro tratamiento de cobertura vegetal ($p < 0,05$). Respecto a los hongos saprofitos, el monocultivo de dactilo tuvo valores inferiores a cualquier tratamiento donde la alfalfa estuvo en igual o mayor proporción que la gramínea (T3, T4 y T5; $p < 0,05$). Para el resto de grupos microbianos, el monocultivo de dactilo siempre registró valores de abundancia relativa estadísticamente inferiores a cualquier otro tratamiento de cobertura vegetal ($p < 0,05$).

Por su parte, los suelos bajo monocultivo de alfalfa (T1) presentaron mayor abundancia relativa de hongos saprofitos y menor de hongos micorrícicos que cualquier otro tratamiento ($p < 0,05$). En ellos, las bacterias Gram positivas fueron

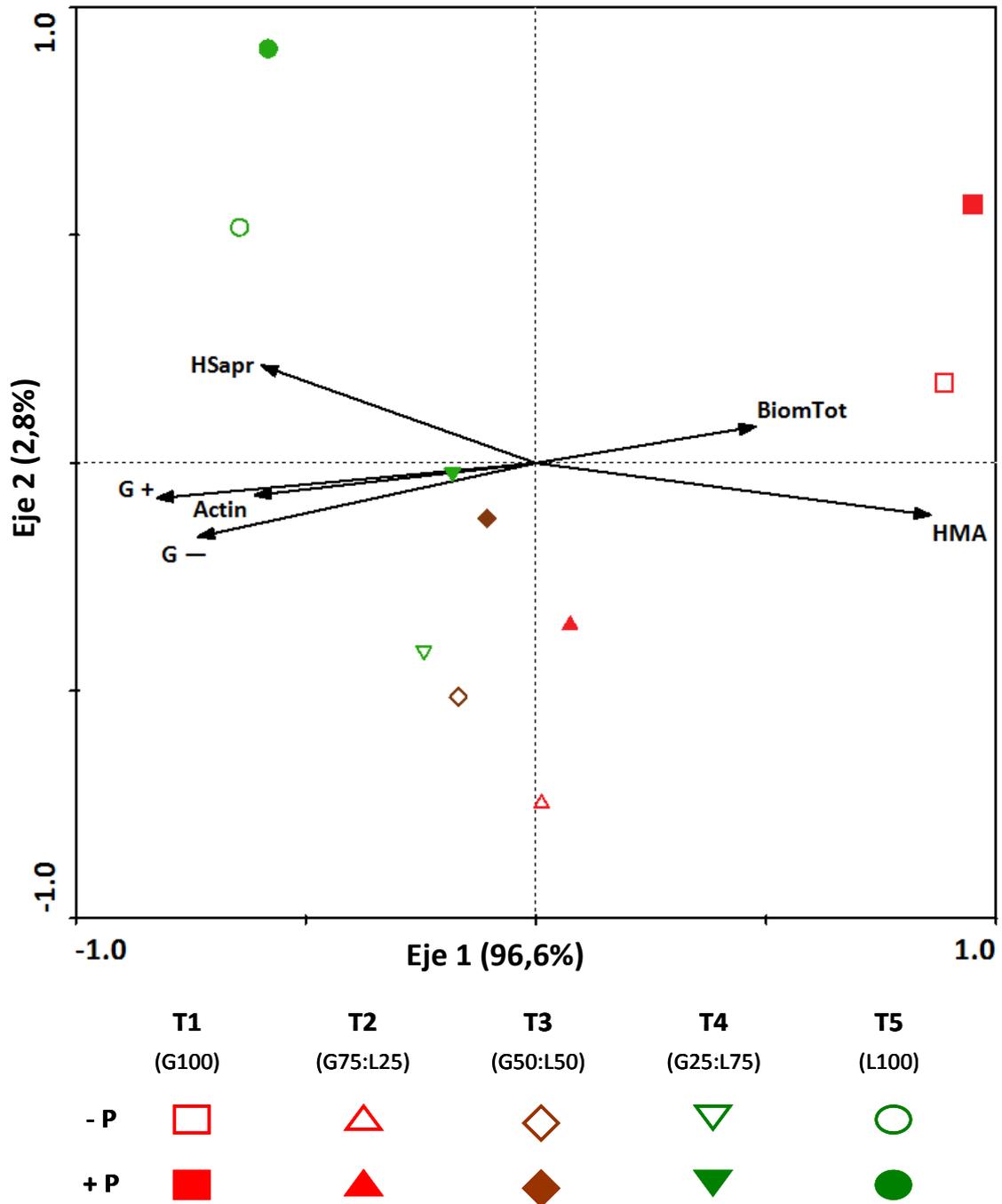


Figura 4.8. Biplot del análisis RDA de los parámetros microbiológicos registrados en la primavera de los años 2009 y 2010 ($N= 8$). *BiomM*, biomasa microbiana total; *G+*, bacterias Gram positivas; *Actin*, actinobacterias; *G-*, bacterias Gram negativas; *HSapr*, hongos saprofitos; *HMA*, hongos micorrícicos arbusculares.

más abundantes que en los suelos de siembra mixta donde la presencia de dactilo fue igual o superior a la de la alfalfa (T2 y T3) ($p < 0,05$). Por su parte, los tres cultivos mixtos (T2, T3 y T4) no mostraron entre sí diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros estudiados.

El análisis RDA de los valores de las variables microbiológicas registrados en verano indica que también es el eje 1 —relacionado con el factor cobertura vegetal— quien explica la mayor parte de la variabilidad (98,6%) (Figura 4.9.). Como se puede apreciar en el biplot, la ordenación de los centroides de los distintos tratamientos en relación a las variables estudiadas es muy similar a la obtenida en primavera. Con la salvedad de que en verano existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la abundancia relativa de actinobacterias entre el monocultivo de alfalfa (T5) y el cultivo mixto con mayor proporción de dactilo (T2; G75:L25) —en primavera no las hubo con ninguno de los cultivo mixto (T3, T4 y T5)—, el resto de parámetros muestran un comportamiento parejo en ambas estaciones.

El análisis RDA de los valores del otoño se muestra en el biplot de la figura 4.10. El eje 1 explicó prácticamente la totalidad de la variabilidad (99,0%), indicando que es el factor cobertura vegetal quien influye de manera decisiva sobre el conjunto de las propiedades microbiológicas estudiadas.

La biomasa microbiana total de los suelos y la abundancia relativa de los diferentes grupos de microorganismos siguieron, en relación al factor cobertura vegetal, las pautas generales vistas en las anteriores estaciones. En este aspecto, como diferencia con las otras estaciones, se puede reseñar que en otoño la abundancia relativa de bacterias Gram positivas y Gram negativas son ya estadísticamente superiores en el monocultivo de alfalfa (T1) que en cualquier otro tratamiento de cobertura vegetal (T1, T2, T3 y T4, $p < 0,05$). Sin embargo, la diferencia más sustancial que se presenta en otoño es debida a la influencia que ejerce el factor fertilización fosfórica sobre la abundancia relativa de actinobacterias, ya este grupo tuvo mayor presencia en los suelos fertilizados que en los privados de fósforo ($p < 0,05$).

La figura 4.11. corresponde a los biplots de los análisis RDA realizados sobre los datos registrados en las tres estaciones, pero optimizados para resaltar las distancias

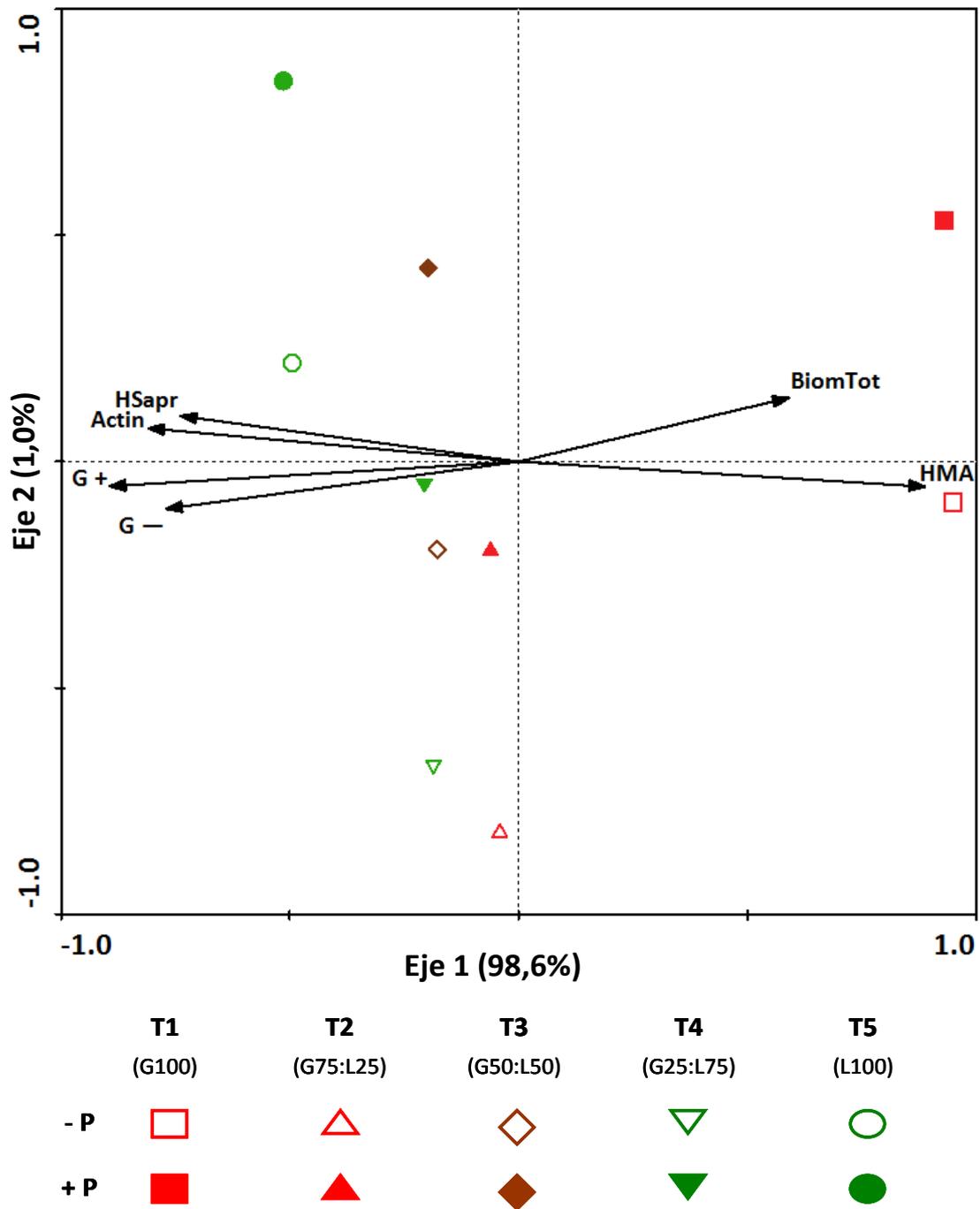


Figura 4.9. Biplot del análisis RDA de los parámetros microbiológicos registrados en el verano de los años 2009 y 2010 ($N= 8$). *BiomM*, biomasa microbiana total; *G+*, bacterias Gram positivas; *Actin*, actinobacterias; *G-*, bacterias Gram negativas; *HSapr*, hongos saprofitos; *HMA*, hongos micorrícicos arbusculares.

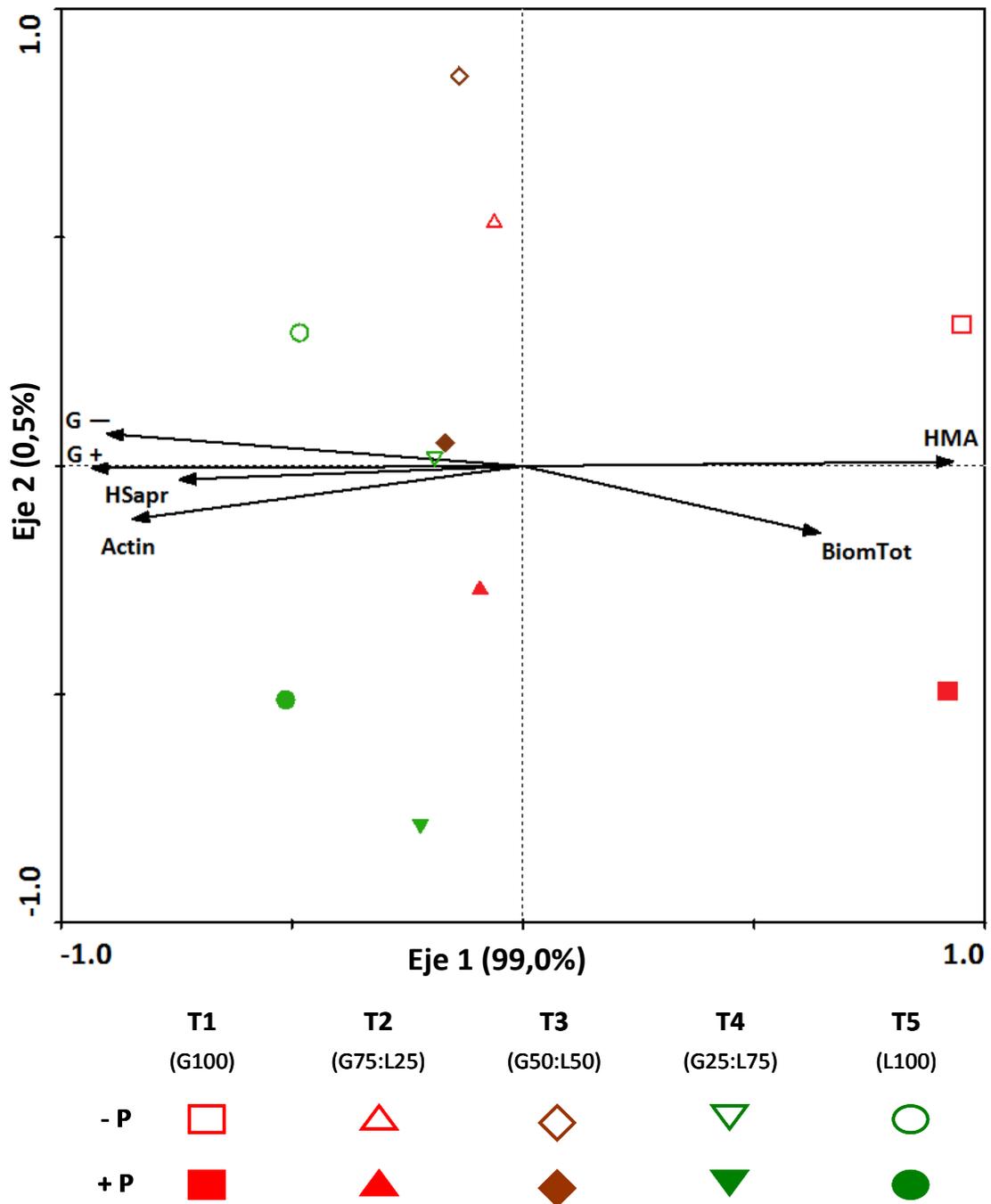


Figura 4.10. Biplot del análisis RDA de los parámetros microbiológicos registrados en el otoño de los años 2009 y 2010 ($N= 8$). *BiomM*, biomasa microbiana total; *G+*, bacterias Gram positivas; *Actin*, actinobacterias; *G-*, bacterias Gram negativas; *HSapr*, hongos saprofitos; *HMA*, hongos micorrícicos arbusculares.

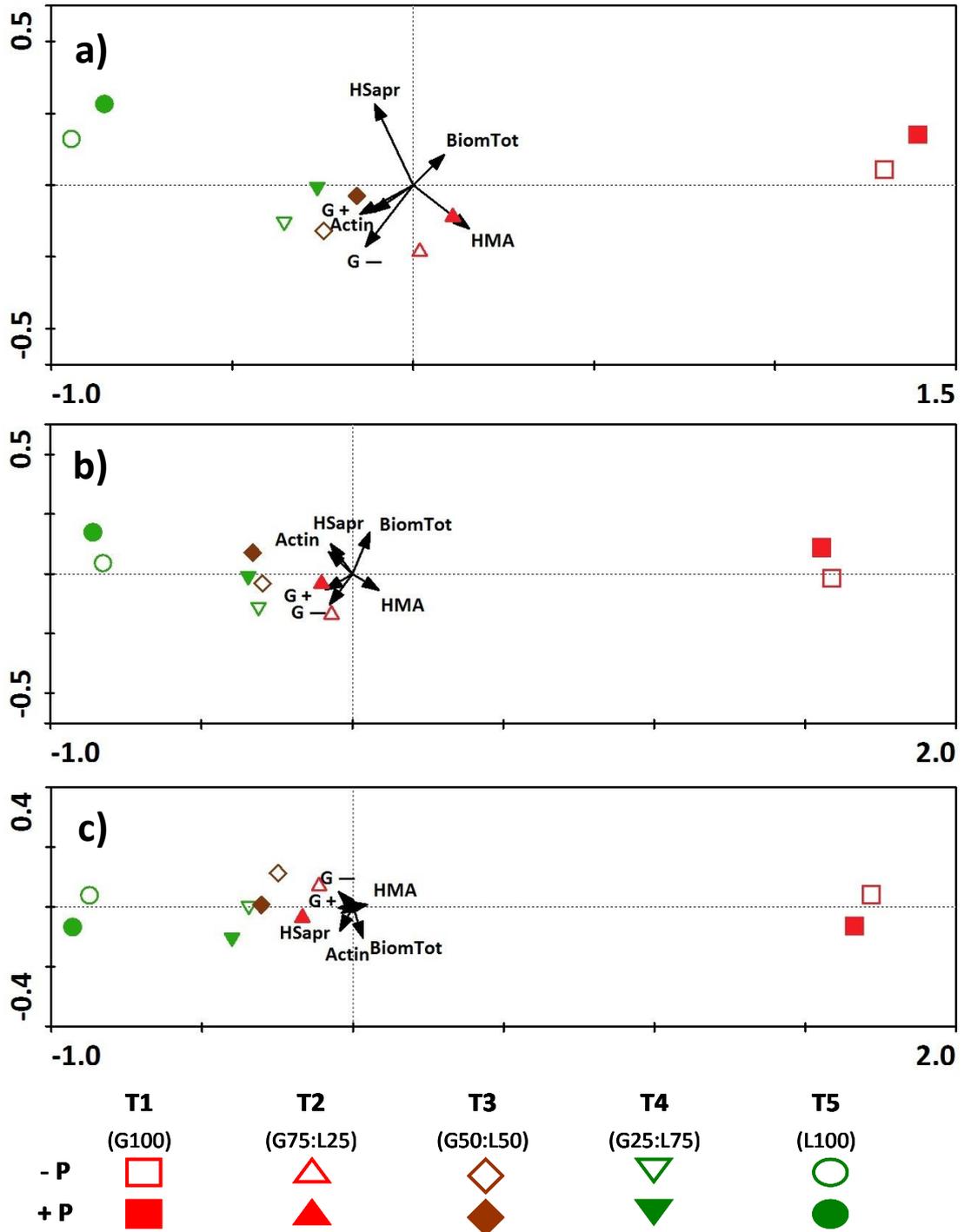


Figura 4.11. Biplot de los análisis RDA de los parámetros microbiológicos registrados en a) primavera, b) verano y c) otoño de los años 2009 y 2010, optimizado para visualizar la separación entre los centroides ($N= 8$). *BiomM*, biomasa microbiana total; *G+*, bacterias Gram positivas; *Actin*, actinobacterias; *G-*, bacterias Gram negativas; *HSapr*, hongos saprofitos; *HMA*, hongos micorrícicos arbusculares.

entre los centroides (tratamientos). Aquí se observa claramente, en las tres estaciones, la existencia de una gran separación de los monocultivos entre sí, y de éstos con los cultivos de siembra mixta. La separación está más acentuada entre el monocultivo de dactilo y los cultivos mixtos que entre éstos últimos y el monocultivo de alfalfa. Ello es debido, fundamentalmente, a la muy alta biomasa microbiana total y abundancia relativa de hongos micorrícicos que se dan en el primero. Los tres tratamientos con proporciones diferentes dactilo:alfalfa (T2, T3 y T4) presentan en sus suelos unas características microbiológicas muy similares, como lo atestigua la escasa separación entre sus centroides.

4.2.1.2. Estructura de la comunidad microbiana.

El estudio del efecto de la cobertura vegetal y la fertilización fosfórica sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo se realizó mediante tests PERMANOVA y NMDS. La tabla 4.4 resume los resultados de los tests PERMANOVA, y en la figura 4.12. están reflejados los gráficos resultantes de los análisis NMDS para cada una de las tres estaciones estudiadas.

Tabla 4.2. Resultado del análisis PERMANOVA (1.000 permutaciones) de los efectos de los factores año y estación sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo determinada por la abundancia relativa (%mol) de 21 ácidos grasos.

Factores	G.L.	SS	MS	F	R ²	Sig.
Año	1	0.006962	0.0069625	16.6073	0.06339	0.001
Estación	2	0.004351	0.0021755	5.1891	0.03961	0.001
Residuales	235	0.098522	0.0004192		0.89700	
Total	238	0.109835			1.00000	

Como queda reflejado en la tabla 4.4., el factor cobertura vegetal tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo en las tres estaciones, mientras que no lo tuvo el factor fertilización fosfórica, ni existieron interacciones significativas entre ambos factores.

Por su parte, los análisis NMDS indican, en las tres estaciones, una separación patente entre el monocultivo de dactilo (T1) y el resto de tratamientos de cobertura

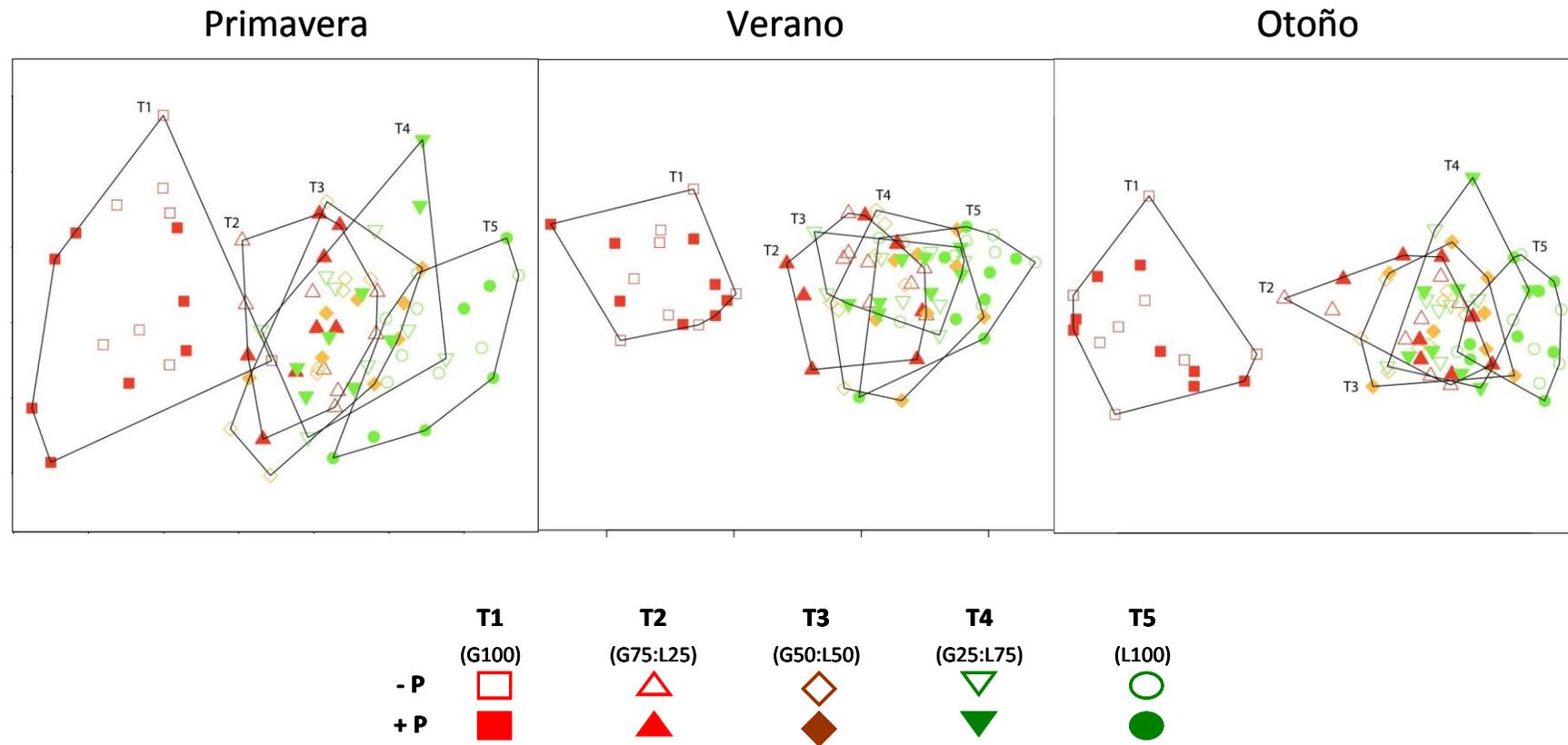


Figura 4.12. Gráfico del análisis NMDS de los perfiles de ácidos grasos de los suelos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010. Cada símbolo representa a una parcela experimental. Las líneas señalan los agrupamientos de todas las parcelas con un mismo tratamiento de cobertura vegetal.

vegetal. Sin embargo, dicha separación tiende a ser menor en primavera que en verano u otoño (Fig. 4.12.). Las parcelas con monocultivo de alfalfa (T5) ocupan la posición opuesta a las del monocultivo de dactilo, y en verano y otoño muestran extensas imbricaciones con las de los cultivos mixtos (T2, T3 y T4). Por el contrario, en primavera tienden a estar más separadas de las anteriores, no llegando a solaparse con las que tuvieron la mayor proporción de dactilo (T2; G75:L25).

Los tres tratamientos con cultivos mixtos (T2, T3 y T4) mostraron una gran similitud en la estructura de la comunidad microbiana de sus suelos de acuerdo a los agrupamientos obtenidos en los análisis NMDS, aunque sí se observó una gradación en el desplazamiento hacia las posiciones ocupadas por las parcelas bajo monocultivo de alfalfa en consonancia con la proporción de la leguminosa presente en ellos.

De acuerdo a los análisis PERMANOVA y NMDS se puede concluir que la estructura de la comunidad microbiana del suelo está marcadamente influida por el tipo de cobertura vegetal presente en el mismo, siendo el monocultivo de dactilo el que origina las diferencias más acusadas respecto al resto de tratamientos. En primavera, de acuerdo al perfil de ácidos grasos presentes en el suelo, es cuando parece producirse la mayor heterogeneidad en la comunidad microbiana edáfica.

4.2.2. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS.

El biplot resultante del análisis RDA realizado sobre las variables bioquímicas del suelo registradas en primavera está representado en la figura 4-13. Los dos primeros ejes de ordenación explicaron una parte muy considerable (82,8%) de la variabilidad presente en los datos, principalmente el eje 1, que contribuye con un 66,4%, frente al 16,4% explicado por el eje 2. El eje 1 se relaciona con el factor cobertura vegetal, como se aprecia por la distribución de los centroides correspondientes a los cinco niveles del factor a lo largo de él. Sobre el eje 2 está influyendo el factor fertilización fosfórica, situándose los centroides correspondientes a los tratamientos fertilizados en la mitad inferior del biplot, y los de los no fertilizados en la superior.

El módulo de los vectores indica que las variables con mayor poder informativo son la tasa de mineralización de nitrógeno del suelo y las actividades arilsulfatasa y deshidrogenasa, contribuyendo en mucha menor medida la respiración basal del

suelo y las actividades fosfatasa y glucosidasa; y siendo prácticamente irrelevantes en este sentido el coeficiente metabólico y, especialmente, la actividad ureasa.

La actividad arilsulfatasa definió claramente el eje 2, ya que, independientemente del tipo de cobertura vegetal que tuviesen, los suelos que no fueron fertilizados con fósforo presentaron valores superiores a aquellos a los que sí se les aplicó el macronutriente ($p < 0,000$).

La actividad deshidrogenasa y la tasa de mineralización de nitrógeno del suelo son las variables que definen principalmente el eje 1. Así, los valores de actividad deshidrogenasa tendieron a ser más elevados a medida que predominaba el dactilo en el suelo, mientras que las tasas de mineralización de nitrógeno lo hacían con la alfalfa. Los suelos bajo monocultivo de dactilo (T1) tuvieron unos valores de actividad deshidrogenasa y de mineralización de nitrógeno estadísticamente muy superiores e inferiores, respectivamente, a los del resto de tratamientos de cobertura vegetal ($p < 0,05$). Por su parte, los valores más elevados de mineralización de nitrógeno se dieron en el monocultivo de la alfalfa, aunque no fueron estadísticamente significativos respecto a los de los tratamientos con cultivos mixtos (T2, T3 y T4).

En lo relativo a la respiración basal del suelo, aquellos bajo monocultivo de dactilo y que fueron fertilizados con fósforo (T1+P) presentaron valores estadísticamente superiores al resto ($p < 0,05$). En la actividad fosfatasa se observó una ligera tendencia hacia el incremento a medida que predominaba la alfalfa y cuando se aplicó fósforo, pero no se llegaron a alcanzar diferencias significativas entre ninguno de los suelos; como tampoco en el coeficiente metabólico, que también mostró valores algo mayores cuando en el suelo predominaba la alfalfa. Sobre la actividad ureasa no se observó ningún tipo de influencia de la cobertura vegetal ni del factor fertilización fosfórica.

Como se observa en la figura 4.14a. —biplots optimizados para resaltar las distancias entre centroides—, el análisis RDA de los registros de primavera muestra una clara diferenciación de las características bioquímicas del suelo en relación con los tratamientos de cobertura vegetal y fertilización fosfórica aplicados. Los suelos bajo monocultivo de dactilo (T1) están claramente separados del resto debido,

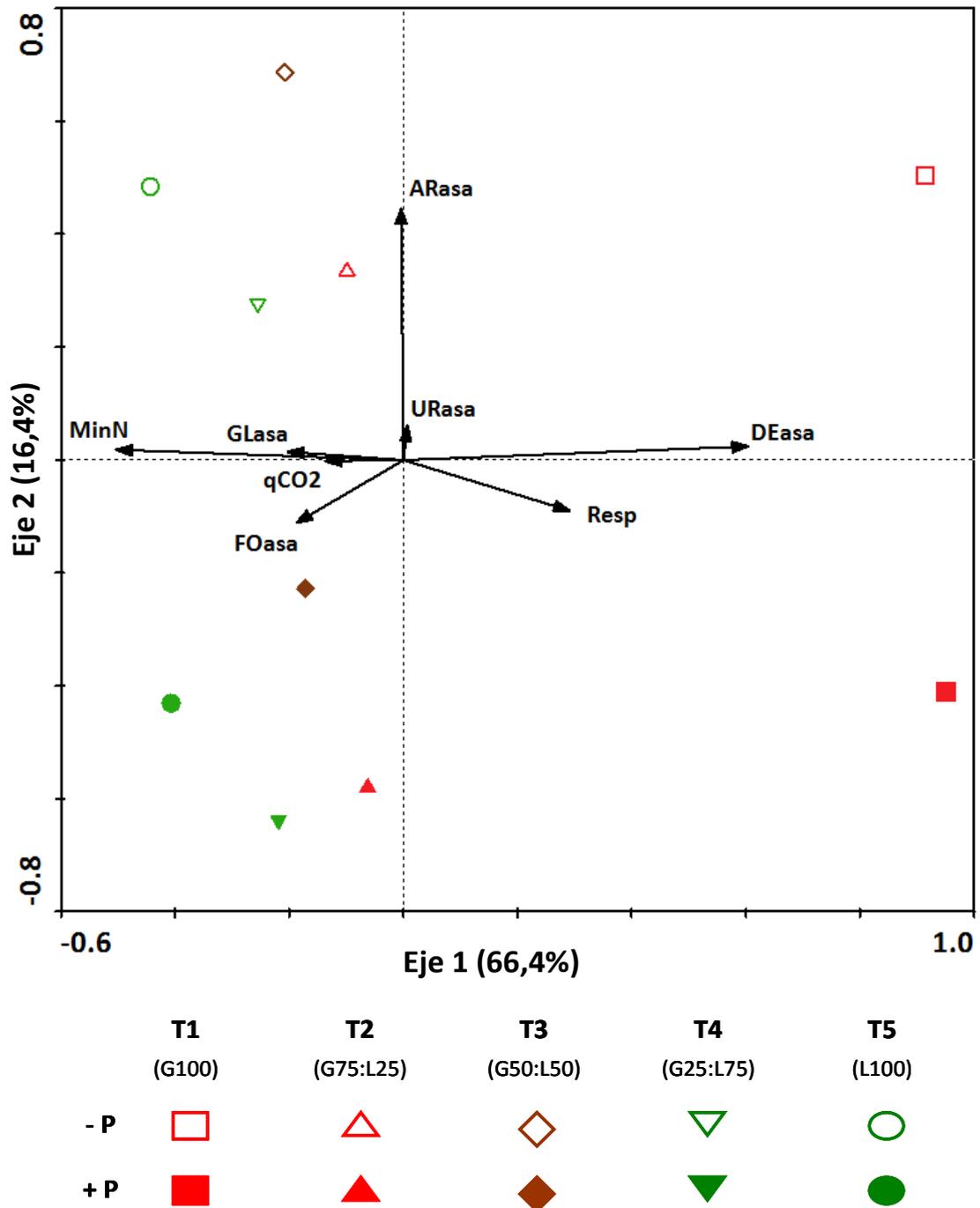


Figura 4.13. Biplot del análisis RDA de los parámetros bioquímicos registrados en la primavera de los años 2009 y 2010 ($N= 8$). *GLasa*, glucosidasa; *FOasa*, fosfatasa; *ARasa*, arilsulfatasa; *URasa*, ureasa; *DEasa*, deshidrogenasa; *MinN*, mineralización de nitrógeno; *Resp*, respiración basal; *qCO2*, coeficiente metabólico.

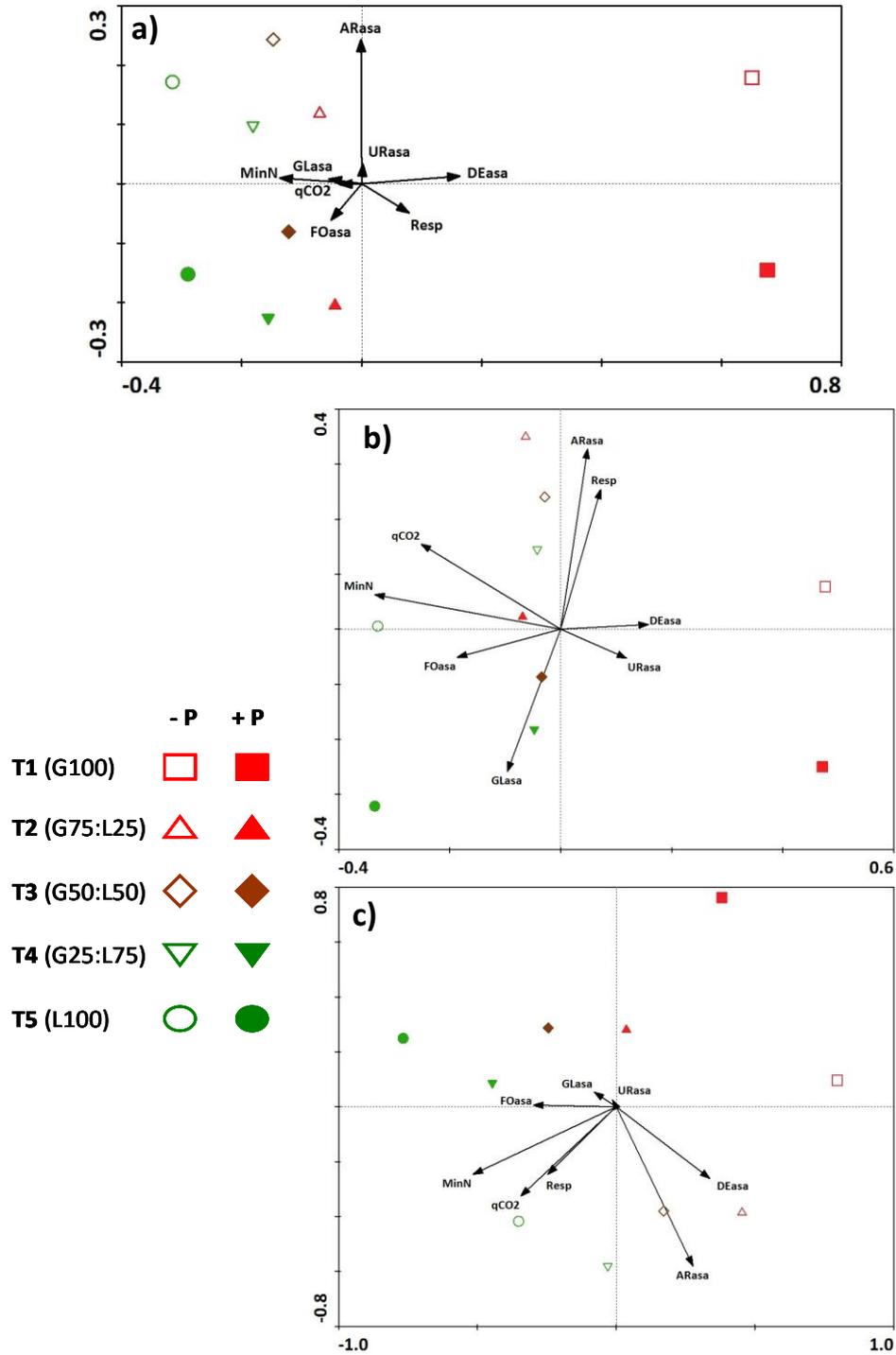


Figura 4.14. Biplots de los análisis RDA de los parámetros bioquímicos registrados en a) primavera, b) verano y c) otoño de los años 2009 y 2010, optimizados para visualizar la separación entre los centroides ($N= 8$). Abreviaturas como en la figura 4-13.

principalmente, a su mayor actividad deshidrogenasa y menor tasa de mineralización de nitrógeno. En cambio, los suelos con monocultivo de alfalfa (T5) fueron, en cuanto a sus propiedades bioquímicas, muy similares a aquellos con cultivos mixtos dactilo:alfalfa en cualquiera de sus proporciones. La fertilización fosfórica diferenció entre sí a los suelos con el mismo tratamiento de cobertura vegetal por la reducción en la actividad arilsulfatasa que se produjo cuando se aplicó el macronutriente.

El biplot resultante del análisis RDA de los registros del verano (Figura 4.15.) explica, al igual que el de primavera, un alto porcentaje de la variabilidad (80,3%), repartiéndose ese porcentaje entre un 50,1% explicado por el eje 1 y un 30,3% por el eje 2. Por el módulo de los vectores, son la actividad arilsulfatasa, el coeficiente metabólico (qCO_2) y la mineralización de nitrógeno las propiedades que fundamentalmente definen el subespacio de ordenación; aunque también la respiración basal del suelo y la actividad glucosidasa tienen una aportación destacable. A diferencia de la primavera, la actividad deshidrogenasa presentó en verano menor variabilidad.

La actividad arilsulfatasa fue superior, como en primavera, en los suelos carentes de fertilización fosfórica que en los fertilizados ($p < 0,05$), no influyendo sobre ella el factor cobertura vegetal.

La tasa de mineralización de nitrógeno fue netamente inferior y superior en los monocultivos de dactilo (T1) y de alfalfa (T5), respectivamente, que en el resto de tratamientos de cobertura vegetal ($p < 0,05$). Entre los tres cultivos mixtos (T2, T3 y T4) no se apreció ninguna diferencia estadísticamente significativa entre sus medias.

En los valores de respiración basal del suelo se apreció una tendencia a la disminución con los monocultivos de ambas plantas frente a los cultivos mixtos; y cuando se aplicó fósforo al suelo, siendo esto último especialmente notable en el monocultivo de alfalfa, donde los suelos fertilizados (T5+P) presentaron valores estadísticamente inferiores a los no fertilizados ($p < 0,05$). Por su parte, el qCO_2 siguió tendencias semejantes a la respiración basal, dándose en el monocultivo de alfalfa la misma interacción entre el factor cobertura vegetal y el factor fertilización fosfórica ($p < 0,05$).

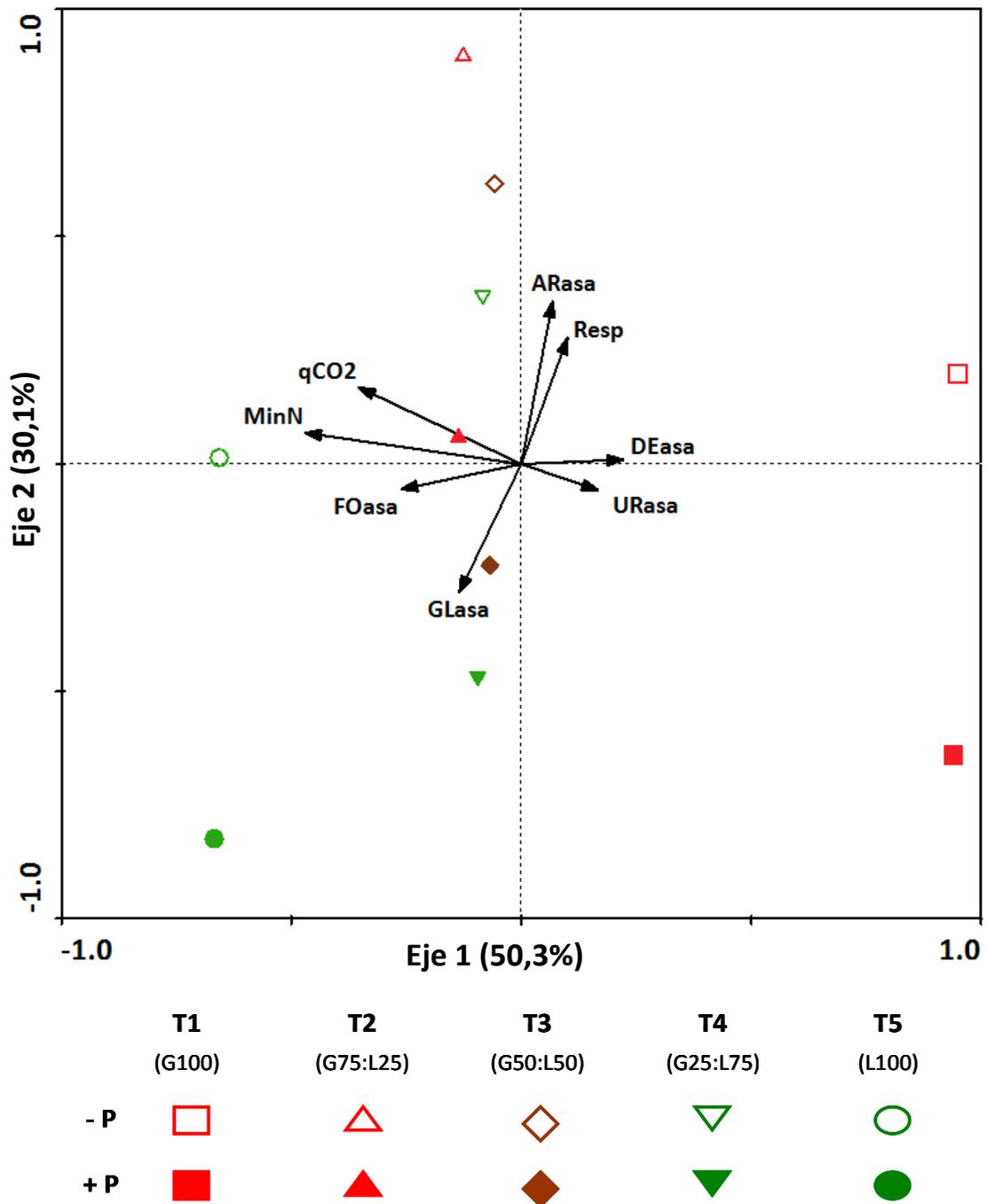


Figura 4.15. Biplot del análisis RDA de los parámetros bioquímicos registrados en el verano de los años 2009 y 2010 ($N= 8$). *GLasa*, glucosidasa; *FOasa*, fosfatasa; *ARasa*, arilsulfatasa; *URasa*, ureasa; *DEasa*, deshidrogenasa; *MinN*, mineralización de nitrógeno; *Resp*, respiración basal; *qCO2*, coeficiente metabólico.

La actividad glucosidasa, en cambio, registró valores superiores en los monocultivos de ambas especies que en los cultivos mixtos y tendió a incrementarse cuando los suelos fueron fertilizados con fósforo.

El gráfico del análisis RDA (Figura 4-14b.) muestra una clara separación entre los suelos de acuerdo a los tratamientos de cobertura vegetal y fertilización fosfórica aplicados. Los suelos con monocultivo de la gramínea (T1) se diferencian del resto fundamentalmente por su menor coeficiente metabólico (qCO_2) y capacidad mineralizadora de nitrógeno; mientras que aquellos bajo monocultivo de la leguminosa (T5) lo hacen por una mayor tasa de mineralización de nitrógeno y por un coeficiente metabólico más elevado. En los cultivos mixtos no hay diferencias destacables entre ellos debidas a los anteriores parámetros; pero, al igual que en ambos monocultivos, los suelos fertilizados con fósforo se diferencian claramente de los no fertilizados por la reducción de actividad arilsulfatasa que se produce con la aplicación del macronutriente.

El análisis RDA de los parámetros bioquímicos medidos en otoño (Figura 4-16) explica en sus dos primeros ejes la mayor parte (90,5%) de la variabilidad total presente en los datos y, en este caso, tanto el factor cobertura vegetal —eje 1, horizontal— como el factor fertilización fosfórica —eje 2, vertical— contribuyen de forma muy pareja a explicar esa variabilidad (49,8% y 40,7%, respectivamente). Por el módulo de los vectores, en otoño son también la actividad arilsulfatasa, el coeficiente metabólico (qCO_2) y la mineralización de nitrógeno las propiedades que fundamentalmente definen el subespacio de ordenación; aunque también la respiración basal del suelo y la actividad deshidrogenasa y fosfatasa contribuyen a ello en menor medida. Como en las anteriores estaciones, la actividad ureasa tuvo una aportación irrelevante.

La actividad arilsulfatasa se vio influida por la fertilización fosfórica también en otoño. Los suelos a los que se aplicó fósforo mostraron valores estadísticamente inferiores a los no fertilizados ($p < 0,05$).

La actividad fosfatasa se incrementó a medida que predominaba la alfalfa. Así, los suelos con la leguminosa en proporción superior al dactilo (T4 y T5) rindieron valores estadísticamente más altos que aquellos en los que predominó la gramínea

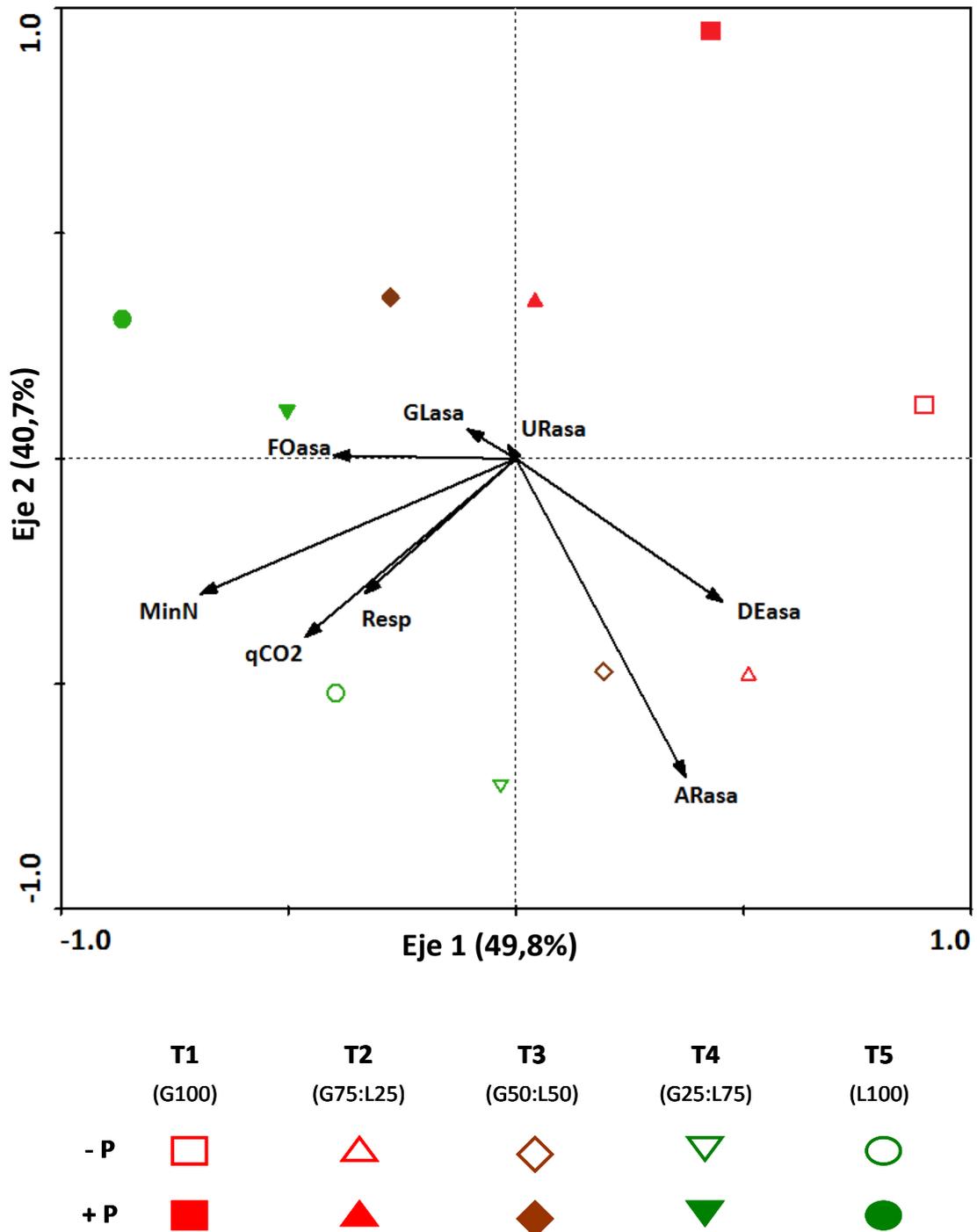


Figura 4.16. Biplot del análisis RDA de los parámetros bioquímicos registrados en el otoño de los años 2009 y 2010 ($N=8$). *GLasa*, glucosidasa; *FOasa*, fosfatasa; *ARasa*, arilsulfatasa; *URasa*, ureasa; *DEasa*, deshidrogenasa; *MinN*, mineralización de nitrógeno; *Resp*, respiración basal; *qCO₂*, coeficiente metabólico.

(T1 y T2) ($p < 0,05$). En los suelos con igual proporción de siembra de ambas especies (T3; G50:L50), se redujo considerablemente la actividad fosfatasa cuando no fueron fertilizados con fósforo, rindiendo unos valores estadísticamente inferiores a cualesquiera otros ($p < 0,05$).

La tasa de mineralización de nitrógeno aumentó también con la presencia de alfalfa, dándose los valores más altos en los tres suelos con proporciones elevadas de la leguminosa (T3, T4 y T5) ($p < 0,05$). De igual forma se comportaron la respiración basal y el $q\text{CO}_2$, incrementando sus valores a medida que lo hacía la proporción de alfalfa en el suelo. Así, el monocultivo de dactilo produjo, en estos dos últimos parámetros, valores inferiores a cualquier otro tratamiento de siembra ($p < 0,05$).

Por el contrario, la actividad deshidrogenasa disminuyó significativamente en el monocultivo de alfalfa (T5) en relación a cualquier otro tratamiento de cobertura vegetal ($p < 0,05$). La aplicación de fósforo tuvo por lo general un efecto negativo sobre los valores de actividad deshidrogenasa de los suelos.

En el biplot optimizado para mostrar la separación entre los centroides (Figura 4-14c) se observa, respecto a los de las estaciones anteriores, una mayor separación de los diferentes tratamientos a lo largo del eje 2 —nótese el diferente escalado de este eje con los biplots 4-14a y 4-14b—. Ello indica que en otoño el factor fertilización fosfórica influyó, además de en la actividad arilsulfatasa, sobre más parámetros bioquímicos que en las estaciones anteriores, como, por ejemplo, sobre la actividad deshidrogenasa. La separación entre los diferentes tratamientos de cobertura vegetal viene principalmente marcada por la respiración basal del suelo, el coeficiente metabólico y la tasa de mineralización de nitrógeno, que tienden a incrementarse con la presencia de alfalfa; y por la actividad deshidrogenasa, que lo hace con la presencia de dactilo. En otoño, la diferencia de los monocultivos con los cultivos mixtos, en el conjunto de las características bioquímicas de los suelos, es menos marcada que en las otras estaciones.

4.2.3. PARÁMETROS QUÍMICOS DEL SUELO.

Los análisis RDA de los parámetros químicos del suelo se muestran en la figura 4.17. En todos ellos no se distinguió ningún efecto de la estacionalidad, ya que siguieron las mismas pautas en las tres estaciones estudiadas.

La concentración en el suelo de fósforo asimilable fue, lógicamente, superior en los suelos fertilizados que en los no fertilizados ($p < 0,05$), sin distinguirse ningún efecto debido a los tratamientos de cobertura vegetal. Salvo a éste, la fertilización fosfórica no influyó a ningún otro parámetro de forma estadísticamente significativa.

El contenido total de carbono orgánico no se vio afectado ni por el factor cobertura vegetal, ni por el factor fertilización fosfórica. La fertilización fosfórica tampoco afectó al contenido total de nitrógeno, pero sí lo hizo el factor cobertura vegetal, ya que aumentó a medida que lo hace la proporción de alfalfa en los suelos. Entre el monocultivo de dactilo (T1) y el de alfalfa (T5) siempre existieron diferencias estadísticamente significativas; y, en otoño, también con el tratamiento de siembra mixta con mayor proporción de alfalfa (T4; G25:L75) ($p < 0,05$).

La concentración de nitrógeno amoniacal en el suelo no se vio influida por ninguno de los dos factores experimentales, pero sí la concentración de nitrato por el factor cobertura vegetal, incrementándose con la presencia de alfalfa. La concentración de nitrato en los suelos bajo monocultivo de dactilo (T1) fue siempre muy inferior a la del resto de tratamientos; y en primavera, en el monocultivo de alfalfa (T5) se dio una concentración estadísticamente superior a la presente en los suelos de tres cultivos mixtos (T2, T3, y T4) ($p < 0,05$), para después desaparecer en verano y otoño. Entre los cultivos mixtos no hubo diferencias significativas respecto a la concentración de nitrato de sus suelos.

Por último, el pH del suelo fue en todo momento más alcalino en el monocultivo de dactilo (T1) que en el resto de tratamientos de cobertura vegetal ($p < 0,05$), tendiendo hacia la acidificación a medida que aumentaba la proporción de alfalfa en el suelo, pero sin alcanzarse nunca diferencias estadísticamente significativas entre el monocultivo de la leguminosa (T5) y los tres cultivos mixtos (T2, T3 y T4).

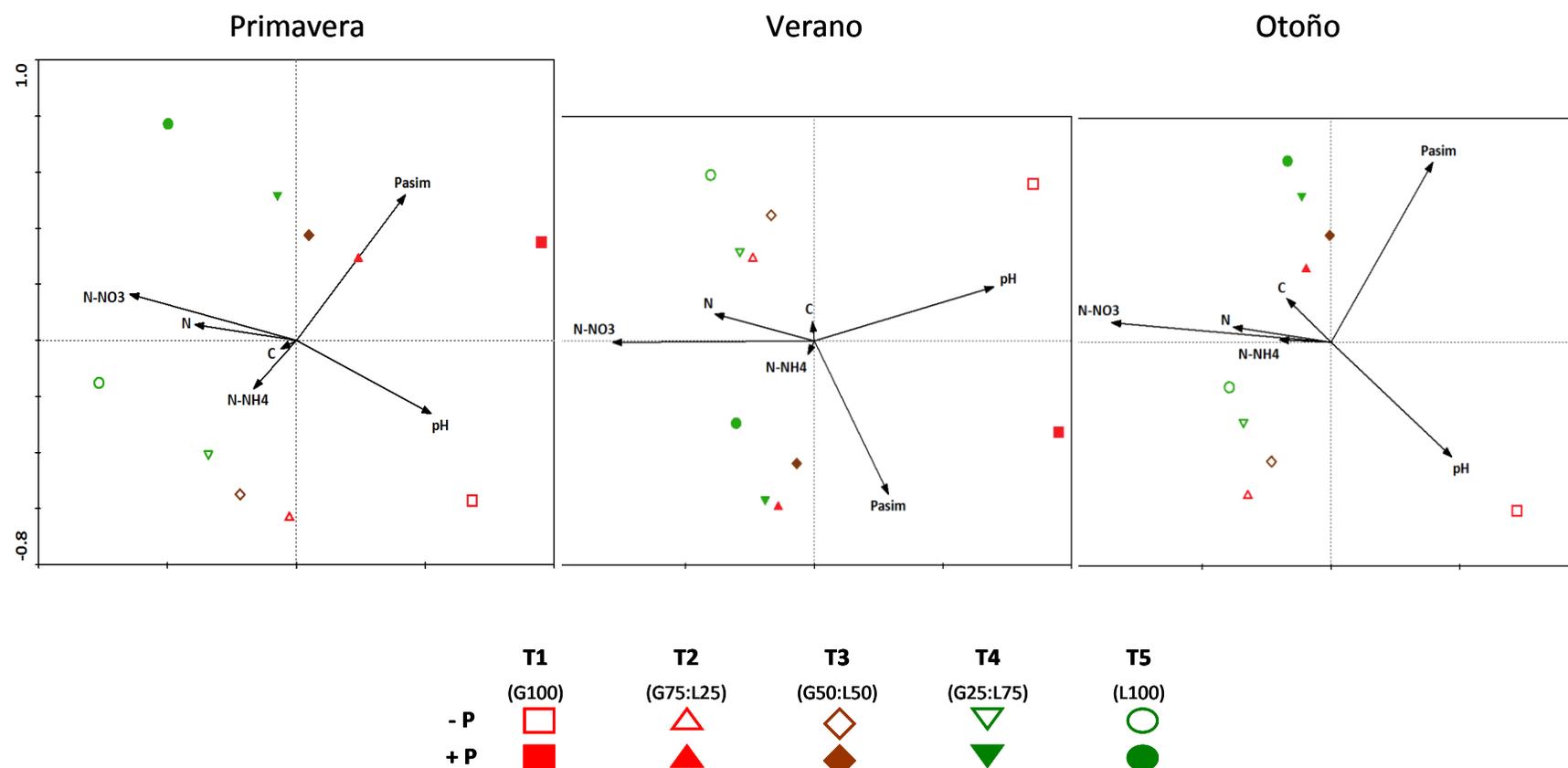


Figura 4.17. Biplots de los análisis RDA de los parámetros químicos del suelo registrados en la primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, optimizados para visualizar la correlación entre las variables ($N= 8$). *C*, carbono total; *N*, nitrógeno total; *Pasim*, fósforo asimilable; *N-NO3*, nitrato; *N-NH4*, nitrógeno amoniacal; *pH*, pH (en H_2O).

4.2.4. DISCUSIÓN.

4.2.4.1. Propiedades microbiológicas.

Las comunidades rizosféricas se establecen, lógicamente, a partir de los microorganismos que previamente habitan el suelo, y éstos difieren entre regiones geográficas y tipos de suelo (Hartmann *et al.*, 2009). Por tanto, en la interpretación de los resultados de este tipo de estudios debe tenerse en cuenta el poderoso papel que, además de las condiciones climáticas, tienen los condicionantes abióticos del suelo sobre la abundancia y estructura de las comunidades microbianas, lo que supone siempre una limitación para la extrapolación y generalización de resultados (Fierer y Jackson, 2006; Garbeva *et al.*, 2004; Hinsinger *et al.*, 2009; Tamames *et al.*, 2010).

Los análisis RDA realizados sobre la biomasa microbiana total y la abundancia relativa de los diversos grupos de microorganismos (Figuras 4.8., 4.9. y 4.10.) indican que es el factor cobertura vegetal el que define fundamentalmente el comportamiento de esos parámetros, ya que el eje 1 —el asociado a este factor—, explica prácticamente la totalidad de la variabilidad en las tres estaciones.

En las tres estaciones se dan los mismos patrones con relación al factor cobertura vegetal. La biomasa microbiana total del suelo fue siempre superior en el monocultivo de dactilo (T1) que en los otros tratamientos, como también lo fue la abundancia relativa de hongos micorrícicos arbusculares. Por el contrario, para el resto de grupos microbianos las menores abundancias relativas se dieron en el monocultivo de la gramínea. Los hongos saprofitos, las bacterias Gram positivas y negativas, y las actinobacterias tienden a aumentar su presencia cuando lo hace la proporción de alfalfa en el suelo. El factor fertilización fosfórica no tuvo ninguna influencia sobre este conjunto de parámetros, salvo en la abundancia relativa de actinobacterias en la estación de otoño, que fue más elevada cuando se aplicó fósforo al suelo.

Se considera que las leguminosas tienen un efecto positivo sobre la biomasa microbiana del suelo superior a otros grupos funcionales, como las gramíneas, debido a la mayor calidad (menor razón C/N) de sus tejidos como fuente de carbono para el crecimiento microbiano (Bartelt-Ryser *et al.*, 2005; Scherer-Lorenzen *et al.*, 2003;

Truu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Así, en experimentos de invernadero con distintas mezclas de gramíneas (*Sorghum sudanense* y *Festuca arundinacea*) y leguminosas (*Trifolium repens* y *Medicago sativa*), donde se muestreó todo el suelo rizosférico de las macetas, la biomasa microbiana total fue mayor en los monocultivos de las leguminosas, o donde éstas entraban a formar parte de las mezclas, que en los monocultivos de las gramíneas (Chen *et al.*, 2008a). Similares resultados se obtuvieron en un ensayo de campo en China, donde se establecieron cultivos mixtos de alfalfa y la gramínea *Elymus sibiricus* L., muestreándose también aquí todo el suelo rizosférico de plantas individualizadas (Sun *et al.*, 2009).

Sin embargo, en nuestro ensayo fue el monocultivo de dactilo el que rindió consistentemente una mayor biomasa microbiana. En ello probablemente tiene influencia la densidad radicular del dactilo frente a la alfalfa en los primeros 10 centímetros de profundidad —los muestreados—. El dactilo, como gramínea, tiene una raíz fasciculada que concentra la mayor parte de su biomasa en la zona superficial del suelo, mientras que la alfalfa, por su raíz pivotante, lo hace en zonas más profundas. Por tanto, dado que es en el suelo rizosférico donde se produce en mayor medida el crecimiento de los microorganismos, es muy probable que la mayor biomasa microbiana observada en el monocultivo de la gramínea sea mera consecuencia de una mayor densidad radicular a la profundidad muestreada. Esto ha sido descrito en un suelo donde creció *D. glomerata*, observándose en él un descenso considerable de la biomasa microbiana por encima de los 10 centímetros de profundidad (van Eekeren *et al.*, 2010). Si considerásemos que el dactilo y la alfalfa tuvieron tasas de micorrización equivalentes —hecho desconocido al no haberse determinado este parámetro— el mismo razonamiento podría ser aplicado a la alta abundancia relativa de hongos micorrícicos arbusculares detectada en el monocultivo de dactilo, ya que su mayor densidad radicular en los primeros centímetros del suelo supondría también una mayor densidad de hifas de estos hongos.

El incremento de la abundancia relativa de bacterias Gram positivas y negativas, de hongos saprofitos y de actinobacterias con la presencia de alfalfa que se detectó en este experimento guarda relación con lo documentado por otros autores en ensayos con cultivos mixtos de gramíneas y leguminosas (Chen *et al.*, 2008a; Sun *et al.*, 2009).

Un hecho notable fue el incremento de actinobacterias a medida que aumentaba la proporción de alfalfa en el suelo, siendo en el monocultivo de la alfalfa (T1) superior a la encontrada en los tratamientos con predominio de dactilo. Este hecho puede guardar relación con trabajos muy recientes indicando la frecuente presencia de actinomicetos como endofitos de los nódulos de las leguminosas (Carro *et al.*, 2012; Trujillo *et al.*, 2010). En el caso concreto de la alfalfa, se ha demostrado que las actinobacterias favorecen la nodulación de la planta en condiciones de alta disponibilidad de nitrógeno (Solans *et al.*, 2009). Estas interacciones positivas entre la alfalfa y este grupo de bacterias pueden favorecer su proliferación en la rizosfera de la planta, incrementándose su presencia con el paso del tiempo. Ello estaría en concordancia con la baja abundancia relativa de estas bacterias que se dio en los dos primeros muestreos y su aumento paulatino posterior. El hecho de que sea el único grupo que se vea afectado positivamente por la fertilización fosfórica se ha visto en otros ecosistemas de pastos (Mander *et al.*, 2012). La nula influencia de la fertilización fosfórica sobre la biomasa microbiana total y la abundancia relativa de los otros grupos estudiados se ha descrito también por otros autores (Beauregard *et al.*, 2010). No obstante, la respuesta global de la comunidad microbiana a la fertilización fosfórica está poco documentada, ya que la mayoría de los estudios se han enfocado sobre la fertilización nitrogenada u orgánica (Hinsinger *et al.*, 2011).

El análisis PERMANOVA (Tabla 4.4) con el conjunto de los 21 ácidos grasos indica la existencia de un claro efecto del factor cobertura vegetal en la estructura de la comunidad microbiana en todas las estaciones, pero ninguno de la fertilización fosfórica. El hecho de que no existiesen cambios generalizados ni en la biomasa microbiana, ni en la abundancia relativa de la mayoría de los grupos de microorganismos, ni tampoco en la estructura de la comunidad microbiana indica que ésta, en general, estaba bien adaptada a los niveles de fósforo impuestos por el tratamiento sin fertilización.

El análisis NMDS de esos mismos datos (Figura 4.12) muestra la existencia de una clara diferenciación entre el monocultivo del dactilo (T1), agrupando todas sus parcelas en la parte izquierda del gráfico, y aquellos con presencia de alfalfa, en la derecha. Las parcelas correspondientes al cultivo mixto con mayor presencia de dactilo (T2; L75:G25) están más cercana a las que tienen mayor preponderancia de

alfalfa que al propio monocultivo de dactilo. Ello indica que la leguminosa tiene un efecto dominante sobre la composición de la comunidad microbiana y, por tanto, puede considerarse como el elemento clave con respecto a las interacciones que se establecen con la microbiota de este suelo. Una influencia similar se ha descrito entre otras especies de gramíneas y leguminosas en experimentos de invernadero (Chen *et al.*, 2008a). Sin embargo, como se señaló anteriormente, estos resultados no son generalizables, ya que en otras condiciones y con otras plantas, como el maíz y el haba, no se ha observado tal efecto (Fan *et al.*, 2011).

4.2.4.2. Propiedades bioquímicas.

Los análisis RDA (Figuras 4.13., 4.15. y 4.16.) y ANOVAS realizados sobre los valores de los parámetros bioquímicos del suelo alcanzados en las tres estaciones muestran unas pautas comunes en la mineralización de nitrógeno, y las actividades arilsulfatasa y ureasa. La mineralización de nitrógeno fue más elevada en los tratamientos con inclusión de alfalfa, aun en su menor proporción (T2; G75:L25), que en el monocultivo de dactilo. La actividad arilsulfatasa disminuyó con la fertilización fosfórica, y sobre ella no tuvo influencia el factor cobertura vegetal. En el caso de la actividad ureasa, está no se vio afectada ni por el factor cobertura vegetal ni por el factor fertilización fosfórica a lo largo del experimento. La actividad glucosidasa, en general, tampoco fue afectada por los factores experimentales; aunque en verano sí mostraron alguna influencia, pero sin llegar a ser estadísticamente significativa.

La actividad fosfatasa y deshidrogenasa, la respiración basal del suelo y el coeficiente metabólico resultaron afectados de forma variable por los factores experimentales, según las estaciones.

La inclusión de alfalfa incrementó sustancialmente la tasa de mineralización de nitrógeno sobre la presentada por el cultivo de dactilo. Las referencias en la bibliografía científica sobre los efectos positivos de las leguminosas en la tasa de mineralización de nitrógeno del suelo y en la elevación de su contenido en nitrógeno inorgánico son numerosísimas. Como ejemplo, en un suelo de textura similar al nuestro (arcillosa) y otro arenoso, en Kansas (EE.UU.), se ensayaron las mezcla de alfalfa o trébol violeta con la gramínea *Tripsacum dactyloides* (Gil y Fick, 2001),

produciéndose siempre en el suelo arcilloso tasas de mineralización de nitrógeno muy superiores en los monocultivos de las leguminosas y en los cultivos mixtos que las obtenidas en los monocultivos de la gramínea. Sin embargo, en la segunda temporada de los cultivos, sólo rindió tasas mayores de mineralización de nitrógeno el monocultivo de alfalfa. Otros autores describen el mismo efecto en mezclas múltiples de gramíneas y leguminosas (Harrison y Bardgett, 2010). La baja relación C/N de los tejidos de las leguminosas, y el elevado aporte de nutrientes al suelo mediante sus exudados explican porqué la mineralización del nitrógeno es alta en los suelos donde están presentes (Jensen *et al.*, 2010). En nuestro estudio también se observa el elevado contenido en nitrógeno asimilable (nitrato, fundamentalmente) que se produce con la presencia de alfalfa (Figura 4-17)

La actividad arilsulfatasa fue consistentemente más reducida en todos los tratamientos de cobertura vegetal fertilizados con fósforo, que en aquellos privados del macronutriente. Este hecho, según nuestro conocimiento, no ha sido descrito en la literatura científica hasta la fecha. Según algunos autores (Speir y Ross, 1978), la actividad arilsulfatasa está débilmente correlacionada con las otras actividades enzimáticas, lo que aparentemente supone una falta de acoplamiento entre el ciclo del azufre y los ciclos del resto de nutrientes principales. En un estudio realizado en suelos forestales de la región (Salazar *et al.*, 2011), se comprobó recientemente la independencia mencionada para la actividad arilsulfatasa. Según el resultado de este estudio, sí que podría existir una relación entre el ciclo del azufre y el del fósforo, al menos en las condiciones particulares del suelo donde se realizó.

Ni el factor cobertura vegetal, ni el factor fertilización fosfórica mostraron efectos significativos sobre la actividad ureasa. La presencia de leguminosas en el suelo, por su capacidad de enriquecer el suelo en nitrógeno, tiende a disminuir los valores de actividad ureasa (Guo *et al.*, 2009). Pero de igual forma se ha descrito el efecto contrario, donde la presencia de alfalfa incrementa la actividad ureasa cuando crece en cultivo mixto con gramíneas u otras plantas (Stark *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2007). La fertilización, incluyendo fósforo, también ha mostrado efectos opuesto sobre esta actividad enzimática (Guo *et al.*, 2009). Por tanto, los resultados obtenidos en este experimento, donde no se da un efecto apreciable de ninguno de los dos factores se podría atribuir a que la fertilización basal aplicada a todas las parcelas

(nitrosulfato amónico, 26%N) supuso una dosis suficiente de nitrógeno, haciendo innecesaria la producción de esta enzima por los microorganismos del suelo. También debe tenerse en cuenta que la ureasa extracelular puede adquirir una gran estabilidad mediante adsorción a los complejos organo-minerales, por lo que puede requerir más tiempo detectar los cambios en esta actividad enzimática debidos al manejo del suelo (Burns, 1986; Nannipieri *et al.*, 1978).

En el caso de la actividad glucosidasa tampoco hubo una incidencia importante de los factores cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Entre las influencias descritas para la actividad glucosidasa, quizás la principal sea el contenido de carbono del suelo, que se correlaciona positivamente con ella (Eivazi y Tabatabai, 1988; Paz-Ferreiro *et al.*, 2009, 2010). En concordancia con esto, en suelos forestales de nuestra región se comprobó que la actividad glucosidasa está positivamente correlacionada con el carbono orgánico del suelo, pero no con el contenido de fósforo asimilable (Salazar *et al.*, 2011). En el suelo de nuestras parcelas experimentales, la variación del contenido de carbono entre los tratamientos de cobertura vegetal y fertilización fosfórica no presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa (Figura 4.17.), por lo que es plausible que a ello se debiese la ausencia de efectos significativos de ambos factores experimentales sobre la actividad glucosidasa.

La actividad fosfatasa fue, en otoño (Figura 4.16.), superior en el monocultivo de alfalfa que en los dos cultivos con más alta proporción de dactilo (T1, monocultivo; y T2, G75:L25). El nitrógeno asimilable del suelo es un regulador importante en la producción de fosfatasas, ya que la biosíntesis de estas enzimas requiere un sustancial aporte de nitrógeno (Olander y Vitousek, 2000). Por el contrario, la fertilización fosfórica reduce por lo general su producción por las plantas y los microorganismos, ya que su biosíntesis es costosa energéticamente (Marklein y Houlton, 2012) e innecesaria, lógicamente, cuando hay fósforo disponible en el suelo. Por tanto, los mayores niveles de nitrógeno asimilable que se alcanzan en el monocultivo de la alfalfa en comparación con los suelos donde predomina el dactilo podrían justificar su mayor actividad fosfatasa. Así, por ejemplo, se ha descrito el mismo fenómeno en monocultivos y cultivos mixtos de alfalfa y la gramínea *Elymus sibiricus* (Sun *et al.*, 2009).

La actividad deshidrogenasa fue en primavera mayor en el monocultivo de dactilo (T1) que en cualquier otro (Figura 4.13); con la misma tendencia en verano, aunque sin llegarse a dar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos; y, en cambio, fue muy reducida en otoño en el monocultivo de la leguminosa (T5). La actividad deshidrogenasa es un indicador de los sistemas redox biológicos y puede ser tomada como un indicador general de la intensidad del metabolismo microbiano en el suelo (Tabatabai, 1982). La mayor biomasa microbiana encontrada en los suelos bajo monocultivo de dactilo (Figura 4.8) y su buena actividad metabólica — esperable en primavera por las adecuadas condiciones climatológicas— explican porqué son más elevados los niveles de actividad deshidrogenasa en ese tratamiento. En verano, sin embargo, la actividad metabólica de los microorganismos se ve drásticamente reducida por las condiciones climatológicas extremas y, por tanto, la diferencia que pudiera deberse a una mera mayor biomasa queda más reducida. Por ello, aunque sigue siendo mayor la actividad deshidrogenasa en el monocultivo de dactilo, no llega a una diferencia estadísticamente significativa con los otros tratamientos (Figura 4.15). En otoño, la menor actividad deshidrogenasa se observó en el monocultivo de alfalfa (T5), y la fertilización fosfórica disminuyó significativamente sus valores en los cultivos mixtos T2 y T4. La disminución de la actividad deshidrogenasa con la aplicación de fósforo ha sido documentada por otros autores (Beauregard *et al.*, 2010), pero la razón por la se produce en esos tratamientos concretos no puede por el momento conocida.

En la respiración basal del suelo se produjo una diferencia significativa entre los suelos con monocultivo de dactilo y fertilizados con fósforo (T1+P) y los del resto de los tratamientos, que presentaron valores menores. En verano se dieron los valores más altos en los cultivos mixtos; y en otoño la máxima respiración basal se dio en el monocultivo de alfalfa (T5). Existe una buena correlación entre la actividad deshidrogenasa y la respiración del suelo (von Mersi y Schinner, 1991) ya que, aunque no tienen una significación idéntica, ambas reflejan la biomasa microbiana del suelo. Por tanto, la razón aplicable para el caso de la actividad deshidrogenasa en primavera es pertinente también aquí. El caso del verano, donde los cultivos mixtos presentan valores ligeramente mayores que los monocultivos, guarda relación con lo observado por otros autores, donde la composición mixta de la vegetación

(Moscatelli *et al.*, 2007) o la inclusión de leguminosas en las rotaciones (Truu *et al.*, 2008) incrementan la tasa de respiración del suelo.

El monocultivo de alfalfa fue en otoño el que presentó las mayores tasas de respiración del suelo, así como también el mayor valor de coeficiente metabólico. El coeficiente metabólico ($q\text{CO}_2$), también denominado respiración específica, se define como la tasa de respiración (medida como CO_2 desprendido) por unidad de biomasa microbiana, y evalúa eficazmente cómo la biomasa microbiana está empleando el carbono disponible para la biosíntesis (Wardle y Ghani, 1995), siendo más alto cuando los sustratos son más fácilmente mineralizables (Sparling *et al.*, 1986). La mayor tasa respiratoria unida a un mayor coeficiente metabólico indica que el monocultivo de alfalfa tiene en esa estación las comunidades microbianas más activas, posiblemente por la riqueza de sus exudados radiculares.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. La estacionalidad afectó de forma significativa a la estructura de la comunidad microbiana del suelo y a su biomasa, así como a la abundancia relativa de actinobacterias y hongos saprofitos.
2. De igual modo, la estacionalidad afectó drásticamente a los parámetros bioquímicos del suelo que, en general, mostraron los valores más altos en primavera, en concordancia con las condiciones de temperatura y humedad más favorables para los procesos biológicos que se dan en esa estación.
3. El factor cobertura vegetal influyó decisivamente en la biomasa microbiana del suelo y en la abundancia relativa de los diferentes grupos microbianos. El monocultivo de dactilo incrementó la biomasa microbiana y la abundancia relativa de hongos micorrícicos arbusculares. La presencia de alfalfa en el suelo influyó positivamente en la abundancia relativa de hongos saprofitos, bacterias Gram positivas y negativas, y actinobacterias.
4. La fertilización fosfórica no tuvo una influencia destacable sobre los parámetros microbiológicos estudiados, salvo de forma puntual incrementando la abundancia relativa de actinobacterias en la estación de otoño.
5. La alfalfa, aun en la más baja proporción de siembra ensayada, determina la estructura de la comunidad microbiana. La fertilización fosfórica no tuvo un efecto significativo sobre dicha estructura.
6. Igualmente, la alfalfa, aun en la más baja proporción de siembra, incrementa la mineralización de nitrógeno en el suelo respecto al monocultivo de dactilo.

7. La fertilización fosfórica afectó fundamentalmente a la actividad arilsulfatasa del suelo, reduciendo sus valores en todos los tratamientos de cobertura vegetal.
8. El resto de parámetros bioquímicos evaluados, o no fueron afectados por ningún factor experimental, o tuvieron comportamientos heterogéneos de acuerdo al factor cobertura vegetal o fertilización fosfórica, como también de acuerdo a la estacionalidad.
9. Los cultivos mixtos tuvieron una gran similitud entre sí de acuerdo al conjunto de parámetros microbiológicos, y distinto respecto a los monocultivos.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Martínez V, Cruz L, Sotomayor-Ramírez D y Pérez-Alegria L** (2007) Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Applied Soil Ecology* **35**: 35-45
- Acosta-Martínez V y Tabatabai MA** (2000) Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* **31**: 85-91
- Acosta-Martínez V, Zobeck TM y Allen V** (2004) Soil microbial, chemical and physical properties in continuous cotton and integrated crop-livestock systems. *Soil Science Society of America Journal* **68**: 1875-1884
- Acton DF y Gregorich LJ** (1995) La santé de nos sols: vers une agriculture durable au Canada. Centre de recherches sur les terres et les ressources biologiques. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Canadá
- Aerts R y Chapin FS** (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: A re-evaluation of processes and patterns. In AH Fitter, RD G., eds, *Advances in Ecological Research*, Vol 30, pp 1-67
- Alef K** (1995) Soil respiration. In K Alef, P Nannipieri, eds, *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp 214-218
- Allison SD y Treseder KK** (2008) Warming and drying suppress microbial activity and carbon cycling in boreal forest soils. *Global Change Biology* **14**: 2898-2909
- Aloni R, Aloni E, Langhans M y Ullrich CI** (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany* **97**: 883-893
- Amaro IR, Vicente-Villardón JL y Galindo-Villardón MP** (2003) MANOVA Biplot para arreglos de tratamientos con dos factores basado en modelos Lineales Generales Multivariantes (Manova-Biplot for two-way arrays based on Multivariate General Linear Models). *Interciencia* **29**: 26-32
- Anderson MJ** (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**: 32-46
- Anderson TH y Domsch KH** (1985) Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil-microorganisms in a dormant state. *Biology and Fertility of Soils* **1**: 81-89
- Anderson TH y Domsch KH** (1989) Ratios of microbial biomass carbon to total organic-carbon in arable soils. *Soil Biology & Biochemistry* **21**: 471-479
- Anderson TH y Domsch KH** (1990) Application of ecophysiological quotients (qCO_2 and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology & Biochemistry* **22**: 251-255
- Anderson TH y Domsch KH** (1993) The metabolic quotient for CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental-conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* **25**: 393-395
- Andreote FD, de Araujo WL, de Azevedo JL, van Elsas JD, da Rocha UN y van Overbeek LS** (2009) Endophytic Colonization of Potato (*Solanum tuberosum* L.) by a Novel Competent Bacterial Endophyte, *Pseudomonas putida* Strain P9, and Its

- Effect on Associated Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3396-3406
- Annicchiarico P, Pecetti L, Bouzerzour H, Kallida R, Khedim A, Porqueddu C, Simoes NM, Volaire F y Lelievre F** (2011) Adaptation of contrasting cocksfoot plant types to agricultural environments across the Mediterranean basin. *Environmental and Experimental Botany* **74**: 82-89
- Aon MA y Colaneri AC** (2001) II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* **18**: 255-270
- Arias ME, Gonzalez-Perez JA, Gonzalez-Vila FJ y Ball AS** (2005) Soil health - a new challenge for microbiologists and chemists. *International Microbiology* **8**: 13-21
- Ash AJ, Corfield JP, McIvor JG y Ksiksi TS** (2011) Grazing Management in Tropical Savannas: Utilization and Rest Strategies to Manipulate Rangeland Condition. *Rangeland Ecology & Management* **64**: 223-239
- Aulakh MS, Wassmann R, Bueno C, Kreuzwieser J y Rennenberg H** (2001) Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant Biology* **3**: 139-148
- Ayantunde AA, de Leeuw J, Turner MD y Said M** (2011) Challenges of assessing the sustainability of (agro)-pastoral systems. *Livestock Science* **139**: 30-43
- Azcón R, Elatrach F y Barea JM** (1988) Influence of mycorrhiza vs soluble phosphate on growth, nodulation, and N-2 fixation (N-15) in alfalfa under different levels of water potential. *Biology and Fertility of Soils* **7**: 28-31
- Badri DV, Loyola-Vargas VM, Du J, Stermitz FR, Broeckling CD, Iglesias-Andreu L y Vivanco JM** (2008) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytologist* **179**: 209-223
- Badri DV y Vivanco JM** (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell and Environment* **32**: 666-681
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S y Vivanco JM** (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 233-266
- Baligar VC, Staley TE y Wright RJ** (1991a) Enzyme-activities in appalachian soils. 2. ureasa. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **22**: 315-322
- Baligar VC y Wright RJ** (1991) Enzyme-activities in appalachian soils.1. Arylsulfatase. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **22**: 305-314
- Baligar VC, Wright RJ y Smedley MD** (1991b) Enzyme-activities in appalachian soils. 4. Dehydrogenase. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **22**: 1797-1804
- Baligar VC, Wright RJ, Fageria NK y Pitta GVE** (1999) Enzyme activities in cerrado soils of brazil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **30**: 1551-1560
- Bandick AK y Dick RP** (1999) Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry* **31**: 1471-1479
- Bardgett RD, Lovell RD, Hobbs PJ y Jarvis SC** (1999) Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* **31**: 1021-1030

- Barea JM, Azcón R y Azcón-Aguilar C** (2002) Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 343-351
- Bartelt-Ryser J, Joshi J, Schmid B, Brandl H y Balsler T** (2005) Soil feedbacks of plant diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* **7**: 27-49
- Bastida F, Moreno JL, Hernandez T y Garcia C** (2006) Microbiological activity in a soil 15 years after its devegetation. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 2503-2507
- Bastida F, Zsolnay A, Hernández T y García C** (2008) Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* **147**: 159-171
- Batjes NH** (1996) Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *European Journal of Soil Science* **47**: 151-163
- Beauregard MS, Hamel C, Nayyar A y St-Arnaud M** (2010) Long-Term Phosphorus Fertilization Impacts Soil Fungal and Bacterial Diversity but not AM Fungal Community in Alfalfa. *Microbial Ecology* **59**: 379-389
- 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
- Berg G y Smalla K** (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **68**: 1-13
- Bergstrom DW, Monreal CM y King DJ** (1998a) Sensitivity of soil enzyme activities to conservation practices. *Soil Science Society of America Journal* **62**: 1286-1295
- Bergstrom DW, Monreal CM, Millette JA y King DJ** (1998b) Spatial dependence of soil enzyme activities along a slope. *Soil Science Society of America Journal* **62**: 1302-1308
- Betencourt E, Duputel M, Colomb B, Desclaux D y Hinsinger P** (2012) Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. *Soil Biology & Biochemistry* **46**: 181-190
- Bever JD** (2003) Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytologist* **157**: 465-473
- Beyer L, Wachendorf C, Balzer FM y Balzergraf UR** (1992) The effect of soil texture and soil-management on microbial biomass and soil enzyme-activities in arable soils of northwest Germany. *Agribiological Research-Zeitschrift Fur Agrarbiologie Agrikulturchemie Okologie* **45**: 276-283
- Blanco A, Fortaleza J, Rico M y Sánchez JA** (1989) Estudios de la finca experimental "Muñovela" (IRNASA/CSIC Salamanca). *Anuario. Centro de Edafología y Biología aplicada de Salamanca* **14**: 150-189
- Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassan F y Luna V** (2007) Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**: 874-880
- Bond WJ y Parr CL** (2010) Beyond the forest edge: Ecology, diversity and conservation of the grassy biomes. *Biological Conservation* **143**: 2395-2404

- Bone J, Head M, Barraclough D, Archer M, Scheib C, Flight D y Voulvoulis N** (2010) Soil quality assessment under emerging regulatory requirements. *Environment International* **36**: 609-622
- Bonfante P y Anca IA** (2009) Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology* **63**: 363-383
- Boval M y Dixon RM** (2012) The importance of grasslands for animal production and other functions: a review on management and methodological progress in the tropics. *Animal* **6**: 748-762
- Breullin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P, Druège U, Hause B, Bucher M, Kretzschmar T, Bossolini E, Kühlemeier C, Martinoia E, Franken P, Scholz U y Reinhardt D** (2010) Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant Journal* **64**: 1002-1017
- Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK y Vivanco JM** (2008) Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 738-744
- Brooker R, Kikvidze Z, Pugnaire FI, Callaway RM, Choler P, Lortie CJ y Michalet R** (2005) The importance of importance. *Oikos* **111**: 208-208
- Broz AK, Manter DK y Vivanco JM** (2007) Soil fungal abundance and diversity: another victim of the invasive plant *Centaurea maculosa*. *ISME Journal* **1**: 763-765
- Brzezinska M, Stepniewska Z y Stepniewski W** (1998) Soil oxygen status and dehydrogenase activity. *Soil Biology & Biochemistry* **30**: 1783-1790
- Buee M, De Boer W, Martin F, van Overbeek L y 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
- Bugalho MN, Caldeira MC, Pereira JS, Aronson J y Pausas JG** (2011) Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Frontiers in Ecology and the Environment* **9**: 278-286
- Bünemann EK** (2008) Enzyme additions as a tool to assess the potential bioavailability of organically bound nutrients. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 2116-2129
- Burns RG** (1983) Extracellular enzyme-substrate interactions in soil. In JH Slater, R Wittenbury, JWT Wimpenny, eds, *Microbes in Their Natural Environment*. Cambridge University Press, London, pp 249-298
- Burns RG** (1986) Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. In PM Huang, ME Schnitzer, eds, *Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*. Soil Sci. Soc. Am., Madison, pp. 429-452
- Busto MD y Pérez-Mateos M** (1995) Extraction of humic β -glucosidase fractions from soil. *Biology and Fertility of Soils* **20**: 77-82
- Busto MD y Pérez-Mateos M** (2000) Characterization of β -D-glucosidase extracted from soil fractions. *European Journal of Soil Science* **51**: 193-200
- Caldwell BA** (2005) Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia* **49**: 637-644
- Callaway RM** (1995) Positive interactions among plants. *Botanical Review* **61**: 306-349

- Campbell CA, Brandt SA, Biederbeck VO, Zentner RP y Schnitzer M** (1992) Effect of crop rotations and rotation phase on characteristics of soil organic-matter in a dark brown chernozemic soil
Canadian Journal of Soil Science **72**: 403-416
- Caradus JR** (1981) Effect of root hair length on white clover growth over a range of soil P levels. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **24**: 353-358
- Caravaca F, Masciandaro G y Ceccanti B** (2002) Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semiarid Mediterranean environment. *Soil & Tillage Research* **68**: 23-30
- Carrete M y Donazar JA** (2005) Application of central-place foraging theory shows the importance of Mediterranean dehesas for the conservation of the cinereous vulture, *Aegypius monachus*. *Biological Conservation* **126**: 582-590
- Carro L, Sproer C, Alonso P y Trujillo ME** (2012) Diversity of *Micromonospora* strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of *Pisum sativum* analyzed by multilocus sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **35**: 73-80
- Casler MD, Fales SL, McElroy AR, Hall MH, Hoffman LD y Leath KT** (2000) Genetic progress from 40 years of orchardgrass breeding in north america measured under hay management. *Crop Science* **40**: 1019-1025
- Cassman KG** (1999) Ecological intensification of cereal production systems: Yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 5952-5959
- Chakrabarti K, Sarkar B, Chakraborty A, Banik P y Bagchi DK** (2000) Organic recycling for soil quality conservation in a sub-tropical plateau region. *Journal of Agronomy and Crop Science* **184**: 137-142
- Chaudhary DR, Lorenz N, Dick LK y Dick RP** (2011) FAME Profiling and Activity of Microbial Communities During *Jatropha curcas* L. Residue Decomposition in Semiarid Soils. *Soil Science* **176**: 625-633
- Chen MM, Chen BD y Marschner P** (2008a) Plant growth and soil microbial community structure of legumes and grasses grown in monoculture or mixture. *Journal of Environmental Sciences-China* **20**: 1231-1237
- Chen XP, Zhu YG, Xia Y, Shen JP y He JZ** (2008b) Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental Microbiology* **10**: 1978-1987
- Chow ML, Radomski CC, McDermott JM, Davies J y Axelrood PE** (2002) Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. *FEMS Microbiology Ecology* **42**: 347-357
- Cieslinski G, VanRees KCJ, Szmigielska AM y Huang PM** (1997) Low molecular weight organic acids released from roots of durum wheat and flax into sterile nutrient solutions. *Journal of Plant Nutrition* **20**: 753-764
- Ciria Ciria J y Ciria García de la Torre J** (2004) Los pastos y la ganadería extensiva en Castilla y León. In B García-Criado, A García-Ciudad, BR Vázquez-de-Aldana, I Zabalgogezcoa, eds, Pastos y Ganadería Extensiva. Sociedad Española para el Estudio de los Pastos, Salamanca, Spain, pp 223-235

- Clark J, Campbell J, Grizzle H, Acosta-Martinez V y Zak J** (2009) Soil Microbial Community Response to Drought and Precipitation Variability in the Chihuahuan Desert. *Microbial Ecology* **57**: 248-260
- Clark MD y Gilmour JT** (1983) The effect of temperature on decomposition at optimum and saturated soil-water contents. *Soil Science Society of America Journal* **47**: 927-929
- Clary J** (2008) Rainfall seasonality determines annual/perennial grass balance in vegetation of Mediterranean Iberian. *Plant Ecology* **195**: 13-20
- Condron LM, Turner BL y Cade-Menun BJ** (2005) Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. In JT Sims, AN Sharpley, eds, Phosphorus: Agriculture and the Environment. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI, USA, pp 87-121
- Copley J** (2000) Ecology goes underground. *Nature* **406**: 452-454
- Cordell D, Drangert JO y White S** (2009) The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change-Human and Policy Dimensions* **19**: 292-305
- Craswell ET y Waring SA** (1972) Effect of grinding on the decomposition of soil organic matter--I. The mineralization of organic nitrogen in relation to soil type. *Soil Biology and Biochemistry* **4**: 427-433
- Cregut M, Piutti S, Vong PC, Slezack-Deschaumes S, Crovisier I y Benizri E** (2009) Density, structure, and diversity of the cultivable arylsulfatase-producing bacterial community in the rhizosphere of field-grown rape and barley. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 704-710
- Cruz AF, Hamel C, Hanson K, Selles F y Zentner RP** (2009) Thirty-seven years of soil nitrogen and phosphorus fertility management shapes the structure and function of the soil microbial community in a Brown Chernozem. *Plant and Soil* **315**: 173-184
- Cu STT, Hutson J y Schuller KA** (2005) Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the wheat. *Plant and Soil* **272**: 143-151
- d'Angelo-Picard C, Faure D, Penot I y Dessaux Y** (2005) Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environmental Microbiology* **7**: 1796-1808
- da Rocha UN, van Overbeek L y van Elsas JD** (2009) Exploration of hitherto-uncultured bacteria from the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **69**: 313-328
- Davis D, Waggoner PE y Dimond AE** (1953) Conjugated phenols in the fusarium wilt syndrome. *Nature* **172**: 959-961
- De Boer W y Kester RA** (1996) Variability of nitrification potentials in patches of undergrowth vegetation in primary Scots pine stands. *Forest Ecology and Management* **86**: 97-103
- De Deyn GB y Van der Putten WH** (2005) Linking aboveground and belowground diversity. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 625-633
- De la Pena C, Lei Z, Watson BS, Sumner LW y Vivanco JM** (2008) Root-microbe communication through protein secretion. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 25247-25255

- Debosz K, Rasmussen PH y Pedersen AR** (1999) Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: effects of organic matter input. *Applied Soil Ecology* **13**: 209-218
- DeFries R y Rosenzweig C** (2010) Toward a whole-landscape approach for sustainable land use in the tropics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 19627-19632
- del Pozo JC, Allona I, Rubio V, Leyva A, de la Pena A, Aragoncillo C y Paz-Ares J** (1999) A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant Journal* **19**: 579-589
- Delalande L, Faure D, Raffoux A, Uroz S, D'Angelo-Picard C, Elasri M, Carlier A, Berruyer R, Petit A, Williams P y Dessaux Y** (2005) N-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiology Ecology* **52**: 13-20
- Delgado A y Scalenghe R** (2008) Aspects of phosphorus transfer from soils in Europe. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **171**: 552-575
- Devau N, Le Cadre E, Hinsinger P y Gerard F** (2010) A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Annals of Botany* **105**: 1183-1197
- Dey PM y Pridham JB** (1972) Biochemistry of alpha-galactosidases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **36**: 91-&
- Díaz-Villa MD, Marañón T, Arroyo J y Garrido B** (2003) Soil seed bank and floristic diversity in a forest-grassland mosaic in southern Spain. *Journal of Vegetation Science* **14**: 701-709
- Dick RP, Breakwill D y Turco R** (1996) Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrating biological indicators. In JW Doran, AJ Jones, eds, Handbook of methods for assessment of soil quality. Soil Science Society of America, Madison, pp 247-272
- Dick RP, Kandeler E y Daniel H** (2005) Enzymes un soils. In Encyclopedia of Soils in the Environment. Elsevier, Oxford, pp 448-456
- Dick WA y Tabatabai MA** (1992) Potential uses of soil enzymes. In FBJ Metting, ed, Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management Marcel Dekker, New York, pp. 95-127
- Dick WA, Cheng L y Wang P** (2000) Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1915-1919
- Doelman P y Haanstra L** (1979) Effect of lead on soil respiration and dehydrogenase activity. *Soil Biology and Biochemistry* **11**: 475-479
- Doran JW, Sarrantonio M y Liebig MA** (1996) Soil health and sustainability. *Advances in Agronomy* **56**: 1-54
- Doroshenko EA, Zenova GM, Zvyagintsev DG y Sudnitsyn, II** (2005) Spore germination and mycelial growth of streptomycetes at different humidity levels. *Microbiology* **74**: 690-694

- Dose K, Bieger-Dose A, Ernst B, Feister U, Gomez-Silva B, Klein A, Risi S y Stridde C** (2001) Survival of microorganisms under the extreme conditions of the Atacama Desert. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **31**: 287-303
- Drenovsky RE, Elliott GN, Graham KJ y Scow KM** (2004) Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 1793-1800
- 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
- Drijber RA, Doran JW, Parkhurst AM y Lyon DJ** (2000) Changes in soil microbial community structure with tillage under long-term wheat-fallow management. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1419-1430
- Dunfield KE y Germida JJ** (2003) Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7310-7318
- Eivazi F y Tabatabai MA** (1977) Phosphatases in soils. *Soil Biology & Biochemistry* **9**: 167-172
- Eivazi F y Tabatabai MA** (1988) Glucosidases and galactosidases in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **20**: 601-606
- El Mehdawi AF, Cappa JJ, Fakra SC, Self J y Pilon-Smits EAH** (2012) Interactions of selenium hyperaccumulators and nonaccumulators during cocultivation on seleniferous or nonseleniferous soil: the importance of having good neighbors. *New Phytologist* **194**: 264-277
- Fan F, Zhang FS y Lu Y** (2011) Linking plant identity and interspecific competition to soil nitrogen cycling through ammonia oxidizer communities. *Soil Biology & Biochemistry* **43**: 46-54
- Fang CW, Radosevich M y Fuhrmann JJ** (2001) Characterization of rhizosphere microbial community structure in five similar grass species using FAME and BIOLOG analyses. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 679-682
- Faure D, Vereecke D y Leveau JHJ** (2009) Molecular communication in the rhizosphere. *Plant and Soil* **321**: 279-303
- Ferreira EM y Castro IV** (2011) Fijación biológica de nitrógeno y productividad de pastos naturales en sistemas agrícolas del mediterráneo. In M Megías, R Rivilla, MJ Soto, MJ Delgado, E González, PF Mateos, M León, B Rodelas, E Bedmar, eds, Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Granada, Spain, pp 403-416
- Fierer N y Jackson RB** (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 626-631
- Finzi AC, Sinsabaugh RL, Long TM y Osgood MP** (2006) Microbial community responses to atmospheric carbon dioxide enrichment in a warm-temperate forest. *Ecosystems* **9**: 215-226

- Fioretto A, Papa S, Pellegrino A y Ferrigno A** (2009) Microbial activities in soils of a Mediterranean ecosystem in different successional stages. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 2061-2068
- Föhse D, Claassen N y Jungk A** (1988) Phosphorus efficiency in plants. I. External and internal P requirement and P uptake efficiency of different plant species. *Plant Soil* **110**: 101-109
- Fornara DA y Tilman D** (2008) Plant functional composition influences rates of soil carbon and nitrogen accumulation. *Journal of Ecology* **96**: 314-322
- Franché C, Lindstrom K y Elmerich C** (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* **321**: 35-59
- Frank DA y Groffman PM** (1998) Ungulate vs. landscape control of soil C and N processes in grasslands of Yellowstone National Park. *Ecology* **79**: 2229-2241
- Frankenberger WT y Dick WA** (1983) Relationships between enzyme-activities and microbial-growth and activity indexes in soil. *Soil Science Society of America Journal* **47**: 945-951
- Fridley JD** (2001) The influence of species diversity on ecosystem productivity: how, where, and why? *Oikos* **93**: 514-526
- Fukaki H, Okushima Y y Tasaka M** (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *International Review of Cytology* **256**: 111-137
- Galante E, García-Román M, Barrera I y Galindo P** (1991) Comparison of spatial-distribution patterns of dung-feeding scarabs (*Coleoptera, Scarabaeidae, Geotrupidae*) in wooded and open pastureland in the Mediterranean dehesa area of the Iberian peninsula. *Environmental Entomology* **20**: 90-97
- 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
- García C, Hernández T y Costa F** (1994) Microbial activity in soils under mediterranean environmental-conditions. *Soil Biology & Biochemistry* **26**: 1185-1191
- Gelsomino A, Badalucco L, Ambrosoli R, Crecchio C, Puglisi E y Meli SM** (2006) Changes in chemical and biological soil properties as induced by anthropogenic disturbance: A case study of an agricultural soil under recurrent flooding by wastewaters. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 2069-2080
- Gerke J y Meyer U** (1995) Phosphate acquisition by red clover and black mustard on a humic podsol. *J. Plant Nutrit.* **18**: 2409-2429
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D y Wipf D** (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* **20**: 519-530
- Gil-Sotres F, Trasar-Cepeda C, Leiros MC y Seoane S** (2005) Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 877-887
- Gil JL y Fick WH** (2001) Soil nitrogen mineralization in mixtures of eastern gamagrass with alfalfa. *Agronomy Journal* **93**: 902-910
- Gilbert N** (2009) Environment: The disappearing nutrient. *Nature* **461**: 716-718

- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng ZY, Duan J y McConkey B** (2007) Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**: 227-242
- Gomes NCM, Fagbola O, Costa R, Rumjanek NG, Buchner A, Mendona-Hagler L y Smalla K** (2003) Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3758-3766
- Gómez Gutiérrez JM y Calabuig EL** (1992) Producción de praderas y pastizales. In JM Gómez Gutiérrez, ed, El libro de las dehesas salmantinas. Junta de Castilla y León, Salamanca, Spain, pp 489-511
- Gómez Gutiérrez JM** (1992) Orígenes del monte adhesado y situación actual. In JM Gómez Gutiérrez, ed, El libro de las dehesas salmantinas. Junta de Castilla y León, Salamanca, Spain, pp 19-30
- Grayston SJ, Wang SQ, Campbell CD y Edwards AC** (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* **30**: 369-378
- Grayston SJ, Griffith GS, Mawdsley JL, Campbell CD y Bardgett RD** (2001) Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 533-551
- Green SJ, Inbar E, Michel FC, Hadar Y y Minz D** (2006) Succession of bacterial communities during early plant development: Transition from seed to root and effect of compost amendment. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3975-3983
- Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG y Bailey MJ** (2003) Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6961-6968
- Gschwendtner S, Esperschuetz J, Buegger F, Reichmann M, Muller M, Munch JC y Schloter M** (2011) Effects of genetically modified starch metabolism in potato plants on photosynthate fluxes into the rhizosphere and on microbial degraders of root exudates. *FEMS Microbiology Ecology* **76**: 564-575
- Guiñazú LB, Andrés JA, Del Papa MF, Pistorio M y Rosas SB** (2010) Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biology and Fertility of Soils* **46**: 185-190
- Guntiñas ME, Leirós MC, Trasar-Cepeda C y Gil-Sotres F** (2012) Effects of moisture and temperature on net soil nitrogen mineralization: A laboratory study. *European Journal of Soil Biology* **48**: 73-80
- Guo YJ, Ni Y y Han JG** (2009) The Influence of Land Use Change on Chemical and Biological Properties of Steppe Soils in Northern China. *Arid Land Research and Management* **23**: 197-212
- Hammond JP, Broadley MR y White PJ** (2004) Genetic responses to phosphorus deficiency. *Annals of Botany* **94**: 323-332
- Haran S, Logendra S, Seskar M, Bratanova M y Raskin I** (2000) Characterization of Arabidopsis acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiology* **124**: 615-626
- Harrison KA y Bardgett RD** (2010) Influence of plant species and soil conditions on plant-soil feedback in mixed grassland communities. *Journal of Ecology* **98**: 384-395

- Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D y Berg G** (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil* **321**: 235-257
- Hassink J** (1994) Active organic matter fraction and microbial biomass as predictor of N-mineralization. *Eur. J. Agric.* **3**: 257-265
- Hayano K y Tubaki K** (1985) Origin and properties of β -glucosidase activity of tomato-field soil. *Soil Biology & Biochemistry* **17**: 553-557
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R y Ahmed I** (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* **60**: 579-598
- 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 y Lawton JH** (1999) Plant diversity and productivity experiments in European grasslands. *Science* **286**: 1123-1127
- Hector A, Beale AJ, Minns A, Otway SJ y Lawton JH** (2000) Consequences of the reduction of plant diversity for litter decomposition: Effects through litter quality and microenvironment. *Oikos* **90**: 357-371
- Henry HAL** (2012) Soil extracellular enzyme dynamics in a changing climate. *Soil Biology & Biochemistry* **47**: 53-59
- Hernández T y García C** (2003) Estimación de la actividad microbiana del suelo. In C García, F Gil, T Hernández, C Trasar, eds, Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos : Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp 311-346
- Herrmann M, Saunders AM y Schramm A** (2008) Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3279-3283
- Herschkovitz Y, Lerner A, Davidov Y, Rothballer M, Hartmann A, Okon Y y Jurkevitch E** (2005) Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* **50**: 277-288
- Hiltner L** (1904) Über 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** (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* **237**: 173-195
- Hinsinger P, Plassard C, Tang CX y Jaillard B** (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* **248**: 43-59
- Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D y Young IM** (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* **321**: 117-152
- Hinsinger P, Betencourt E, Bernard L, Brauman A, Plassard C, Shen JB, Tang XY y Zhang FS** (2011) P for Two, Sharing a Scarce Resource: Soil Phosphorus

- Acquisition in the Rhizosphere of Intercropped Species. *Plant Physiology* **156**: 1078-1086
- Hoekenga OA, Vision TJ, Shaff JE, Monforte AJ, Lee GP, Howell SH y Kochian LV** (2003) Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Landsberg erecta x Columbia) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiology* **132**: 936-948
- Hooper DU y Vitousek PM** (1997) The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science* **277**: 1302-1305
- Hooper DU y Dukes JS** (2004) Overyielding among plant functional groups in a long-term experiment. *Ecology Letters* **7**: 95-105
- Hooper DU, Chapin FS, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, Lawton JH, Lodge DM, Loreau M, Naeem S, Schmid B, Setälä H, Symstad AJ, Vandermeer J y Wardle DA** (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* **75**: 3-35
- Houlden A, Timms-Wilson TM, Day MJ y Bailey MJ** (2008) Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology* **65**: 193-201
- Hueso S, García C y Hernández T** (2012) Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. *Soil Biology & Biochemistry* **50**: 167-173
- Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B y Piche Y** (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 233-242
- Igual JM, Valverde A, Cervantes E y Velázquez E** (2001) Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie* **21**: 561-568
- Igual JM, Valverde A, Peix A, Santa Regina I y Rodríguez-Barrueco C** (2006) La simbiosis actinorrícica. In E Bedmar, J González, C Lluch, B Rodelas, eds, Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Granada, Spain, pp 232-243
- Igual JM y Rodríguez-Barrueco C** (2007) Fertilizers, food and environment. In E Velázquez, C Rodríguez-Barrueco, eds, First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 199-202
- Imas P, Bar-Yossef B, Kafkafi U y Ganmore-Neumann R** (1997) Phosphate induced carboxylate and proton release by tomato roots. *Plant Soil* **191**: 35-39
- Insam H, Parkinson D y Domsch KH** (1989) Influence of macroclimate on soil microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry* **21**: 211-221
- Izaguirre-Mayoral ML, Flores S y Carballo O** (2002) Determination of acid phosphatase and dehydrogenase activities in the rhizosphere of nodulated legume species native to two contrasting savanna sites in Venezuela. *Biology and Fertility of Soils* **35**: 470-472
- Jandl G, Leinweber P, Schulten HR y Ekschmitt K** (2005) Contribution of primary organic matter to the fatty acid pool in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 1033-1041

- Jensen ES, Peoples MB y Hauggaard-Nielsen H** (2010) Faba bean in cropping systems. *Field Crops Research* **115**: 203-216
- Jia G-M, Zhang P-D, Wang G, Cao J, Han J-C y Huang Y-P** (2010) Relationship Between Microbial Community and Soil Properties During Natural Succession of Abandoned Agricultural Land. *Pedosphere* **20**: 352-360
- Jiang C, Hao Z-Y, Jin K, Li S-X, Che Z-Q, Ma G-F y Wu B** (2010) Identification of a metagenome-derived [beta]-glucosidase from bioreactor contents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **63**: 11-16
- Joergensen RG** (2000) Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* **32**: 647-652
- Joffre R, Rambal S y Ratte JP** (1999) The dehesa system of southern Spain and Portugal as a natural ecosystem mimic. *Agroforestry Systems* **45**: 57-79
- Jones DL y Hinsinger P** (2008) The rhizosphere: complex by design. *Plant and Soil* **312**: 1-6
- Jones DL, Nguyen C y Finlay RD** (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil* **321**: 5-33
- Jorquera MA, Hernandez MT, Rengel Z, Marschner P y Mora ML** (2008) Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils* **44**: 1025-1034
- Juma NG y Tabatabai MA** (1977) Effects of Trace Elements on Phosphatase Activity in Soils. *Soil Sci Soc Am J* **41**: 343-346
- Kandeler E y Gerber H** (1988) Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* **6**: 68-72
- Kandeler E y Eder G** (1993) Effect of cattle slurry in grassland on microbial biomass and on activities of various enzymes. *Biology and Fertility of Soils* **16**: 249-254
- Kandeler E, Marschner P, Tschierko D, Gahoonia TS y Nielsen NE** (2002) Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant and Soil* **238**: 301-312
- Kang H, Kang S y Lee D** (2009) Variations of soil enzyme activities in a temperate forest soil. *Ecological Research* **24**: 1137-1143
- Karadeniz A, Topcuoglu SF y Inan S** (2006) Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **22**: 1061-1064
- Kaur A, Chaudhary A, Choudhary R y Kaushik R** (2005) Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science* **89**: 1103-1112
- Kemp DR y Michalk DL** (2007) Towards sustainable grassland and livestock management. *Journal of Agricultural Science* **145**: 543-564
- Kennedy AC y Papendick RI** (1995) Microbial characteristics of soil quality. *Journal of Soil and Water Conservation* **50**: 243-248
- Kertesz MA** (2000) Riding the sulfur cycle: metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 135-175

- Khalid A, Tahir S, Arshad M y Zahir ZA** (2004) Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Australian Journal of Soil Research* **42**: 921-926
- Kielak A, Pijl AS, van Veen JA y Kowalchuk GA** (2009) Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *ISME Journal* **3**: 378-382
- Kimura M, Jia ZJ, Nakayama N y Asakawa S** (2008) Ecology of viruses in soils: Past, present and future perspectives. *Soil Science and Plant Nutrition* **54**: 1-32
- Kirk TK y Farrell RL** (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* **41**: 465-505
- Kirwan L, Connolly J, Finn JA, Brophy C, Lüscher A, Nyfeler D y Sebastià MT** (2009) Diversity-interaction modeling: estimating contributions of species identities and interactions to ecosystem function. *Ecology* **90**: 2032-2038
- Kiss S, Dragan-Bularda M, Radulescu D y Brady NC** (1975) Biological Significance of Enzymes Accumulated in Soil. In *Advances in Agronomy*, Vol Volume 27. Academic Press, pp 25-87
- Kizilkaya R y Hepsen S** (2004) Effect of biosolid amendment on enzyme activities in earthworm (*Lumbricus terrestris*) casts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **167**: 202-208
- Klamer M y Baath E** (2004) Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18 : 2 omega 6,9. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 57-65
- Kleinman PJA, Sharpley AN, McDowell RW, Flaten DN, Buda AR, Tao L, Bergstrom L y Zhu Q** (2011) Managing agricultural phosphorus for water quality protection: principles for progress. *Plant and Soil* **349**: 169-182
- Klironomos JN** (2003) Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* **84**: 2292-2301
- Klose S y Tabatabai MA** (1999) Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils. *Soil Science Society of America Journal* **63**: 569-574
- Knauff U, Schulz M y Scherer HW** (2003) Arylsulfatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. *European Journal of Agronomy* **19**: 215-223
- Kreft H y Jetz W** (2007) Global patterns and determinants of vascular plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 5925-5930
- Kreuger CR y Vigil FR** (1979) Interseeding alfalfa for grassland improvement in the Northern Great Plains. In: *Proceedings of the Report 26th Alfalfa Improvement Conference*. Agricultural Reviews and Manuals, Science and Education Administration, USDA, Washington, DC 19 pp
- Ladd JN** (1978) Origin and range of enzymes in soil. In RG Burns, ed, *Soil Enzymes*. Academic Press, London, pp 51-96
- Ladd JN y Jackson RB** (1982) Biochemistry of ammonification. In FJ Stevenson, ed, *Nitrogen in Agricultural Soil*. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 173-227
- Larkin RP, Honeycutt CW y Griffin TS** (2006) Effect of swine and dairy manure amendments on microbial communities in three soils as influenced by environmental conditions. *Biology and Fertility of Soils* **43**: 51-61

- Latour X, Corberand TS, Laguerre G, Allard F y Lemanceau P** (1996) The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2449-2456
- Leckie SE, Prescott CE, Grayston SJ, Neufeld JD y Mohn WW** (2004) Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 529-532
- Lee SH, Ka JO y Cho JC** (2008) Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Letters* **285**: 263-269
- Lelievre F y Volaire F** (2009) Current and Potential Development of Perennial Grasses in Rainfed Mediterranean Farming Systems. *Crop Science* **49**: 2371-2378
- Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S y Briat JF** (2009) Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant and Soil* **321**: 513-535
- Lerner A, Herschkovitz Y, Baudoin E, Nazaret S, Moenne-Loccoz Y, Okon Y y Jurkevitch E** (2006) Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 1212-1218
- Li DP, Zhu HF, Liu KF, Liu X, Leggewie G, Udvardi M y Wang DW** (2002) Purple acid Phosphatases of *Arabidopsis thaliana* - Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 27772-27781
- Li H, Shen J, Zhang F, Clairotte M, Drevon JJ, Le Cadre E y Hinsinger P** (2008) Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. *Plant and Soil* **312**: 139-150
- Li H, Shen J, Zhang F, Marschner P, Cawthray G y Rengel Z** (2010a) Phosphorus uptake and rhizosphere properties of intercropped and monocropped maize, faba bean, and white lupin in acidic soil. *Biology and Fertility of Soils* **46**: 79-91
- Li L, Tang CX, Rengel Z y Zhang FS** (2003) Chickpea facilitates phosphorus uptake by intercropped wheat from an organic phosphorus source. *Plant and Soil* **248**: 297-303
- Li L, Li SM, Sun JH, Zhou LL, Bao XG, Zhang HG y Zhang FS** (2007) Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 11192-11196
- Li WJ, Li JH, Lu JF, Zhang RY y Wang G** (2010b) Legume-grass species influence plant productivity and soil nitrogen during grassland succession in the eastern Tibet Plateau. *Applied Soil Ecology* **44**: 164-169
- Li XZ y Sarah P** (2003) Enzyme activities along a climatic transect in the Judean Desert. *Catena* **53**: 349-363
- Lipson DA, Wilson RF y Oechel WC** (2005) Effects of elevated atmospheric CO₂ on soil microbial biomass, activity, and diversity in a chaparral ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8573-8580
- Ljungdahl LG y Eriksson KE** (1985) Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in Microbial Ecology* **8**: 237-299

- Loreau M** (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos* **91**: 3-17
- Loreau M y Hector A** (2001) Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* **412**: 72-76
- Luscher A, Fuhrer J y Newton PCD** (2005) Global atmospheric change and its effect on managed grassland systems,
- Lynch JP** (2007) Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany* **55**: 493-512
- Lynch JP** (2011) Root Phenes for Enhanced Soil Exploration and Phosphorus Acquisition: Tools for Future Crops. *Plant Physiology* **156**: 1041-1049
- Makoi JHJR y Ndakidemi PA** (2008) Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology* **7**: 181-191
- Malkomes HP** (1991) Existing alternative test to measure side-effects of pesticides on soil-microorganisms - Dehydrogenase-activity. *Toxicological and Environmental Chemistry* **30**: 167-176
- Mander C, Wakelin S, Young S, Condon L y O'Callaghan M** (2012) Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* **44**: 93-101
- Manske GGB, Ortiz-Monasterio JI, van Ginkel RM, Rajaram S y Vlek PLG** (2002) Phosphorus use efficiency in tall, semi-dwarf and dwarf near-isogenic lines of spring wheat. *Euphytica* **125**: 113-119
- Marklein AR y Houlton BZ** (2012) Nitrogen inputs accelerate phosphorus cycling rates across a wide variety of terrestrial ecosystems. *New Phytologist* **193**: 696-704
- Marschner H** (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London
- Marschner P, Crowley D y Yang CH** (2004) Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* **261**: 199-208
- Marschner P, Solaiman Z y Rengel Z** (2006) Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. *Plant and Soil* **283**: 11-24
- Marschner P** (2007) Soil Microbial Community Structure and Function Assessed by FAME, PLFA and DGGE – Advantages and Limitations. In A Varma, R Oelmüller, eds, Advanced Techniques in Soil Microbiology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp 181-200
- Martin J y López P** (2002) The effect of Mediterranean dehesa management on lizard distribution and conservation. *Biological Conservation* **108**: 213-219
- Martínez-Aguirre A, García-León M y Ivanovich M** (1994) The distribution of U, Th and ²²⁶Ra derived from the phosphate fertilizer industries on an estuarine system in Southwest Spain. *Journal of Environmental Radioactivity* **22**: 155-177
- Masciandaro G, Ceccanti B, Ronchi V y Bauer C** (2000) Kinetic parameters of dehydrogenase in the assessment of the response of soil to vermicompost and inorganic fertilisers. *Biology and Fertility of Soils* **32**: 479-483
- Mayle FE, Langstroth RP, Fisher RA y Meir P** (2007) Long-term forest-savannah dynamics in the Bolivian Amazon: implications for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **362**: 291-307

- McDermott JJ, Staal SJ, Freeman HA, Herrero M y Van de Steeg JA** (2008) Sustaining intensification of smallholder livestock systems in the tropics. *Livestock Science* **130**: 95-109
- 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
- McLaren RG, Keer JI y Swift RS** (1985) Sulphur transformations in soils using sulphur-35 labelling. *Soil Biology and Biochemistry* **17**: 73-79
- Meeks JC y Elhai J** (2002) Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**: 94-121
- Melouk HA y Horner CE** (1973) Beta-glucosidase from phoma strasserii and its possible role in a disease of peppermint. *Phytopathology* **63**: 973-975
- Meriles JM, Vargas Gil S, Conforto C, Figoni G, Lovera E, March GJ y Guzmán CA** (2009) Soil microbial communities under different soybean cropping systems: Characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil and Tillage Research* **103**: 271-281
- Miethling R, Ahrends K y Tebbe CC** (2003) Structural differences in the rhizosphere communities of legumes are not equally reflected in community-level physiological profiles. *Soil Biology & Biochemistry* **35**: 1405-1410
- Mikkelsen BL, Rosendahl S y Jakobsen I** (2008) Underground resource allocation between individual networks of mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **180**: 890-898
- 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
- Moorhead DL y Sinsabaugh RL** (2006) A theoretical model of litter decay and microbial interaction. *Ecological Monographs* **76**: 151-174
- Mortvedt JJ** (1996) Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilizers. *Fertilizer Research* **43**: 55-61
- Moscatelli MC, Di Tizio A, Marinari S y Grego S** (2007) Microbial indicators related to soil carbon in Mediterranean land use systems. *Soil and Tillage Research* **97**: 51-59
- Mulas D, García-Fraile P, Carro L, Ramírez-Bahena MH, Casquero P, Velázquez E y González-Andrés F** (2011) Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biology & Biochemistry* **43**: 2283-2293
- Mulder CPH, Jumpponen A, Hogberg P y Huss-Danell K** (2002) How plant diversity and legumes affect nitrogen dynamics in experimental grassland communities. *Oecologia* **133**: 412-421
- Murphy DV, Recous S, Stockdale EA, Fillery IRP, Jensen LS, Hatch DJ y Goulding KWT** (2003) Gross nitrogen fluxes in soil: Theory, measurement and application of N-15 pool dilution techniques. *Advances in Agronomy, Vol 79* **79**: 69-118
- Nakayama N, Okumura M, Inoue K, Asakawa S y Kimura M** (2007) Seasonal variations in the abundance of virus-like particles and bacteria in the floodwater of a Japanese paddy field. *Soil Science and Plant Nutrition* **53**: 420-429

- Nannipieri P, Ceccanti B, Cervelli S y Sequi P** (1978) Stability and kinetic properties of humus-urease complexes. *Soil Biology and Biochemistry* **10**: 143-147
- Nannipieri P, Ceccanti B y Grego S** (1990) Ecological significance of biological activity in soil. In JM Bollag, G Stotzky, eds, *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, New York, pp 293-335
- Nannipieri P, Kandeler E y Ruggiero P** (2002) Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soils. In RG Burns, RP Dick, eds, *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp 1-34
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G y Renella G** (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* **54**: 655-670
- Ndakidemi PA** (2006) Manipulating legume/cereal mixtures to optimize the above and below ground interactions in the traditional African cropping systems. *African Journal of Biotechnology* **5**: 2526-2533
- Neumann G y Romheld V** (1999) Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* **211**: 121-130
- Nijhuis EH, Maat MJ, Zeegers IWE, Waalwijk C y Vanveen JA** (1993) Selection of bacteria suitable for introduction into the rhizosphere of grass. *Soil Biology & Biochemistry* **25**: 885-895
- Nortcliff S** (2002) Standardisation of soil quality attributes. *Agriculture Ecosystems & Environment* **88**: 161-168
- Nuruzzaman M, Lambers H, Bolland MDA y Veneklaas EJ** (2006) Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant and Soil* **281**: 109-120
- Nyfelner D, Huguenin-Elie O, Suter M, Frossard E, Connolly J y Luescher A** (2009) Strong mixture effects among four species in fertilized agricultural grassland led to persistent and consistent transgressive overyielding. *Journal of Applied Ecology* **46**: 683-691
- Nyfelner D, Huguenin-Elie O, Suter M, Frossard E y Lüscher A** (2011) Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **140**: 155-163
- O'Brien EM** (1998) Water-energy dynamics, climate, and prediction of woody plant species richness: an interim general model. *Journal of Biogeography* **25**: 379-398
- Oelkers EH y Valsami-Jones E** (2008) Phosphate mineral reactivity and global sustainability. *Elements* **4**: 83-87
- Oelmann Y, Richter AK, Roscher C, Rosenkranz S, Temperton VM, Weisser WW y Wilcke W** (2011) Does plant diversity influence phosphorus cycling in experimental grasslands? *Geoderma* **167-68**: 178-187
- Oger P, Petit A y Dessaux Y** (1997) Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature Biotechnology* **15**: 369-372
- Oksanen J, Blanchet GF, Kindt R, Legendre P y O'Hara BR** (2010) vegan: Community Ecology Package.

- Olander LP y Vitousek PM** (2000) Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* **49**: 175-190
- Olea L y 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
- Olsson PA, Baath E y Jakobsen I** (1997) Phosphorus effects on the mycelium and storage structures of an arbuscular mycorrhizal fungus as studied in the soil and roots by analysis of fatty acid signatures. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3531-3538
- Olsson PA** (1999) Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **29**: 303-310
- Opik M, Moora M, Liira J y Zobel M** (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* **94**: 778-790
- Orr DM y O'Reagain PJ** (2011) Managing for rainfall variability: impacts of grazing strategies on perennial grass dynamics in a dry tropical savanna. *Rangeland Journal* **33**: 209-220
- Parkinson D y Coleman DC** (1991) Microbial communities, activity and biomass. *Agriculture Ecosystems & Environment* **34**: 3-33
- Pascual JA, Garcia C y Hernandez T** (1999) Lasting microbiological and biochemical effects of the addition of municipal solid waste to an arid soil. *Biology and Fertility of Soils* **30**: 1-6
- Patrick L, Cable J, Potts D, Ignace D, Barron-Gafford G, Griffith A, Alpert H, Van Gestel N, Robertson T, Huxman TE, Zak J, Loik ME y Tissue D** (2007) Effects of an increase in summer precipitation on leaf, soil, and ecosystem fluxes of CO₂ and H₂O in a sotol grassland in Big Bend National Park, Texas. *Oecologia* **151**: 704-718
- Patrick ZA** (1955) The peach replant problem in Ontario. II. Toxic substances from microbial decomposition products of peach root residues. *Canadian Journal of Botany* **33**: 461-486
- Paz-Ferreiro J, Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Seoane S y Gil-Sotres F** (2009) Biochemical properties in managed grassland soils in a temperate humid zone: modifications of soil quality as a consequence of intensive grassland use. *Biology and Fertility of Soils* **45**: 711-722
- Paz-Ferreiro J, Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Seoane S y Gil-Sotres F** (2010) Effect of management and climate on biochemical properties of grassland soils from Galicia (NW Spain). *European Journal of Soil Biology* **46**: 136-143
- Paz-Ferreiro J, Trasar-Cepeda C, Leirós MD, Seoane S y Gil-Sotres F** (2011) Intra-annual variation in biochemical properties and the biochemical equilibrium of different grassland soils under contrasting management and climate. *Biology and Fertility of Soils* **47**: 633-645
- Pearse SJ, Veneklaas EJ, Cawthray GR, Bolland MDA y Lambers H** (2006) Carboxylate release of wheat, canola and 11 grain legume species as affected by phosphorus status. *Plant and Soil* **288**: 127-139

- Peix A, Rivas-Boyero AA, Mateos PF, Rodríguez-Barrueco C, Martínez-Molina E y Velázquez E** (2001) Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 103-110
- Pell M, Stenstrom J y Granhall U** (2006) Soil respiration. In J Bloem, DW Hopkins, A Benedetti, eds, Microbiological methods for assessing soil quality. CABI Publishing, Massachusetts, Cambridge, pp 117-126
- Peng Y, Zhang X, Deng Y y Ma X** (2008) Evaluation of genetic diversity in wild orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) based on AFLP markers. *Hereditas* **145**: 174-181
- Pereira JS, Mateus JA, Aires LM, Pita G, Pio C, David JS, Andrade V, Banza J, David TS, Paco TA y Rodrigues A** (2007) Net ecosystem carbon exchange in three contrasting Mediterranean ecosystems - the effect of drought. *Biogeosciences* **4**: 791-802
- Peris Álvarez S** (1992) Aves. In JM Gómez Gutiérrez, ed, El libro de las dehesas salmantinas. Junta de Castilla y León, Salamanca, Spain, pp 283-335
- Pettit NM, Smith ARJ, Freedman RB y Burns RG** (1976) Soil urease: Activity, stability and kinetic properties. *Soil Biology and Biochemistry* **8**: 479-484
- Plaxton WC y Tran HT** (2011) Metabolic Adaptations of Phosphate-Starved Plants. *Plant Physiology* **156**: 1006-1015
- Polacco JC** (1977) Is nickel a universal component of plant ureases. *Plant Science Letters* **10**: 249-255
- Powers JS, Corre MD, Twine TE y Veldkamp E** (2011) Geographic bias of field observations of soil carbon stocks with tropical land-use changes precludes spatial extrapolation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 6318-6322
- Powelson DS y Barraclough D** (1993) Mineralization and assimilation in soil-plant system. In R Knowles, TH Blackburn, eds, Isotopic Techniques in Plant, soil and Aquatic Biology, Nitrogen Isotope Techniques. Academic Press, San Diego, California, pp 209-242
- Pozo MJ y Azcón-Aguilar C** (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 393-398
- Prietzl J** (2001) Arylsulfatase activities in soils of the Black Forest/Germany - seasonal variation and effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fertilization. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 1317-1328
- Priha O, Grayston SJ, Pennanen T y Smolander A** (1999) Microbial activities related to C and N cycling and microbial community structure in the rhizospheres of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings in an organic and mineral soil. *FEMS Microbiology Ecology* **30**: 187-199
- Puglisi E, Nicelli M, Capri E, Trevisan M y Del Re AAM** (2005) A soil alteration index based on phospholipid fatty acids. *Chemosphere* **61**: 1548-1557
- Quilchano C y Marañón T** (2002) Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. *Biology and Fertility of Soils* **35**: 102-107

- Quiquampoix H y Mousain D** (2005) Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. In BL Turner, E Frossard, DS Baldwin, eds, *Organic phosphorus in the environment*. CAB International, Wallingford, UK, pp 89-112
- R Development Core Team R** (2009) R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>
- Rastin N, Rosenplanter K y Huttermann A** (1988) Seasonal variation of enzyme activity and their dependence on certain soil factors in a beech forest soil. *Soil Biology & Biochemistry* **20**: 637-642
- Recous S, Fresneau C, Faurie G y Mary B** (1988) The fate of labeled ¹⁵N urea and ammonium-nitrate applied to a winter-wheat crop. 1. Nitrogen transformations in the soil. *Plant and Soil* **112**: 205-214
- Redecker D** (2002) New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record. *Research in Microbiology* **153**: 125-130
- Reid TW, Wilson IB y Paul DB** (1971) 17 E. coli Alkaline Phosphatase. In *The Enzymes*, Vol Volume 4. Academic Press, pp 373-415
- Reyes-López J, Ruiz N y Fernández-Haeger J** (2003) Community structure of ground-ants: the role of single trees in a Mediterranean pastureland. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **24**: 195-202
- Reynolds SG, Batello C, Baas S y Mack S** (2005) Grassland and forage to improve livelihoods and reduce poverty,
- Richardson AE** (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 897-906
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM y Prigent-Combaret C** (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* **321**: 305-339
- Richardson AE y Simpson RJ** (2011) Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. *Plant Physiology* **156**: 989-996
- Richardson SJ, Peltzer DA, Allen RB, McGlone MS y Parfitt RL** (2004) Rapid development of phosphorus limitation in temperate rainforest along the Franz Josef soil chronosequence. *Oecologia* **139**: 267-276
- Rivas R, García-Fraile P y Velázquez E** (2011) Taxonomía y filogenia de los rizobia. In M Megías, R Rivilla, MJ Soto, MJ Delgado, E González, PF Mateos, M León, B Rodelas, E Bedmar, eds, *Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Granada, Spain, pp 255-267
- Roberts SK** (2006) Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist* **169**: 647-666
- Rockstrom J, Steffen W, Noone K, Persson A, Chapin FSI, Lambin EF, Lenton TM, Scheffer M, Folke C, Schellnhuber HJ, Nykvist B, de Wit CA, Hughes T, van der Leeuw S, Rodhe H, Sorlin S, Snyder PK, Costanza R, Svedin U, Falkenmark M, Karlberg L, Corell RW, Fabry VJ, Hansen J, Walker B, Liverman D, Richardson K, Crutzen P y Foley JA** (2009) A safe operating space for humanity. *Nature* **461**: 472-475

- Rodrigues EP, Rodrigues LS, de Oliveira ALM, Baldani VLD, Teixeira KRD, Urquiaga S y Reis VM (2008) *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil* **302**: 249-261
- Ronning CM, Losada L, Brinkac L, Inman J, Ulrich RL, Schell M, Nierman WC y DeShazer D (2010) Genetic and phenotypic diversity in *Burkholderia*: contributions by prophage and phage-like elements. *BMC Microbiology* **10**
- Roscher C, Temperton VM, Scherer-Lorenzen M, Schmitz M, Schumacher J, Schmid B, Buchmann N, Weisser WW y Schulze ED (2005) Overyielding in experimental grassland communities - irrespective of species pool or spatial scale. *Ecology Letters* **8**: 419-429
- Ryan PR, Delhaize E y Jones DL (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 527-560
- Ryan PR, Dessaux Y, Thomashow LS y Weller DM (2009) Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant and Soil* **321**: 363-383
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ y Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* **278**: 1-9
- 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
- Sanon A, Andrianjaka ZN, Prin Y, Bally R, Thioulouse J, Comte G y Duponnois R (2009) Rhizosphere microbiota interferes with plant-plant interactions. *Plant and Soil* **321**: 259-278
- 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
- Saviozzi A, Levi-Minzi R, Cardelli R y Riffaldi R (2001) A comparison of soil quality in adjacent cultivated, forest and native grassland soils. *Plant and Soil* **233**: 251-259
- Savka MA, Dessaux Y, Oger P y Rossbach S (2002) Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 866-874
- Schachtman DP, Reid RJ y Ayling SM (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* **116**: 447-453
- Scherer-Lorenzen M, Palmborg C, Prinz A y Schulze ED (2003) The role of plant diversity and composition for nitrate leaching in grasslands. *Ecology* **84**: 1539-1552
- Schimel JP y Clein JS (1996) Microbial response to freeze-thaw cycles in tundra and taiga soils. *Soil Biology & Biochemistry* **28**: 1061-1066
- Schimel JP y Weintraub MN (2003) The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology & Biochemistry* **35**: 549-563
- Schimel JP y Bennett J (2004) Nitrogen mineralization: Challenges of a changing paradigm. *Ecology* **85**: 591-602
- Schlesinger WH y Andrews JA (2000) Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry* **48**: 7-20

- Schmitt A y Glaser B** (2011) Organic matter dynamics in a temperate forest soil following enhanced drying. *Soil Biology & Biochemistry* **43**: 478-489
- Scholten LC y Timmermans CWM** (1996) Natural radioactivity in phosphate fertilizers. In C Rodríguez-Barrueco, ed, *Fertilizers and Environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 171-175
- Schutter ME, Sandeno JM y Dick RP** (2001) Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. *Biology and Fertility of Soils* **34**: 397-410
- Scott JJ, Budenberg KJ, Suen G, Wixon DL, Balsler TC y Currie CR** (2010) Microbial Community Structure of Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens and Refuse Dumps. *PLoS One* **5**
- Seeling B y Zasoski RJ** (1993) Microbial effects in maintaining organic and inorganic solution phosphorus concentrations in a grassland topsoil. *Plant Soil* **148**: 277-284
- Sekiya N y Yano K** (2002) Water acquisition from rainfall and groundwater by legume crops developing deep rooting systems determined with stable hydrogen isotope compositions of xylem waters. *Field Crops Research* **78**: 133-139
- Seldin L, Rosado AS, da Cruz DW, Nobrega A, van Elsas JD y Paiva E** (1998) Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3860-3868
- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N y Kennedy C** (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 358-366
- Sharma S, Aneja MK, Mayer J, Munch JC y Schloter M** (2005) Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. *Microbial Ecology* **49**: 407-415
- Shen JB, Yuan LX, Zhang JL, Li HG, Bai ZH, Chen XP, Zhang WF y Zhang FS** (2011) Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology* **156**: 997-1005
- Singh BK, Munro S, Potts JM y Millard P** (2007) Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology* **36**: 147-155
- Sinsabaugh RL, Antibus RK y Linkins AE** (1991) An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **34**: 43-54
- Sinsabaugh RL** (1994) Enzymatic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils* **17**: 69-74
- Sinsabaugh RL, Gallo ME, Lauber C, Waldrop MP y Zak DR** (2005) Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. *Biogeochemistry* **75**: 201-215
- Sinsabaugh RL, Lauber CL, Weintraub MN, Ahmed B, Allison SD, Crenshaw C, Contosta AR, Cusack D, Frey S, Gallo ME, Gartner TB, Hobbie SE, Holland K, Keeler BL, Powers JS, Stursova M, Takacs-Vesbach C, Waldrop MP, Wallenstein MD, Zak DR y Zeglin LH** (2008) Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters* **11**: 1252-1264

- Skinner RH, Gustine DL y Sanderson MA** (2004) Growth, water relations, and nutritive value of pasture species mixtures under moisture stress. *Crop Science* **44**: 1361-1369
- Skujins JJ** (1967) Enzymes in soil. In AD McLaren, GH Peterson, eds, Soil biochemistry. Vo. 1, Vol 1. Marcel Dekker, New York, pp 371-414
- Sliwinski MK y Goodman RM** (2004) Comparison of crenarchaeal consortia inhabiting the rhizosphere of diverse terrestrial plants with those in bulk soil in native environments. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 1821-1826
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H y 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
- Smith SE y Read DJ** (1997) Mycorrhizal Symbiosis (Second Edition). Academic Press, London
- Smith SE, Jakobsen I, Gronlund M y Smith FA** (2011) Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. *Plant Physiology* **156**: 1050-1057
- Smith SE y Smith FA** (2011) Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 227-250
- Sojka RE y Upchurch DR** (1999) Reservations regarding the soil quality concept. *Soil Science Society of America Journal* **63**: 1039-1054
- Solans M, Vobis G y Wall LG** (2009) Saprophytic Actinomycetes Promote Nodulation in *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis in the Presence of High N. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**: 106-114
- Song YN, Zhang FS, Marschner P, Fan FL, Gao HM, Bao XG, Sun JH y Li L** (2007) Effect of intercropping on crop yield and chemical and microbiological properties in rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils* **43**: 565-574
- Sorensen J, Nicolaisen MH, Ron E y Simonet P** (2009) Molecular tools in rhizosphere microbiology-from single-cell to whole-community analysis. *Plant and Soil* **321**: 483-512
- Spaepen S, Vanderleyden J y Okon Y** (2009) Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. *Advances in Botanical Research* **51**: 283-320
- Sparling GP, Speir TW y Whale KN** (1986) Changes in microbial biomass-C, ATP content, soil phospho-monoesterase and phospho-diesterase activity following air-drying of soils. *Soil Biology & Biochemistry* **18**: 363-370
- Spehn EM, Joshi J, Schmid B, Alphei J y Körner C** (2000) Plant diversity effects on soil heterotrophic activity in experimental grassland ecosystems. *Plant and Soil* **224**: 217-230
- Spehn EM, Scherer-Lorenzen M, Schmid B, Hector A, Caldeira MC, Dimitrakopoulos PG, Finn JA, Jumpponen A, O'Donovan G, Pereira JS, Schulze ED, Troumbis AY y Körner C** (2002) The role of legumes as a component of biodiversity in a cross-European study of grassland biomass nitrogen. *Oikos* **98**: 205-218

- Speir TW y Ross DJ** (1978) Soil phosphatase and sulphatase. In RG Burns, ed, Soil Enzymes. Academic Press, London, pp 197-250
- Staddon WJ, Duchesne LC y Trevors JT** (1998) Acid phosphatase, alkaline phosphatase and arylsulfatase activities in soils from a jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) ecosystem after clear-cutting, prescribed burning, and scarification. *Biology and Fertility of Soils* **27**: 1-4
- Stafford WHL, Baker GC, Brown SA, Burton SG y Cowan DA** (2005) Bacterial diversity in the rhizosphere of Proteaceae species. *Environmental Microbiology* **7**: 1755-1768
- Stark CH, Condrón LM, O'Callaghan M, Stewart A y Di HJ** (2008) Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 1352-1363
- Steenwerth KL, Jackson LE, Carlisle EA y Scow KM** (2006) Microbial communities of a native perennial bunchgrass do not respond consistently across a gradient of land-use intensification. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 1797-1811
- Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M y de Haan C** (2006) Livestock's long shadow: environmental issues and options. FAO, Rome, Italy
- Stromberger M, Shah Z y Westfall D** (2007) Soil microbial communities of no-till dryland agroecosystems across an evapotranspiration gradient. *Applied Soil Ecology* **35**: 94-106
- Sugiyama S-i, Zabed HM y Okubo A** (2008) Relationships between soil microbial diversity and plant community structure in seminatural grasslands. *Grassland Science* **54**: 117-124
- Sun YM, Zhang NN, Wang ET, Yuan HL, Yang JS y Chen WX** (2009) Influence of intercropping and intercropping plus rhizobial inoculation on microbial activity and community composition in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and Siberian wild rye (*Elymus sibiricus* L.). *FEMS Microbiology Ecology* **70**: 218-226
- Swanson MM, Fraser G, Daniell TJ, Torrance L y Gregory PJ** (2009) Viruses in soils: morphological diversity and abundance in the rhizosphere. *Annals of Applied Biology* **155**: 51-60
- Tabatabai MA y Bremner JM** (1970a) Arylsulfatase activity of soils. *Soil Science Society of America Proceedings* **34**: 225-229
- Tabatabai MA** (1977) Effects of trace elements on urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **9**: 9-13
- Tabatabai MA** (1982) Soil enzymes. In AL Page, EM Miller, DR Keeney, eds, Methods of Soils Analysis. Part 2 Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 903-947
- Tabatabai MA** (1994) Soil Enzymes. In RW Weaver, JS Angle, PS Bottomley, eds, Methods of Soil Analysis. Part 2, Microbiological and Biochemical Properties. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp 775-833
- Tamames J, Abellan JJ, Pignatelli M, Camacho A y Moya A** (2010) Environmental distribution of prokaryotic taxa. *BMC Microbiology* **10**

- Tan FX, Wang JW, Chen ZN, Feng YJ, Chi GL y Rehman SU** (2011) Assessment of the arbuscular mycorrhizal fungal community in roots and rhizosphere soils of Bt corn and their non-Bt isolines. *Soil Biology & Biochemistry* **43**: 2473-2479
- Tang C, McLay CDA y Barton L** (1997) A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **37**: 563-570
- Tarafdar JC y Jungk A** (1987) Phosphatase-activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils* **3**: 199-204
- Tarafdar JC y Claassen N** (1988) Organic phosphorus-compounds as a phosphorus source for higher-plants through the activity of phosphatases produced by plant-roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* **5**: 308-312
- Temperton VM, Mwangi PN, Scherer-Lorenzen M, Schmid B y Buchmann N** (2007) Positive interactions between nitrogen-fixing legumes and four different neighbouring species in a biodiversity experiment. *Oecologia* **151**: 190-205
- Tilman D** (1999) The ecological consequences of changes in biodiversity: A search for general principles. *Ecology* **80**: 1455-1474
- Tilman D, Fargione J, Wolff B, D'Antonio C, Dobson A, Howarth R, Schindler D, Schlesinger WH, Simberloff D y Swackhamer D** (2001a) Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* **292**: 281-284
- Tilman D, Reich PB, Knops J, Wedin D, Mielke T y Lehman C** (2001b) Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Science* **294**: 843-845
- Trasar-Cepeda C, Gil-Sotres F y Leiros MC** (2007) Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 311-319
- Trasar-Cepeda MC y Gil-Sotres F** (1987) Phosphatase activity in acid high organic matter soils in Galicia (NW Spain). *Soil Biology & Biochemistry* **19**: 281-287
- Trenbath BR y Brady NC** (1974) Biomass Productivity of Mixtures. In *Advances in Agronomy*, Vol Volume 26. Academic Press, pp 177-210
- Trevors JT** (1984) Effect of substrate concentration, inorganic nitrogen, O₂ concentration, temperature and pH on dehydrogenase-activity in soil. *Plant and Soil* **77**: 285-293
- Trujillo ME, Alonso-Vega P, Rodríguez R, Carro L, Cerdá E, Alonso P y Martínez-Molina E** (2010) The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *ISME Journal* **4**: 1265-1281
- Truu M, Truu J y Ivask M** (2008) Soil microbiological and biochemical properties for assessing the effect of agricultural management practices in Estonian cultivated soils. *European Journal of Soil Biology* **44**: 231-237
- Turner BL, Paphazy MJ, Haygarth PM y McKelvie ID** (2002) Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **357**: 449-469
- Turner BL y Haygarth PM** (2005) Phosphatase activity in temperate pasture soils: Potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. *Science of the Total Environment* **344**: 27-36
- USDA** (2012) Natural Resources Conservation Service. Plants Databases. In, Vol 2012. United States Department of Agriculture, Washington, p <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=DAGL>

- Valverde A, Burgos A, Fiscella T, Rivas R, Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C, Cervantes E, Chamber M y Igual JM** (2006) Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. *Plant and Soil* **287**: 43-50
- Valverde A y Igual JM** (2011) El género *Frankia*: el otro gran protagonista. In M Megías, R Rivilla, MJ Soto, MJ Delgado, E González, PF Mateos, M León, B Rodelas, E Bedmar, eds, Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Granada, Spain, pp 283-295
- Van Breemen N y Finzi AC** (1998) Plant-soil interactions: ecological aspects and evolutionary implications. *Biogeochemistry* **42**: 1-19
- van der Heijden MGA y Horton TR** (2009) Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* **97**: 1139-1150
- van der Wal A, de Boer W, Smant W y van Veen JA** (2007) Initial decay of woody fragments in soil is influenced by size, vertical position, nitrogen availability and soil origin. *Plant and Soil* **301**: 189-201
- van Eekeren N, Bos M, de Wit J, Keidel H y Bloem J** (2010) Effect of individual grass species and grass species mixtures on soil quality as related to root biomass and grass yield. *Applied Soil Ecology* **45**: 275-283
- van Meeteren MM, Tietema A, van Loon EE y Verstraten JM** (2008) Microbial dynamics and litter decomposition under a changed climate in a Dutch heathland. *Applied Soil Ecology* **38**: 119-127
- van Overbeek L y van Elsas JD** (2008) Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* **64**: 283-296
- Vance CP, Uhde-Stone C y Allan DL** (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* **157**: 423-447
- Vansuyt G, Robin A, Briat JF, Curie C y Lemanceau P** (2007) Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 441-447
- 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
- Velázquez E, Mateos PF, Trujillo ME, Rivas R y Martínez-Molina E** (2006) Diversidad de bacterias rizoendosimbióticas de plantas. In E Bedmar, J González, C Lluch, B Rodelas, eds, Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Granada, Spain, pp 45-52
- Vicente-Villardón JL** (2010) MULTBILOT: A package for Multivariate Analysis using Biplots. Departamento de Estadística. Universidad de Salamanca. (<http://biplot.usal.es/ClassicalBiplot/introduction.html>).
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL y Lorito M** (2008) Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 1-10

- Vitousek PM y Farrington H** (1997) Nutrient limitation and soil development: Experimental test of a biogeochemical theory. *Biogeochemistry* **37**: 63-75
- Vitousek PM, Naylor R, Crews T, David MB, Drinkwater LE, Holland E, Johnes PJ, Katzenberger J, Martinelli LA, Matson PA, Nziguheba G, Ojima D, Palm CA, Robertson GP, Sanchez PA, Townsend AR y Zhang FS** (2009) Nutrient Imbalances: Pollution Remains Response. *Science* **326**: 665-666
- von Mersi W y Schinner F** (1991) An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazolium chloride. *Biology and Fertility of Soils* **11**: 216-220
- von Rad U, Klein I, Dobrev PI, Kottova J, Zazimalova E, Fekete A, Hartmann A, Schmitt-Kopplin P y Durner J** (2008) Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* **229**: 73-85
- Wallenstein MD y Weintraub MN** (2008) Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 2098-2106
- Wallenstein MD, McMahon SK y Schimel JP** (2009) Seasonal variation in enzyme activities and temperature sensitivities in Arctic tundra soils. *Global Change Biology* **15**: 1631-1639
- Wang D, Marschner P, Solaiman Z y Rengel Z** (2007a) Belowground interactions between intercropped wheat and Brassicas in acidic and alkaline soils. *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 961-971
- Wang D, Marschner P, Solaiman Z y Rengel Z** (2007b) Growth, P uptake and rhizosphere properties of intercropped wheat and chickpea in soil amended with iron phosphate or phytate. *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 249-256
- Wang QK, Wang SL y Liu Y** (2008) Responses to N and P fertilization in a young *Eucalyptus dunnii* plantation: Microbial properties, enzyme activities and dissolved organic matter. *Applied Soil Ecology* **40**: 484-490
- Wardle DA y Ghani A** (1995) A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biology & Biochemistry* **27**: 1601-1610
- Wardle DA** (1998) Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: A global-scale synthesis. *Soil Biology & Biochemistry* **30**: 1627-1637
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, van der Putten WH y Wall DH** (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**: 1629-1633
- Wassen MJ, Venterink HO, Lapshina ED y Tanneberger F** (2005) Endangered plants persist under phosphorus limitation. *Nature* **437**: 547-550
- Whalen JK y Warman PR** (1996) Arylsulfatase activity in soil and soil extracts using natural and artificial substrates. *Biology and Fertility of Soils* **22**: 373-378
- White DC** (1993) *In situ* measurement of microbial biomass, community structure and nutritional status. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **344**: 59-67
- Whitelaw MA, Harden TJ y Helyar KR** (1999) Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 655-665

- Williams MA y Rice CW** (2007) Seven years of enhanced water availability influences the physiological, structural, and functional attributes of a soil microbial community. *Applied Soil Ecology* **35**: 535-545
- Williamson KE, Radosevich M y Wommack KE** (2005) Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3119-3125
- Wortmann CS, Quincke JA, Drijber RA, Mamo M y Franti T** (2008) Soil microbial community change and recovery after one-time tillage of continuous no-till. *Agronomy Journal* **100**: 1681-1686
- Wright AL y Reddy KR** (2001) Phosphorus loading effects on extracellular enzyme activity in everglades wetland soils. *Soil Science Society of America Journal* **65**: 588-595
- Wright IA, Jones JR, Davies DA, Davidson GR y Vale JE** (2006) The effect of sward surface height on the response to mixed grazing by cattle and sheep. *Animal Science* **82**: 271-276
- Xie W-G, Zhang X-Q, Cai H-W, Liu W y Peng Y** (2010) Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Biochemical Systematics and Ecology* **38**: 740-749
- Xu MM, Galhano R, Wiemann P, Bueno E, Tiernan M, Wu W, Chung IM, Gershenson J, Tudzynski B, Sesma A y Peters RJ** (2012) Genetic evidence for natural product-mediated plant-plant allelopathy in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* **193**: 570-575
- Yadav RS y Tarafdar JC** (2001) Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biology and Fertility of Soils* **34**: 140-143
- Yakovchenko V, Sikora LJ y Kaufman DD** (1996) A biologically based indicator of soil quality. *Biology and Fertility of Soils* **21**: 245-251
- Yang J, Kloepper JW y Ryu CM** (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* **14**: 1-4
- Yang RY, Tang JJ, Chen X y Hu SJ** (2007) Effects of coexisting plant species on soil microbes and soil enzymes in metal lead contaminated soils. *Applied Soil Ecology* **37**: 240-246
- Yang Z-x, Liu S-q, Zheng D-w y Feng S-d** (2006) Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences* **18**: 1135-1141
- Yeates GW, Bardgett RD, Cook R, Hobbs PJ, Bowling PJ y Potter JF** (1997) Faunal and microbial diversity in three Welsh grassland soils under conventional and organic management regimes. *Journal of Applied Ecology* **34**: 453-470
- Zak DR, Pregitzer KS, Curtis PS y Holmes WE** (2000) Atmospheric CO₂ and the composition and function of soil microbial communities. *Ecological Applications* **10**: 47-59
- Zak JC, Willig MR, Moorhead DL y Wildman HG** (1994) Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology & Biochemistry* **26**: 1101-1108
- Zantua MI y Bremner JM** (1977) Stability of urease in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **9**: 135-140

-
- Zeller V, Bardgett RD y Tappeiner U** (2001) Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 639-649
- Zelles L, Bai QY, Beck T y Beese F** (1992) Signature fatty-acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agriculture soils. *Soil Biology & Biochemistry* **24**: 317-323
- Zelles L** (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* **29**: 111-129
- Zhao F y McGrath SP** (1994) Extractable sulfate and organic sulfur in soils and their availability to plants. *Plant and Soil* **164**: 243-250
- Zogg GP, Zak DR, Ringelberg DB, MacDonald NW, Pregitzer KS y White DC** (1997) Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Science Society of America Journal* **61**: 475-481
- Zvyagintsev DG, Zenova GM, Doroshenko EA, Gryadunova AA, Gracheva TA y Sudnitsyn IJ** (2007) Actinomycete growth in conditions of low moisture. *Biology Bulletin* **34**: 242-247

ANEXOS

Datos climatológicos mensuales de media de máximas, mínimas y medias de temperatura y humedad relativa, y de precipitación en la finca experimental Muñovela (Agencia Estatal de Meteorología; Delegación territorial de Castilla y León, Valladolid).

Año	Mes	Temperatura (°C)			Humedad (%)			Precipitación (mm)
		máxima	mínima	media	máxima	mínima	media	
1999-2008	enero	8,87	-0,60	4,05	92,79	58,54	75,66	35,1
	febrero	11,66	-0,25	5,69	94,44	52,26	73,35	27,0
	marzo	13,99	1,90	7,94	92,21	46,27	69,24	39,2
	abril	15,99	2,89	9,45	92,11	46,55	69,33	38,1
	mayo	20,78	6,45	13,65	90,84	40,72	65,78	39,7
	junio	24,95	9,28	19,19	85,56	32,75	59,15	14,5
	julio	29,91	11,62	20,83	82,24	30,47	56,35	7,5
	agosto	29,50	11,91	20,71	81,42	31,51	56,47	16,6
	septiembre	25,18	9,26	17,22	86,63	37,39	62,01	29,7
	octubre	18,44	7,05	12,71	93,09	48,12	70,60	72,5
	noviembre	11,22	1,53	6,27	93,88	58,60	76,24	33,7
	diciembre	8,83	-0,59	4,06	93,92	61,11	77,52	36,2
ANUAL		18,42	5,07	11,81	89,93	45,36	67,64	389,8
2009	enero	7,31	-0,55	3,38	98,81	72,48	85,65	50,4
	febrero	11,14	-1,98	4,58	97,61	51,93	74,77	17,8
	marzo	16,65	-0,46	8,09	92,32	34,26	63,29	9,8
	abril	15,23	1,81	8,52	94,90	41,14	68,02	28,6
	mayo	25,39	5,34	15,36	85,79	23,71	54,75	0
	junio	26,96	11,20	19,08	87,50	31,00	59,25	13,2
	julio	29,78	11,51	20,65	76,87	22,40	49,63	0,8
	agosto	31,12	13,11	22,11	79,63	24,97	52,30	17,8
	septiembre	25,43	9,16	17,30	81,03	30,27	55,65	10,4
	octubre	20,94	7,32	14,13	91,74	45,58	68,66	32,6
	noviembre	13,80	6,05	9,92	96,48	61,00	78,74	16,8
	diciembre	7,61	-0,77	3,42	97,68	73,00	85,34	41,4
ANUAL		19,28	5,14	12,21	90,03	42,64	66,34	Total: 239,60
2010	enero	7,59	0,73	4,16	97,29	70,35	83,82	52,4
	febrero	8,32	-0,14	4,09	96,82	64,86	80,84	83,8
	marzo	11,68	1,82	6,75	94,94	54,52	74,73	65,6
	abril	17,78	4,32	11,05	95,63	45,20	70,42	42,6
	mayo	19,09	5,10	12,10	93,19	42,23	67,71	30,8
	junio	25,13	9,87	17,50	90,57	36,63	63,60	28,4
	julio	31,82	13,73	22,77	79,55	24,32	51,94	3,2
	agosto	30,90	13,21	22,05	72,26	23,39	47,82	0
	septiembre	25,08	10,03	17,56	90,17	36,53	63,35	55,6
	octubre	18,11	4,04	11,07	91,74	40,29	66,02	32,4
	noviembre	10,96	1,38	6,17	97,47	62,60	80,03	38,4
	diciembre	8,52	0,44	4,48	97,65	68,32	82,98	117
ANUAL		17,92	5,38	11,65	91,44	47,44	69,44	Total: 550,20

Biomasa microbiana total (nmol ac. graso g⁻¹ suelo). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	65,30 \pm 3,84	57,78	72,83	77,66 \pm 12,79	52,60	102,72
		T2 - G75:L25	56,94 \pm 2,45	52,14	61,75	50,65 \pm 5,65	39,57	61,73
		T3 - G50:L50	58,51 \pm 5,53	47,66	69,35	70,34 \pm 9,24	52,22	88,45
		T4 - G25:L75	55,81 \pm 4,63	46,72	64,89	56,85 \pm 7,28	42,58	71,13
		T5 - L100	46,05 \pm 5,40	35,46	56,64	55,66 \pm 3,58	48,64	62,68
	+ P	T1 - G100	80,54 \pm 3,22	74,24	86,85	78,01 \pm 17,74	43,24	112,77
		T2 - G75:L25	63,18 \pm 3,50	56,32	70,05	65,44 \pm 10,90	44,08	86,81
		T3 - G50:L50	50,31 \pm 1,53	47,30	53,31	53,95 \pm 5,78	42,62	65,28
		T4 - G25:L75	60,50 \pm 1,82	56,94	64,07	61,10 \pm 10,56	40,41	81,79
		T5 - L100	57,65 \pm 3,27	51,24	64,05	51,34 \pm 6,28	39,04	63,65
Verano	- P	T1 - G100	58,98 \pm 3,42	52,28	65,68	69,66 \pm 3,87	62,07	77,25
		T2 - G75:L25	44,96 \pm 3,16	38,77	51,15	40,97 \pm 9,12	23,10	58,85
		T3 - G50:L50	49,62 \pm 5,29	39,26	59,98	55,16 \pm 1,17	52,87	57,45
		T4 - G25:L75	44,52 \pm 7,45	29,92	59,13	49,71 \pm 6,45	37,07	62,35
		T5 - L100	36,29 \pm 10,68	15,36	57,22	41,81 \pm 8,34	25,47	58,15
	+ P	T1 - G100	70,50 \pm 8,85	53,16	87,83	91,36 \pm 12,81	66,26	116,46
		T2 - G75:L25	53,27 \pm 8,01	37,56	68,98	54,31 \pm 5,90	42,75	65,86
		T3 - G50:L50	32,26 \pm 3,17	26,04	38,48	56,10 \pm 11,12	34,30	77,91
		T4 - G25:L75	47,42 \pm 3,48	40,60	54,24	49,92 \pm 4,09	41,90	57,93
		T5 - L100	49,86 \pm 7,16	35,81	63,90	39,69 \pm 1,76	36,24	43,14
Otoño	- P	T1 - G100	53,02 \pm 11,74	30,01	76,03	95,30 \pm 13,00	69,82	120,77
		T2 - G75:L25	53,48 \pm 4,70	44,28	62,68	45,66 \pm 5,79	34,31	57,01
		T3 - G50:L50	41,88 \pm 4,94	32,20	51,56	44,69 \pm 2,66	39,48	49,90
		T4 - G25:L75	49,18 \pm 4,56	40,24	58,12	41,54 \pm 5,42	30,92	52,16
		T5 - L100	45,71 \pm 2,25	41,30	50,12	47,35 \pm 4,71	38,12	56,59
	+ P	T1 - G100	73,47 \pm 4,63	64,39	82,54	97,78 \pm 17,82	62,86	132,70
		T2 - G75:L25	49,76 \pm 2,87	44,13	55,38	50,15 \pm 5,25	39,85	60,45
		T3 - G50:L50	48,50 \pm 7,67	33,46	63,54	38,09 \pm 7,81	22,79	53,39
		T4 - G25:L75	50,23 \pm 4,24	41,92	58,54	54,25 \pm 4,14	46,12	62,37
		T5 - L100	39,10 \pm 6,13	27,09	51,10	43,36 \pm 3,23	37,03	49,69

Abundancia relativa de bacterias Gram positivas (%mol). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	11,03 \pm 0,67	9,71	12,35	9,77 \pm 0,14	9,50	10,04
		T2 - G75:L25	13,74 \pm 0,65	12,46	15,02	13,98 \pm 1,02	11,97	15,98
		T3 - G50:L50	12,56 \pm 0,67	11,23	13,88	13,60 \pm 0,60	12,42	14,78
		T4 - G25:L75	14,56 \pm 0,98	12,64	16,49	14,40 \pm 0,66	13,10	15,69
		T5 - L100	15,83 \pm 0,72	14,42	17,23	15,69 \pm 0,62	14,48	16,89
	+ P	T1 - G100	9,90 \pm 0,45	9,02	10,79	9,06 \pm 0,54	8,01	10,11
		T2 - G75:L25	13,13 \pm 0,40	12,34	13,92	13,55 \pm 0,50	12,56	14,53
		T3 - G50:L50	14,11 \pm 0,62	12,90	15,33	15,27 \pm 0,52	14,25	16,29
		T4 - G25:L75	14,11 \pm 0,44	13,25	14,97	14,49 \pm 0,62	13,28	15,70
		T5 - L100	14,75 \pm 0,96	12,87	16,62	15,72 \pm 0,98	13,79	17,64
Verano	- P	T1 - G100	10,11 \pm 0,42	9,30	10,93	9,45 \pm 0,37	8,72	10,18
		T2 - G75:L25	15,62 \pm 0,91	13,83	17,41	14,76 \pm 0,46	13,86	15,65
		T3 - G50:L50	13,99 \pm 0,54	12,94	15,04	14,73 \pm 0,24	14,25	15,20
		T4 - G25:L75	15,75 \pm 0,88	14,02	17,49	15,02 \pm 0,71	13,62	16,41
		T5 - L100	16,69 \pm 0,93	14,87	18,51	17,10 \pm 0,49	16,14	18,06
	+ P	T1 - G100	10,05 \pm 0,52	9,03	11,08	8,91 \pm 0,69	7,56	10,25
		T2 - G75:L25	14,42 \pm 0,96	12,55	16,30	14,41 \pm 0,75	12,93	15,88
		T3 - G50:L50	15,64 \pm 0,67	14,33	16,95	15,93 \pm 0,46	15,03	16,82
		T4 - G25:L75	15,15 \pm 0,41	14,34	15,95	16,67 \pm 0,60	15,49	17,85
		T5 - L100	15,83 \pm 0,94	13,98	17,68	17,56 \pm 0,32	16,93	18,19
Otoño	- P	T1 - G100	9,36 \pm 0,68	8,03	10,69	7,58 \pm 0,28	7,04	8,13
		T2 - G75:L25	14,45 \pm 0,93	12,63	16,27	14,30 \pm 1,04	12,26	16,35
		T3 - G50:L50	14,30 \pm 0,32	13,67	14,93	14,85 \pm 0,44	13,98	15,71
		T4 - G25:L75	14,95 \pm 0,44	14,10	15,81	15,10 \pm 0,41	14,30	15,90
		T5 - L100	17,42 \pm 0,52	16,40	18,44	16,70 \pm 0,59	15,54	17,86
	+ P	T1 - G100	9,67 \pm 0,30	9,09	10,25	7,44 \pm 0,28	6,89	7,99
		T2 - G75:L25	15,64 \pm 0,54	14,58	16,70	14,04 \pm 0,71	12,65	15,43
		T3 - G50:L50	15,46 \pm 0,87	13,76	17,16	14,95 \pm 0,54	13,88	16,01
		T4 - G25:L75	15,59 \pm 0,54	14,52	16,65	15,15 \pm 0,43	14,30	16,00
		T5 - L100	17,04 \pm 0,51	16,04	18,03	16,96 \pm 0,44	16,09	17,83

Abundancia relativa de Actinobacterias (%mol). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	3,61 \pm 0,21	3,21	4,01	4,34 \pm 0,11	4,13	4,55
		T2 - G75:L25	4,49 \pm 0,11	4,28	4,71	5,31 \pm 0,26	4,80	5,83
		T3 - G50:L50	4,11 \pm 0,23	3,67	4,55	5,33 \pm 0,18	4,98	5,68
		T4 - G25:L75	4,73 \pm 0,44	3,86	5,59	5,15 \pm 0,18	4,80	5,50
		T5 - L100	5,20 \pm 0,22	4,77	5,63	5,95 \pm 0,44	5,10	6,80
	+ P	T1 - G100	3,17 \pm 0,36	2,47	3,87	3,50 \pm 0,33	2,85	4,15
		T2 - G75:L25	4,06 \pm 0,19	3,68	4,43	5,46 \pm 0,29	4,90	6,03
		T3 - G50:L50	4,72 \pm 0,37	3,99	5,44	5,43 \pm 0,25	4,94	5,92
		T4 - G25:L75	4,74 \pm 0,13	4,48	5,01	5,82 \pm 0,59	4,66	6,98
		T5 - L100	4,56 \pm 0,36	3,84	5,27	6,14 \pm 0,92	4,33	7,95
Verano	- P	T1 - G100	3,03 \pm 0,24	2,56	3,51	3,34 \pm 0,20	2,95	3,74
		T2 - G75:L25	4,50 \pm 0,14	4,22	4,78	4,87 \pm 0,13	4,61	5,12
		T3 - G50:L50	4,33 \pm 0,32	3,70	4,96	5,54 \pm 0,19	5,17	5,91
		T4 - G25:L75	4,57 \pm 0,08	4,40	4,73	5,42 \pm 0,10	5,23	5,61
		T5 - L100	5,52 \pm 0,44	4,66	6,37	5,97 \pm 0,17	5,63	6,31
	+ P	T1 - G100	3,15 \pm 0,20	2,75	3,54	3,35 \pm 0,21	2,93	3,77
		T2 - G75:L25	4,19 \pm 0,31	3,59	4,79	5,40 \pm 0,37	4,67	6,13
		T3 - G50:L50	4,96 \pm 0,30	4,38	5,55	5,84 \pm 0,33	5,19	6,49
		T4 - G25:L75	4,49 \pm 0,27	3,95	5,03	5,81 \pm 0,23	5,35	6,27
		T5 - L100	4,98 \pm 0,26	4,48	5,49	6,64 \pm 0,24	6,16	7,11
Otoño	- P	T1 - G100	2,98 \pm 0,13	2,73	3,23	2,98 \pm 0,10	2,78	3,18
		T2 - G75:L25	4,86 \pm 0,28	4,32	5,40	4,82 \pm 0,41	4,02	5,62
		T3 - G50:L50	4,51 \pm 0,25	4,02	5,01	5,08 \pm 0,25	4,58	5,57
		T4 - G25:L75	5,09 \pm 0,36	4,38	5,79	5,00 \pm 0,23	4,55	5,46
		T5 - L100	5,61 \pm 0,23	5,16	6,05	6,14 \pm 0,24	5,66	6,61
	+ P	T1 - G100	3,28 \pm 0,09	3,11	3,45	2,73 \pm 0,04	2,64	2,81
		T2 - G75:L25	5,32 \pm 0,36	4,62	6,03	5,11 \pm 0,47	4,19	6,02
		T3 - G50:L50	5,51 \pm 0,35	4,82	6,21	5,42 \pm 0,51	4,42	6,42
		T4 - G25:L75	5,34 \pm 0,22	4,92	5,76	6,58 \pm 0,95	4,71	8,45
		T5 - L100	5,41 \pm 0,32	4,78	6,03	6,12 \pm 0,10	5,92	6,31

Abundancia relativa de bacterias Gram negativas (%mol). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	14,49 \pm 0,29	13,91	15,06	15,44 \pm 0,49	14,48	16,41
		T2 - G75:L25	17,06 \pm 0,49	16,09	18,02	16,96 \pm 0,57	15,85	18,07
		T3 - G50:L50	17,56 \pm 0,37	16,83	18,29	19,08 \pm 0,31	18,48	19,69
		T4 - G25:L75	17,81 \pm 0,97	15,91	19,70	18,94 \pm 0,59	17,78	20,11
		T5 - L100	19,02 \pm 0,47	18,10	19,94	19,07 \pm 0,39	18,31	19,82
	+ P	T1 - G100	13,88 \pm 0,52	12,86	14,89	13,54 \pm 0,57	12,42	14,65
		T2 - G75:L25	16,43 \pm 0,65	15,15	17,71	18,23 \pm 0,59	17,08	19,39
		T3 - G50:L50	16,89 \pm 0,58	15,75	18,02	18,83 \pm 0,76	17,33	20,32
		T4 - G25:L75	17,75 \pm 0,71	16,35	19,15	17,21 \pm 0,49	16,26	18,16
		T5 - L100	18,68 \pm 0,61	17,49	19,88	17,71 \pm 1,82	14,15	21,28
Verano	- P	T1 - G100	13,44 \pm 0,37	12,71	14,16	15,41 \pm 0,72	14,00	16,83
		T2 - G75:L25	17,58 \pm 0,51	16,58	18,58	17,88 \pm 0,17	17,54	18,22
		T3 - G50:L50	16,74 \pm 0,59	15,58	17,90	18,11 \pm 0,68	16,78	19,45
		T4 - G25:L75	17,68 \pm 0,72	16,26	19,09	17,46 \pm 0,79	15,92	19,00
		T5 - L100	18,02 \pm 0,65	16,76	19,29	18,97 \pm 0,38	18,23	19,71
	+ P	T1 - G100	13,39 \pm 0,69	12,04	14,74	12,92 \pm 0,97	11,02	14,81
		T2 - G75:L25	16,80 \pm 0,76	15,31	18,29	17,37 \pm 0,75	15,91	18,84
		T3 - G50:L50	17,92 \pm 1,12	15,73	20,11	18,58 \pm 0,19	18,21	18,95
		T4 - G25:L75	17,20 \pm 0,88	15,48	18,92	18,75 \pm 0,57	17,64	19,86
		T5 - L100	17,57 \pm 0,94	15,73	19,41	19,03 \pm 0,36	18,32	19,75
Otoño	- P	T1 - G100	13,38 \pm 0,81	11,78	14,97	13,17 \pm 0,43	12,33	14,02
		T2 - G75:L25	16,79 \pm 0,43	15,95	17,63	16,94 \pm 0,86	15,25	18,63
		T3 - G50:L50	17,15 \pm 0,31	16,55	17,76	18,54 \pm 0,59	17,39	19,70
		T4 - G25:L75	17,14 \pm 0,39	16,39	17,90	17,86 \pm 0,32	17,24	18,48
		T5 - L100	19,45 \pm 0,35	18,78	20,13	18,81 \pm 0,17	18,48	19,13
	+ P	T1 - G100	13,16 \pm 0,20	12,77	13,54	11,99 \pm 0,22	11,55	12,42
		T2 - G75:L25	17,27 \pm 0,16	16,96	17,58	17,79 \pm 0,51	16,79	18,79
		T3 - G50:L50	17,18 \pm 0,85	15,50	18,86	17,37 \pm 0,73	15,95	18,80
		T4 - G25:L75	17,33 \pm 0,67	16,02	18,64	18,04 \pm 0,38	17,28	18,79
		T5 - L100	18,66 \pm 0,37	17,94	19,39	18,86 \pm 0,65	17,60	20,13

Abundancia relativa de Hongos Saprofitos (%mol). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	14,18 \pm 1,55	11,15	17,22	13,52 \pm 1,51	10,56	16,48
		T2 - G75:L25	15,67 \pm 1,02	13,66	17,67	15,79 \pm 0,87	14,08	17,50
		T3 - G50:L50	17,52 \pm 0,46	16,63	18,42	17,41 \pm 0,96	15,52	19,29
		T4 - G25:L75	17,05 \pm 1,10	14,90	19,20	16,97 \pm 0,74	15,53	18,41
		T5 - L100	19,18 \pm 0,89	17,43	20,92	19,29 \pm 1,18	16,97	21,61
	+ P	T1 - G100	15,90 \pm 0,28	15,35	16,45	12,54 \pm 1,02	10,54	14,54
		T2 - G75:L25	16,08 \pm 1,53	13,08	19,08	15,33 \pm 0,86	13,65	17,02
		T3 - G50:L50	15,77 \pm 0,68	14,44	17,10	17,10 \pm 0,24	16,63	17,57
		T4 - G25:L75	15,58 \pm 0,74	14,13	17,03	19,65 \pm 3,66	12,47	26,82
		T5 - L100	21,08 \pm 1,31	18,51	23,65	20,40 \pm 1,55	17,36	23,44
Verano	- P	T1 - G100	11,35 \pm 0,69	9,99	12,71	12,27 \pm 0,44	11,41	13,14
		T2 - G75:L25	16,16 \pm 1,12	13,97	18,34	15,29 \pm 1,03	13,27	17,31
		T3 - G50:L50	17,08 \pm 2,22	12,73	21,43	16,53 \pm 0,38	15,79	17,27
		T4 - G25:L75	16,11 \pm 0,86	14,41	17,80	16,81 \pm 1,60	13,67	19,95
		T5 - L100	17,41 \pm 0,75	15,94	18,89	19,39 \pm 1,61	16,24	22,54
	+ P	T1 - G100	11,79 \pm 0,31	11,18	12,40	12,21 \pm 1,25	9,76	14,65
		T2 - G75:L25	17,71 \pm 2,31	13,18	22,23	15,51 \pm 0,24	15,04	15,97
		T3 - G50:L50	17,00 \pm 1,00	15,03	18,97	17,97 \pm 0,72	16,56	19,38
		T4 - G25:L75	15,44 \pm 0,55	14,35	16,53	16,91 \pm 0,90	15,16	18,67
		T5 - L100	20,85 \pm 1,65	17,61	24,10	17,65 \pm 0,49	16,68	18,61
Otoño	- P	T1 - G100	12,86 \pm 2,07	8,80	16,91	10,48 \pm 0,49	9,52	11,45
		T2 - G75:L25	13,97 \pm 0,32	13,34	14,60	15,81 \pm 0,91	14,03	17,59
		T3 - G50:L50	14,16 \pm 0,56	13,06	15,25	16,32 \pm 0,17	15,99	16,64
		T4 - G25:L75	15,54 \pm 0,87	13,84	17,24	18,04 \pm 1,51	15,07	21,00
		T5 - L100	16,72 \pm 0,71	15,33	18,11	18,32 \pm 0,88	16,60	20,03
	+ P	T1 - G100	10,56 \pm 0,45	9,67	11,45	10,63 \pm 0,77	9,12	12,13
		T2 - G75:L25	14,24 \pm 0,38	13,51	14,98	17,06 \pm 1,09	14,93	19,19
		T3 - G50:L50	14,76 \pm 0,75	13,29	16,23	18,85 \pm 1,38	16,14	21,55
		T4 - G25:L75	14,01 \pm 0,27	13,48	14,54	18,20 \pm 0,69	16,85	19,56
		T5 - L100	16,35 \pm 0,65	15,07	17,63	20,43 \pm 1,07	18,33	22,53

Abundancia relativa de Hongos Micorrícicos Arbusculares (%mol). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009		año 2010			
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	29,36 \pm 3,11	23,27	35,45	32,09 \pm 1,30	29,55	34,63
		T2 - G75:L25	21,44 \pm 2,19	17,15	25,74	21,38 \pm 1,65	18,14	24,61
		T3 - G50:L50	20,67 \pm 0,75	19,20	22,13	19,12 \pm 0,62	17,91	20,33
		T4 - G25:L75	18,68 \pm 2,86	13,08	24,28	18,34 \pm 1,24	15,91	20,78
		T5 - L100	11,52 \pm 1,13	9,31	13,73	13,76 \pm 2,07	9,70	17,82
	+ P	T1 - G100	31,90 \pm 1,95	28,07	35,73	35,33 \pm 3,75	27,97	42,68
		T2 - G75:L25	23,37 \pm 1,12	21,18	25,55	21,46 \pm 0,50	20,48	22,45
		T3 - G50:L50	20,10 \pm 2,07	16,06	24,15	17,15 \pm 1,31	14,57	19,72
		T4 - G25:L75	20,45 \pm 1,34	17,83	23,07	16,09 \pm 2,21	11,75	20,42
		T5 - L100	11,30 \pm 1,20	8,94	13,65	13,39 \pm 2,98	7,55	19,22
Verano	- P	T1 - G100	34,82 \pm 1,42	32,05	37,60	35,57 \pm 1,60	32,43	38,71
		T2 - G75:L25	18,12 \pm 1,01	16,15	20,09	20,84 \pm 1,93	17,05	24,63
		T3 - G50:L50	20,44 \pm 1,68	17,14	23,74	19,4 \pm 0,73	18,02	20,88
		T4 - G25:L75	17,13 \pm 2,54	12,15	22,12	18,71 \pm 3,49	11,87	25,55
		T5 - L100	13,70 \pm 2,48	8,83	18,57	10,76 \pm 1,11	8,59	12,93
	+ P	T1 - G100	35,24 \pm 2,26	30,81	39,67	40,55 \pm 3,55	33,59	47,51
		T2 - G75:L25	19,74 \pm 2,95	13,95	25,52	22,35 \pm 2,40	17,64	27,06
		T3 - G50:L50	14,93 \pm 2,06	10,89	18,96	15,08 \pm 1,43	12,28	17,88
		T4 - G25:L75	18,82 \pm 1,61	15,68	21,97	15,14 \pm 1,04	13,11	17,18
		T5 - L100	12,09 \pm 1,82	8,53	15,66	11,87 \pm 1,25	9,42	14,33
Otoño	- P	T1 - G100	36,02 \pm 2,00	32,10	39,94	43,60 \pm 1,65	40,36	46,84
		T2 - G75:L25	21,92 \pm 1,79	18,40	25,43	23,44 \pm 3,09	17,39	29,49
		T3 - G50:L50	22,23 \pm 1,10	20,07	24,39	20,28 \pm 1,26	17,81	22,75
		T4 - G25:L75	19,47 \pm 1,47	16,59	22,36	19,10 \pm 0,91	17,31	20,89
		T5 - L100	12,52 \pm 1,57	9,45	15,60	13,86 \pm 1,46	11,00	16,72
	+ P	T1 - G100	38,63 \pm 1,20	36,29	40,98	46,72 \pm 0,89	44,97	48,46
		T2 - G75:L25	20,23 \pm 1,16	17,97	22,49	21,71 \pm 2,15	17,49	25,93
		T3 - G50:L50	19,93 \pm 2,76	14,52	25,34	19,07 \pm 1,81	15,51	22,63
		T4 - G25:L75	19,74 \pm 1,49	16,82	22,65	18,03 \pm 1,94	14,22	21,83
		T5 - L100	14,33 \pm 1,12	12,14	16,52	11,63 \pm 0,68	10,30	12,96

Actividad β -Glucosidasa ($\mu\text{mol PNF g}^{-1}$ suelo h^{-1}). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	9,20 \pm 0,72	7,79	10,61	7,59 \pm 0,42	6,76	8,42
		T2 - G75:L25	8,99 \pm 0,28	8,44	9,54	7,72 \pm 0,20	7,33	8,11
		T3 - G50:L50	9,22 \pm 0,33	8,57	9,86	9,48 \pm 0,80	7,90	11,06
		T4 - G25:L75	9,21 \pm 0,64	7,95	10,48	8,94 \pm 0,59	7,78	10,11
		T5 - L100	12,12 \pm 2,24	7,74	16,50	9,20 \pm 0,68	7,87	10,53
	+ P	T1 - G100	9,43 \pm 1,0	7,47	11,40	8,21 \pm 0,33	7,57	8,85
		T2 - G75:L25	9,44 \pm 0,93	7,61	11,26	8,37 \pm 0,42	7,54	9,19
		T3 - G50:L50	10,44 \pm 1,46	7,57	13,31	9,00 \pm 0,53	7,97	10,03
		T4 - G25:L75	9,36 \pm 0,63	8,14	10,59	10,23 \pm 0,27	9,71	10,75
		T5 - L100	9,21 \pm 0,18	8,86	9,56	8,24 \pm 0,63	7,01	9,47
Verano	- P	T1 - G100	6,27 \pm 0,28	5,73	6,82	8,02 \pm 0,34	7,35	8,69
		T2 - G75:L25	7,68 \pm 0,33	7,03	8,32	6,20 \pm 0,22	5,78	6,63
		T3 - G50:L50	7,78 \pm 0,32	7,14	8,41	7,01 \pm 0,14	6,73	7,28
		T4 - G25:L75	8,75 \pm 0,21	8,33	9,17	6,57 \pm 0,32	5,95	7,19
		T5 - L100	8,83 \pm 0,52	7,81	9,85	7,51 \pm 0,17	7,18	7,83
	+ P	T1 - G100	8,69 \pm 0,38	7,95	9,43	7,05 \pm 0,14	6,79	7,32
		T2 - G75:L25	7,82 \pm 0,17	7,48	8,15	6,74 \pm 0,39	5,98	7,51
		T3 - G50:L50	8,91 \pm 0,18	8,56	9,26	7,67 \pm 0,40	6,88	8,46
		T4 - G25:L75	8,20 \pm 0,49	7,23	9,17	7,42 \pm 0,20	7,03	7,80
		T5 - L100	9,20 \pm 0,30	8,61	9,79	6,72 \pm 0,18	6,36	7,08
Otoño	- P	T1 - G100	3,11 \pm 0,10	2,91	3,30	4,53 \pm 0,17	4,20	4,85
		T2 - G75:L25	3,60 \pm 0,07	3,46	3,73	4,92 \pm 0,13	4,66	5,18
		T3 - G50:L50	3,81 \pm 0,12	3,57	4,06	4,80 \pm 0,15	4,51	5,09
		T4 - G25:L75	3,09 \pm 0,05	2,99	3,19	4,35 \pm 0,13	4,10	4,60
		T5 - L100	3,79 \pm 0,17	3,46	4,11	5,10 \pm 0,20	4,71	5,49
	+ P	T1 - G100	3,62 \pm 0,09	3,45	3,78	5,12 \pm 0,07	4,98	5,27
		T2 - G75:L25	3,64 \pm 0,15	3,36	3,93	4,56 \pm 0,12	4,33	4,80
		T3 - G50:L50	3,64 \pm 0,09	3,46	3,82	4,58 \pm 0,16	4,28	4,89
		T4 - G25:L75	3,68 \pm 0,20	3,29	4,07	4,64 \pm 0,10	4,45	4,84
		T5 - L100	3,97 \pm 0,07	3,84	4,11	4,63 \pm 0,11	4,41	4,85

Actividad Fosfomonoesterasa ($\mu\text{mol PNF g}^{-1}$ suelo h^{-1}). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	18,18 \pm 3,85	10,64	25,72	15,42 \pm 1,27	12,93	17,91
		T2 - G75:L25	17,76 \pm 0,83	16,13	19,38	14,32 \pm 1,69	11,00	17,63
		T3 - G50:L50	18,60 \pm 2,17	14,35	22,85	17,58 \pm 0,58	16,45	18,72
		T4 - G25:L75	21,03 \pm 2,11	16,90	25,16	20,36 \pm 1,28	17,85	22,87
		T5 - L100	21,90 \pm 2,00	17,99	25,81	18,87 \pm 0,75	17,40	20,34
	+ P	T1 - G100	18,17 \pm 1,38	15,47	20,87	17,54 \pm 1,52	14,56	20,51
		T2 - G75:L25	17,33 \pm 2,32	12,79	21,86	20,98 \pm 2,31	16,45	25,52
		T3 - G50:L50	19,33 \pm 2,43	14,57	24,10	22,98 \pm 1,79	19,48	26,49
		T4 - G25:L75	23,73 \pm 1,96	19,90	27,56	18,34 \pm 1,98	14,47	22,21
		T5 - L100	18,38 \pm 3,58	11,36	25,40	16,15 \pm 1,07	14,05	18,26
Verano	- P	T1 - G100	11,08 \pm 1,43	8,27	13,89	10,99 \pm 0,62	9,77	12,21
		T2 - G75:L25	13,20 \pm 0,95	11,34	15,05	11,95 \pm 1,22	9,56	14,35
		T3 - G50:L50	13,41 \pm 1,23	11,00	15,83	11,96 \pm 1,,18	9,64	14,27
		T4 - G25:L75	12,53 \pm 0,97	10,62	14,43	12,84 \pm 0,96	10,96	14,72
		T5 - L100	13,77 \pm 1,03	11,74	15,79	14,00 \pm 1,23	11,59	16,42
	+ P	T1 - G100	11,39 \pm 1,22	9,00	13,79	13,04 \pm 0,93	11,22	14,86
		T2 - G75:L25	12,48 \pm 1,18	10,17	14,80	14,58 \pm 0,77	13,08	16,09
		T3 - G50:L50	11,49 \pm 1,27	9,01	13,98	14,94 \pm 1,67	11,65	18,22
		T4 - G25:L75	13,78 \pm 1,43	10,98	16,58	13,05 \pm 1,04	11,00	15,09
		T5 - L100	13,28 \pm 1,28	10,77	15,78	12,45 \pm 1,26	9,99	14,91
Otoño	- P	T1 - G100	10,56 \pm 0,51	9,57	11,55	8,21 \pm 0,78	6,68	9,75
		T2 - G75:L25	9,67 \pm 0,48	8,72	10,62	9,10 \pm 1,13	6,89	11,32
		T3 - G50:L50	6,47 \pm 0,32	5,85	7,10	9,27 \pm 0,82	7,65	10,88
		T4 - G25:L75	10,22 \pm 0,92	8,42	12,03	12,38 \pm 0,84	10,73	14,03
		T5 - L100	11,29 \pm 0,53	10,25	12,32	12,47 \pm 0,56	11,38	13,57
	+ P	T1 - G100	9,61 \pm 0,75	8,14	11,08	9,95 \pm 1,58	6,85	13,04
		T2 - G75:L25	9,31 \pm 0,94	7,46	11,16	10,22 \pm 1,07	8,13	12,31
		T3 - G50:L50	9,34 \pm 0,55	8,27	10,41	13,74 \pm 0,68	12,41	15,07
		T4 - G25:L75	10,63 \pm 0,67	9,32	11,94	11,74 \pm 0,79	10,20	13,29
		T5 - L100	11,52 \pm 0,43	10,67	12,37	10,94 \pm 0,78	9,42	12,47

Actividad Arilsulfatasa ($\mu\text{mol PNF g}^{-1}$ suelo h^{-1}). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	2,44 \pm 0,37	1,72	3,17	2,47 \pm 0,08	2,31	2,62
		T2 - G75:L25	2,83 \pm 0,30	2,25	3,41	2,27 \pm 0,14	1,99	2,55
		T3 - G50:L50	2,63 \pm 0,13	2,38	2,87	3,03 \pm 0,10	2,84	3,22
		T4 - G25:L75	2,52 \pm 0,15	2,23	2,81	2,28 \pm 0,10	2,08	2,49
		T5 - L100	2,73 \pm 0,25	2,23	3,23	2,18 \pm 0,06	2,07	2,30
	+ P	T1 - G100	2,28 \pm 0,18	1,93	2,62	2,16 \pm 0,12	1,92	2,39
		T2 - G75:L25	2,35 \pm 0,32	1,72	2,98	1,70 \pm 0,17	1,37	2,02
		T3 - G50:L50	2,4 \pm 0,14	2,16	2,69	1,80 \pm 0,19	1,43	2,18
		T4 - G25:L75	2,46 \pm 0,20	2,06	2,86	1,95 \pm 0,21	1,55	2,35
		T5 - L100	2,43 \pm 0,19	2,05	2,80	1,73 \pm 0,11	1,51	1,95
Verano	- P	T1 - G100	4,26 \pm 0,18	3,91	4,61	7,13 \pm 0,27	6,59	7,67
		T2 - G75:L25	4,22 \pm 0,28	3,67	4,76	6,86 \pm 0,30	6,27	7,45
		T3 - G50:L50	4,12 \pm 0,24	3,64	4,60	6,67 \pm 0,14	6,39	6,96
		T4 - G25:L75	4,05 \pm 0,13	3,81	4,30	5,97 \pm 0,22	5,54	6,41
		T5 - L100	3,90 \pm 0,22	3,47	4,32	6,89 \pm 0,28	6,34	7,43
	+ P	T1 - G100	3,23 \pm 0,09	3,04	3,41	5,37 \pm 0,32	4,74	6,00
		T2 - G75:L25	3,85 \pm 0,18	3,50	4,19	5,58 \pm 0,13	5,32	5,83
		T3 - G50:L50	3,78 \pm 0,14	3,51	4,06	4,65 \pm 0,34	3,98	5,32
		T4 - G25:L75	3,67 \pm 0,13	3,41	3,92	5,86 \pm 0,26	5,36	6,36
		T5 - L100	3,16 \pm 0,28	2,61	3,70	4,75 \pm 0,05	4,65	4,86
Otoño	- P	T1 - G100	2,63 \pm 0,07	2,49	2,78	2,35 \pm 0,08	2,20	2,51
		T2 - G75:L25	2,69 \pm 0,13	2,44	2,93	2,55 \pm 0,02	2,51	2,59
		T3 - G50:L50	2,50 \pm 0,09	2,33	2,67	2,59 \pm 0,08	2,44	2,74
		T4 - G25:L75	2,78 \pm 0,07	2,65	2,91	2,53 \pm 0,07	2,38	2,67
		T5 - L100	2,73 \pm 0,04	2,65	2,81	2,49 \pm 0,11	2,28	2,70
	+ P	T1 - G100	1,98 \pm 0,07	1,84	2,12	2,04 \pm 0,08	1,88	2,21
		T2 - G75:L25	2,22 \pm 0,06	2,11	2,34	2,12 \pm 0,14	1,84	2,41
		T3 - G50:L50	2,41 \pm 0,10	2,21	2,61	2,02 \pm 0,11	1,80	2,24
		T4 - G25:L75	2,17 \pm 0,11	1,96	2,38	2,02 \pm 0,12	1,79	2,25
		T5 - L100	1,82 \pm 0,06	1,71	1,94	1,92 \pm 0,06	1,81	2,04

Actividad Ureasa ($\mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	0,25 \pm 0,01	0,24	0,26	0,12 \pm 0,00	0,11	0,13
		T2 - G75:L25	0,18 \pm 0,01	0,16	0,19	0,12 \pm 0,01	0,10	0,13
		T3 - G50:L50	0,21 \pm 0,01	0,20	0,22	0,14 \pm 0,00	0,13	0,15
		T4 - G25:L75	0,20 \pm 0,00	0,19	0,20	0,14 \pm 0,01	0,13	0,16
		T5 - L100	0,22 \pm 0,01	0,20	0,24	0,14 \pm 0,01	0,12	0,17
	+ P	T1 - G100	0,20 \pm 0,02	0,15	0,24	0,14 \pm 0,01	0,12	0,16
		T2 - G75:L25	0,19 \pm 0,01	0,18	0,20	0,11 \pm 0,01	0,09	0,12
		T3 - G50:L50	0,21 \pm 0,03	0,15	0,27	0,10 \pm 0,01	0,09	0,11
		T4 - G25:L75	0,22 \pm 0,01	0,20	0,24	0,12 \pm 0,01	0,11	0,14
		T5 - L100	0,23 \pm 0,01	0,21	0,25	0,17 \pm 0,01	0,15	0,18
Verano	- P	T1 - G100	0,18 \pm 0,00	0,17	0,19	0,23 \pm 0,01	0,22	0,24
		T2 - G75:L25	0,14 \pm 0,00	0,14	0,15	0,22 \pm 0,00	0,21	0,23
		T3 - G50:L50	0,16 \pm 0,01	0,15	0,17	0,22 \pm 0,00	0,21	0,23
		T4 - G25:L75	0,16 \pm 0,00	0,15	0,16	0,22 \pm 0,00	0,22	0,22
		T5 - L100	0,15 \pm 0,00	0,15	0,16	0,22 \pm 0,01	0,21	0,24
	+ P	T1 - G100	0,18 \pm 0,00	0,18	0,18	0,22 \pm 0,01	0,21	0,23
		T2 - G75:L25	0,15 \pm 0,00	0,15	0,16	0,21 \pm 0,00	0,20	0,22
		T3 - G50:L50	0,15 \pm 0,01	0,13	0,17	0,23 \pm 0,00	0,22	0,24
		T4 - G25:L75	0,18 \pm 0,00	0,17	0,19	0,19 \pm 0,01	0,17	0,20
		T5 - L100	0,18 \pm 0,00	0,17	0,19	0,20 \pm 0,01	0,19	0,21
Otoño	- P	T1 - G100	0,32 \pm 0,02	0,28	0,35	0,14 \pm 0,01	0,11	0,16
		T2 - G75:L25	0,24 \pm 0,02	0,20	0,29	0,14 \pm 0,01	0,11	0,17
		T3 - G50:L50	0,25 \pm 0,02	0,22	0,28	0,17 \pm 0,01	0,15	0,20
		T4 - G25:L75	0,31 \pm 0,01	0,30	0,33	0,13 \pm 0,01	0,10	0,16
		T5 - L100	0,38 \pm 0,02	0,34	0,42	0,13 \pm 0,01	0,11	0,16
	+ P	T1 - G100	0,36 \pm 0,01	0,34	0,37	0,14 \pm 0,00	0,13	0,15
		T2 - G75:L25	0,29 \pm 0,02	0,25	0,32	0,09 \pm 0,01	0,07	0,11
		T3 - G50:L50	0,36 \pm 0,01	0,34	0,37	0,08 \pm 0,01	0,06	0,11
		T4 - G25:L75	0,29 \pm 0,02	0,25	0,33	0,12 \pm 0,01	0,09	0,15
		T5 - L100	0,30 \pm 0,02	0,27	0,34	0,15 \pm 0,01	0,12	0,17

Actividad Deshidrogenasa (nmol INTF g⁻¹ suelo h⁻¹). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media ± el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media ± ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media ± ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	2,88±0,15	2,59	3,17	2,06±0,39	1,29	2,82
		T2 - G75:L25	0,80±0,08	0,64	0,96	1,88±0,40	1,08	2,67
		T3 - G50:L50	1,07±0,09	0,90	1,24	1,88±0,43	1,04	2,73
		T4 - G25:L75	1,22±0,35	0,54	1,91	1,27±0,37	0,55	1,99
		T5 - L100	0,79±0,14	0,52	1,07	1,55±0,29	0,97	2,13
	+ P	T1 - G100	1,81±0,13	1,56	2,07	3,56±0,51	2,55	4,57
		T2 - G75:L25	1,21±0,27	0,69	1,73	1,42±0,42	0,60	2,25
		T3 - G50:L50	0,88±0,04	0,81	0,95	1,80±0,31	1,19	2,41
		T4 - G25:L75	1,09±0,11	0,86	1,31	1,37±0,23	0,92	1,82
		T5 - L100	1,33±0,18	0,97	1,68	1,32±0,19	0,95	1,68
Verano	- P	T1 - G100	1,22±0,07	1,08	1,36	4,16±0,35	3,47	4,85
		T2 - G75:L25	0,86±0,04	0,78	0,94	3,29±0,35	2,60	3,99
		T3 - G50:L50	0,99±0,03	0,94	1,05	2,77±0,14	2,50	3,03
		T4 - G25:L75	1,51±0,10	1,31	1,71	3,83±0,32	3,19	4,46
		T5 - L100	1,03±0,11	0,81	1,26	3,12±0,36	2,42	3,83
	+ P	T1 - G100	1,18±0,05	1,08	1,29	4,77±0,25	4,27	5,26
		T2 - G75:L25	0,98±0,09	0,81	1,15	4,03±0,24	3,56	4,49
		T3 - G50:L50	1,13±0,07	1,00	1,27	2,99±0,29	2,43	3,55
		T4 - G25:L75	0,91±0,06	0,80	1,02	2,50±0,34	1,83	3,17
		T5 - L100	0,92±0,08	0,77	1,07	2,70±0,15	2,41	2,99
Otoño	- P	T1 - G100	1,58±0,10	1,39	1,78	1,80±0,19	1,43	2,17
		T2 - G75:L25	2,20±0,09	2,03	2,37	1,94±0,26	1,42	2,46
		T3 - G50:L50	1,63±0,08	1,48	1,78	1,67±0,21	1,26	2,07
		T4 - G25:L75	1,91±0,10	1,71	2,11	1,96±0,19	1,59	2,32
		T5 - L100	1,40±0,21	0,99	1,81	1,27±0,07	1,13	1,42
	+ P	T1 - G100	1,34±0,12	1,10	1,58	1,81±0,04	1,74	1,88
		T2 - G75:L25	1,75±0,18	1,39	2,11	1,23±0,08	1,07	1,39
		T3 - G50:L50	1,56±0,12	1,33	1,78	1,22±0,06	1,09	1,34
		T4 - G25:L75	1,66±0,06	1,55	1,78	1,05±0,06	0,93	1,17
		T5 - L100	1,18±0,07	1,05	1,31	1,36±0,10	1,17	1,55

Mineralización de Nitrógeno ($\mu\text{g N g}^{-1}$ suelo dia^{-1}). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	0,42 \pm 0,05	0,33	0,52	0,13 \pm 0,04	0,05	0,20
		T2 - G75:L25	0,62 \pm 0,09	0,44	0,80	0,27 \pm 0,01	0,24	0,29
		T3 - G50:L50	0,67 \pm 0,05	0,57	0,76	0,34 \pm 0,04	0,26	0,42
		T4 - G25:L75	0,69 \pm 0,04	0,61	0,76	0,33 \pm 0,06	0,21	0,46
		T5 - L100	0,96 \pm 0,01	0,94	0,98	0,35 \pm 0,08	0,19	0,51
	+ P	T1 - G100	0,22 \pm 0,11	0,00	0,45	0,07 \pm 0,03	0,01	0,12
		T2 - G75:L25	0,79 \pm 0,03	0,74	0,85	0,29 \pm 0,02	0,25	0,33
		T3 - G50:L50	0,88 \pm 0,13	0,63	1,13	0,29 \pm 0,05	0,18	0,39
		T4 - G25:L75	0,65 \pm 0,05	0,54	0,76	0,28 \pm 0,01	0,25	0,31
		T5 - L100	0,84 \pm 0,01	0,82	0,86	0,39 \pm 0,01	0,37	0,42
Verano	- P	T1 - G100	0,09 \pm 0,04	0,01	0,16	0,04 \pm 0,01	0,02	0,06
		T2 - G75:L25	0,31 \pm 0,06	0,20	0,42	0,14 \pm 0,02	0,10	0,18
		T3 - G50:L50	0,16 \pm 0,03	0,10	0,23	0,09 \pm 0,02	0,05	0,12
		T4 - G25:L75	0,27 \pm 0,04	0,20	0,34	0,10 \pm 0,03	0,05	0,15
		T5 - L100	0,47 \pm 0,09	0,29	0,66	0,16 \pm 0,03	0,11	0,21
	+ P	T1 - G100	0,05 \pm 0,04	-0,03	0,13	0,07 \pm 0,03	0,00	0,13
		T2 - G75:L25	0,29 \pm 0,13	0,04	0,55	0,11 \pm 0,01	0,10	0,13
		T3 - G50:L50	0,23 \pm 0,02	0,18	0,28	0,13 \pm 0,01	0,10	0,15
		T4 - G25:L75	0,21 \pm 0,02	0,17	0,25	0,15 \pm 0,03	0,10	0,20
		T5 - L100	0,32 \pm 0,07	0,19	0,45	0,09 \pm 0,01	0,07	0,11
Otoño	- P	T1 - G100	0,03 \pm 0,02	0,00	0,07	0,09 \pm 0,03	0,04	0,15
		T2 - G75:L25	0,16 \pm 0,02	0,12	0,21	0,20 \pm 0,02	0,16	0,23
		T3 - G50:L50	0,31 \pm 0,05	0,21	0,42	0,27 \pm 0,03	0,21	0,33
		T4 - G25:L75	0,17 \pm 0,03	0,11	0,24	0,27 \pm 0,03	0,21	0,33
		T5 - L100	0,29 \pm 0,01	0,26	0,32	0,27 \pm 0,02	0,22	0,31
	+ P	T1 - G100	0,04 \pm 0,01	0,01	0,06	0,13 \pm 0,03	0,07	0,19
		T2 - G75:L25	0,20 \pm 0,04	0,11	0,28	0,21 \pm 0,02	0,17	0,24
		T3 - G50:L50	0,21 \pm 0,01	0,19	0,23	0,27 \pm 0,05	0,17	0,36
		T4 - G25:L75	0,29 \pm 0,01	0,28	0,31	0,34 \pm 0,02	0,30	0,39
		T5 - L100	0,38 \pm 0,03	0,33	0,44	0,25 \pm 0,03	0,18	0,32

Respiración basal del suelo ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suelo dia}^{-1}$). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	12,92 \pm 1,67	9,65	16,18	17,34 \pm 0,55	16,26	18,43
		T2 - G75:L25	18,89 \pm 3,25	12,53	25,25	14,30 \pm 0,80	12,74	15,86
		T3 - G50:L50	17,41 \pm 2,17	13,15	21,66	18,25 \pm 0,13	18,00	18,49
		T4 - G25:L75	21,35 \pm 1,68	18,07	24,64	15,21 \pm 0,63	13,97	16,45
		T5 - L100	15,02 \pm 1,53	12,02	18,02	13,05 \pm 0,42	12,23	13,87
	+ P	T1 - G100	25,06 \pm 0,14	24,79	25,33	19,87 \pm 0,50	18,89	20,84
		T2 - G75:L25	19,81 \pm 1,25	17,37	22,25	15,05 \pm 0,77	13,54	16,55
		T3 - G50:L50	18,10 \pm 0,45	17,21	18,98	13,65 \pm 0,87	11,94	15,36
		T4 - G25:L75	16,95 \pm 2,14	12,76	21,14	13,38 \pm 0,40	12,61	14,16
		T5 - L100	16,86 \pm 3,76	9,49	24,23	13,00 \pm 0,73	11,57	14,42
Verano	- P	T1 - G100	12,45 \pm 1,28	9,94	14,97	15,86 \pm 0,88	14,14	17,58
		T2 - G75:L25	11,20 \pm 0,69	9,85	12,54	12,77 \pm 1,13	10,54	14,99
		T3 - G50:L50	12,85 \pm 0,41	12,04	13,65	17,53 \pm 0,36	16,83	18,24
		T4 - G25:L75	14,09 \pm 0,58	12,95	15,22	12,71 \pm 0,53	11,68	13,74
		T5 - L100	13,38 \pm 0,76	11,89	14,87	12,97 \pm 0,54	11,91	14,03
	+ P	T1 - G100	10,84 \pm 0,84	9,19	12,49	12,63 \pm 1,15	10,39	14,88
		T2 - G75:L25	14,15 \pm 1,28	11,64	16,67	16,75 \pm 1,46	13,89	19,61
		T3 - G50:L50	15,60 \pm 1,50	12,66	18,53	13,42 \pm 0,56	12,33	14,51
		T4 - G25:L75	10,91 \pm 1,42	8,13	13,70	14,85 \pm 2,10	10,73	18,96
		T5 - L100	6,99 \pm 0,46	6,09	7,90	12,46 \pm 0,19	12,09	12,83
Otoño	- P	T1 - G100	8,24 \pm 1,03	6,22	10,25	8,61 \pm 0,18	8,26	8,96
		T2 - G75:L25	10,06 \pm 0,21	9,65	10,48	8,90 \pm 0,25	8,42	9,39
		T3 - G50:L50	11,08 \pm 1,29	8,56	13,61	8,32 \pm 0,19	7,94	8,70
		T4 - G25:L75	7,61 \pm 1,50	4,68	10,55	12,76 \pm 0,08	12,60	12,93
		T5 - L100	11,29 \pm 0,95	9,42	13,15	13,63 \pm 0,51	12,64	14,63
	+ P	T1 - G100	7,19 \pm 0,37	6,45	7,92	9,34 \pm 0,52	8,32	10,37
		T2 - G75:L25	6,52 \pm 0,61	5,32	7,71	11,68 \pm 0,28	11,13	12,23
		T3 - G50:L50	8,39 \pm 0,56	7,29	9,50	4,92 \pm 0,46	4,01	5,82
		T4 - G25:L75	13,19 \pm 1,38	10,50	15,89	12,06 \pm 0,29	11,50	12,63
		T5 - L100	9,65 \pm 0,44	8,79	10,50	11,42 \pm 0,76	9,93	12,91

Coefficiente metabólico (qCO₂). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media ± el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media ± ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media ± ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	16,44±2,00	12,53	20,35	20,26±3,40	13,59	26,93
		T2 - G75:L25	27,58±4,16	18,55	36,62	24,52±3,25	18,15	30,90
		T3 - G50:L50	25,23±3,49	18,40	32,07	22,37±3,25	16,50	29,24
		T4 - G25:L75	32,40±3,60	25,35	39,45	23,32±2,77	17,89	28,74
		T5 - L100	28,31±4,75	19,00	37,61	19,88±1,85	16,25	23,50
	+ P	T1 - G100	26,04±1,10	23,87	28,20	24,75±5,68	13,61	35,89
		T2 - G75:L25	26,24±1,63	23,05	29,42	21,04±4,04	13,13	28,95
		T3 - G50:L50	30,00±0,87	28,30	31,70	21,72±2,46	16,90	26,54
		T4 - G25:L75	23,30±2,80	17,81	28,79	19,89±3,25	13,51	26,27
		T5 - L100	24,48±5,74	13,24	35,72	22,55±4,26	14,21	30,89
Verano	- P	T1 - G100	17,56±1,47	14,69	20,43	19,27±2,04	15,28	23,26
		T2 - G75:L25	20,78±0,42	19,96	21,60	29,43±5,82	18,02	40,84
		T3 - G50:L50	22,21±2,07	18,15	26,26	26,49±0,64	25,25	27,74
		T4 - G25:L75	28,27±4,11	20,21	36,34	22,75±3,75	15,40	30,09
		T5 - L100	44,14±15,48	13,79	74,49	30,95±9,24	12,83	49,06
	+ P	T1 - G100	13,32±1,71	9,97	16,66	12,52±2,46	7,70	17,34
		T2 - G75:L25	23,66±4,40	15,03	32,29	26,97±4,44	18,27	35,68
		T3 - G50:L50	41,05±4,11	33,00	49,10	23,69±6,87	10,22	37,16
		T4 - G25:L75	19,64±3,47	12,83	26,44	25,72±4,96	16,01	35,43
		T5 - L100	12,20±1,48	9,31	15,10	26,28±1,09	24,14	28,43
Otoño	- P	T1 - G100	15,46±4,84	5,97	24,94	8,00±1,21	5,62	10,38
		T2 - G75:L25	16,09±1,61	12,94	19,24	17,01±2,15	12,80	21,23
		T3 - G50:L50	22,27±1,97	18,42	26,13	15,70±1,22	13,32	18,08
		T4 - G25:L75	13,00±2,46	8,18	17,82	27,02±3,72	19,72	34,32
		T5 - L100	20,68±1,82	17,11	24,25	24,48±1,93	20,69	28,28
	+ P	T1 - G100	8,30±0,83	6,67	9,93	8,60±1,22	6,21	10,99
		T2 - G75:L25	10,86±0,55	9,79	11,94	20,15±2,48	15,28	25,02
		T3 - G50:L50	15,80±2,96	10,00	21,59	11,86±1,98	7,99	15,73
		T4 - G25:L75	22,56±3,23	16,22	28,90	18,88±1,62	15,71	22,05
		T5 - L100	22,77±4,82	13,32	32,22	22,42±2,62	17,29	27,55

Carbono total (g C 100 g⁻¹ suelo). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	0,69 \pm 0,01	0,67	0,72	0,74 \pm 0,02	0,70	0,78
		T2 - G75:L25	0,72 \pm 0,03	0,66	0,78	0,70 \pm 0,04	0,62	0,78
		T3 - G50:L50	0,73 \pm 0,01	0,72	0,74	0,77 \pm 0,04	0,70	0,84
		T4 - G25:L75	0,71 \pm 0,03	0,66	0,76	0,75 \pm 0,04	0,67	0,83
		T5 - L100	0,74 \pm 0,02	0,71	0,78	0,77 \pm 0,01	0,74	0,79
	+ P	T1 - G100	0,74 \pm 0,03	0,68	0,81	0,75 \pm 0,05	0,66	0,84
		T2 - G75:L25	0,71 \pm 0,02	0,67	0,75	0,74 \pm 0,03	0,68	0,80
		T3 - G50:L50	0,70 \pm 0,03	0,64	0,75	0,68 \pm 0,04	0,60	0,77
		T4 - G25:L75	0,71 \pm 0,04	0,62	0,79	0,76 \pm 0,02	0,71	0,81
		T5 - L100	0,69 \pm 0,02	0,65	0,74	0,75 \pm 0,01	0,73	0,78
Verano	- P	T1 - G100	0,80 \pm 0,03	0,74	0,85	0,82 \pm 0,05	0,72	0,92
		T2 - G75:L25	0,75 \pm 0,03	0,70	0,81	0,79 \pm 0,06	0,67	0,91
		T3 - G50:L50	0,76 \pm 0,02	0,73	0,80	0,83 \pm 0,01	0,81	0,84
		T4 - G25:L75	0,76 \pm 0,02	0,72	0,80	0,69 \pm 0,02	0,65	0,74
		T5 - L100	0,78 \pm 0,04	0,69	0,87	0,77 \pm 0,02	0,73	0,82
	+ P	T1 - G100	0,73 \pm 0,03	0,67	0,78	0,75 \pm 0,03	0,69	0,81
		T2 - G75:L25	0,71 \pm 0,05	0,62	0,80	0,83 \pm 0,02	0,78	0,88
		T3 - G50:L50	0,75 \pm 0,05	0,65	0,84	0,75 \pm 0,04	0,69	0,82
		T4 - G25:L75	0,77 \pm 0,06	0,66	0,88	0,82 \pm 0,04	0,74	0,89
		T5 - L100	0,80 \pm 0,01	0,77	0,83	0,79 \pm 0,05	0,70	0,88
Otoño	- P	T1 - G100	0,72 \pm 0,03	0,66	0,79	0,76 \pm 0,11	0,55	0,97
		T2 - G75:L25	0,79 \pm 0,04	0,72	0,86	0,81 \pm 0,07	0,67	0,94
		T3 - G50:L50	0,79 \pm 0,03	0,72	0,85	0,88 \pm 0,05	0,77	0,98
		T4 - G25:L75	0,79 \pm 0,06	0,68	0,91	0,85 \pm 0,04	0,78	0,93
		T5 - L100	0,83 \pm 0,04	0,75	0,92	0,81 \pm 0,05	0,71	0,92
	+ P	T1 - G100	0,78 \pm 0,06	0,66	0,90	0,82 \pm 0,10	0,62	1,02
		T2 - G75:L25	0,75 \pm 0,02	0,72	0,79	0,95 \pm 0,06	0,83	1,06
		T3 - G50:L50	0,81 \pm 0,04	0,72	0,89	0,72 \pm 0,03	0,67	0,77
		T4 - G25:L75	0,83 \pm 0,03	0,77	0,88	0,96 \pm 0,03	0,89	1,02
		T5 - L100	0,79 \pm 0,05	0,70	0,88	0,87 \pm 0,05	0,77	0,97

Nitrógeno total (g N 100 g⁻¹ suelo). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	0,08 \pm 0,001	0,07	0,08	0,08 \pm 0,001	0,07	0,08
		T2 - G75:L25	0,08 \pm 0,003	0,07	0,09	0,08 \pm 0,003	0,08	0,09
		T3 - G50:L50	0,08 \pm 0,001	0,08	0,08	0,09 \pm 0,003	0,08	0,09
		T4 - G25:L75	0,08 \pm 0,003	0,07	0,09	0,08 \pm 0,004	0,08	0,09
		T5 - L100	0,09 \pm 0,003	0,08	0,09	0,09 \pm 0,001	0,08	0,09
	+ P	T1 - G100	0,08 \pm 0,003	0,07	0,09	0,08 \pm 0,003	0,07	0,08
		T2 - G75:L25	0,08 \pm 0,003	0,07	0,08	0,08 \pm 0,003	0,07	0,09
		T3 - G50:L50	0,08 \pm 0,003	0,07	0,08	0,08 \pm 0,003	0,07	0,08
		T4 - G25:L75	0,08 \pm 0,003	0,08	0,09	0,08 \pm 0,002	0,08	0,09
		T5 - L100	0,08 \pm 0,001	0,08	0,08	0,08 \pm 0,001	0,08	0,09
Verano	- P	T1 - G100	0,07 \pm 0,001	0,07	0,07	0,07 \pm 0,002	0,07	0,08
		T2 - G75:L25	0,08 \pm 0,003	0,07	0,08	0,08 \pm 0,003	0,07	0,08
		T3 - G50:L50	0,08 \pm 0,002	0,07	0,08	0,08 \pm 0,001	0,08	0,08
		T4 - G25:L75	0,07 \pm 0,005	0,07	0,08	0,08 \pm 0,002	0,07	0,08
		T5 - L100	0,08 \pm 0,005	0,07	0,09	0,08 \pm 0,003	0,07	0,09
	+ P	T1 - G100	0,07 \pm 0,004	0,07	0,08	0,07 \pm 0,002	0,07	0,07
		T2 - G75:L25	0,07 \pm 0,001	0,07	0,08	0,08 \pm 0,003	0,07	0,09
		T3 - G50:L50	0,07 \pm 0,003	0,07	0,08	0,08 \pm 0,003	0,07	0,08
		T4 - G25:L75	0,08 \pm 0,003	0,07	0,09	0,08 \pm 0,002	0,08	0,08
		T5 - L100	0,08 \pm 0,002	0,07	0,08	0,08 \pm 0,001	0,07	0,08
Otoño	- P	T1 - G100	0,07 \pm 0,002	0,07	0,08	0,07 \pm 0,001	0,07	0,08
		T2 - G75:L25	0,08 \pm 0,002	0,07	0,08	0,08 \pm 0,003	0,08	0,09
		T3 - G50:L50	0,08 \pm 0,001	0,08	0,08	0,08 \pm 0,002	0,07	0,08
		T4 - G25:L75	0,08 \pm 0,003	0,07	0,08	0,08 \pm 0,005	0,07	0,09
		T5 - L100	0,09 \pm 0,004	0,08	0,09	0,08 \pm 0,002	0,08	0,09
	+ P	T1 - G100	0,07 \pm 0,001	0,07	0,08	0,07 \pm 0,003	0,07	0,08
		T2 - G75:L25	0,08 \pm 0,002	0,07	0,08	0,08 \pm 0,004	0,07	0,09
		T3 - G50:L50	0,08 \pm 0,004	0,07	0,08	0,08 \pm 0,003	0,07	0,08
		T4 - G25:L75	0,08 \pm 0,002	0,08	0,08	0,08 \pm 0,003	0,08	0,09
		T5 - L100	0,08 \pm 0,001	0,08	0,08	0,08 \pm 0,003	0,07	0,09

Nitrato asimilable ($\mu\text{g N-NO}_3 \text{ g}^{-1}$ suelo). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	0,66 \pm 0,06	0,55	0,77	1,29 \pm 0,16	0,97	1,60
		T2 - G75:L25	1,81 \pm 0,35	1,11	2,50	11,17 \pm 0,77	9,66	12,67
		T3 - G50:L50	3,66 \pm 0,91	1,88	5,44	14,56 \pm 1,63	11,37	17,76
		T4 - G25:L75	4,42 \pm 0,20	4,02	4,82	15,91 \pm 3,04	9,95	21,87
		T5 - L100	10,32 \pm 0,59	9,15	11,48	20,67 \pm 2,37	16,02	25,33
	+ P	T1 - G100	0,70 \pm 0,08	0,55	0,86	1,45 \pm 0,37	0,73	2,17
		T2 - G75:L25	2,08 \pm 0,40	1,31	2,86	11,94 \pm 0,64	10,68	13,20
		T3 - G50:L50	2,98 \pm 0,69	1,62	4,33	15,32 \pm 1,92	11,56	19,08
		T4 - G25:L75	4,37 \pm 1,24	1,94	6,80	11,48 \pm 0,66	10,18	12,78
		T5 - L100	10,14 \pm 0,66	8,85	11,42	20,20 \pm 0,73	18,78	21,63
Verano	- P	T1 - G100	0,92 \pm 0,05	0,82	1,03	3,08 \pm 0,20	2,69	3,47
		T2 - G75:L25	14,37 \pm 0,84	12,72	16,02	10,02 \pm 0,36	9,31	10,74
		T3 - G50:L50	12,61 \pm 1,67	9,34	15,88	11,57 \pm 1,22	9,17	13,97
		T4 - G25:L75	14,88 \pm 4,16	6,73	23,02	10,54 \pm 1,16	8,26	12,81
		T5 - L100	11,64 \pm 2,60	6,54	16,74	11,93 \pm 0,71	10,54	13,31
	+ P	T1 - G100	2,20 \pm 0,73	0,77	3,63	2,35 \pm 0,22	1,91	2,78
		T2 - G75:L25	10,87 \pm 1,20	8,51	13,22	8,10 \pm 0,75	6,63	9,57
		T3 - G50:L50	11,26 \pm 0,89	9,51	13,02	10,30 \pm 0,99	8,36	12,24
		T4 - G25:L75	11,45 \pm 2,78	6,01	16,90	11,04 \pm 0,79	9,48	12,60
		T5 - L100	15,71 \pm 0,67	14,39	17,03	10,60 \pm 0,78	9,08	12,13
Otoño	- P	T1 - G100	1,13 \pm 0,06	1,02	1,24	0,50 \pm 0,05	0,40	0,60
		T2 - G75:L25	11,40 \pm 1,35	8,76	14,04	8,81 \pm 1,07	6,70	10,91
		T3 - G50:L50	5,93 \pm 0,44	5,07	6,79	9,86 \pm 1,66	6,61	13,11
		T4 - G25:L75	9,85 \pm 0,65	8,58	11,13	9,82 \pm 0,92	8,01	11,63
		T5 - L100	9,93 \pm 0,69	8,57	11,28	10,39 \pm 1,02	8,40	12,39
	+ P	T1 - G100	1,66 \pm 0,14	1,39	1,93	1,01 \pm 0,27	0,49	1,54
		T2 - G75:L25	6,62 \pm 1,14	4,39	8,85	7,92 \pm 0,66	6,62	9,22
		T3 - G50:L50	8,53 \pm 0,43	7,69	9,36	8,44 \pm 1,16	6,17	10,72
		T4 - G25:L75	6,73 \pm 1,15	4,48	8,97	8,22 \pm 0,83	6,58	9,85
		T5 - L100	8,42 \pm 1,28	5,91	10,93	8,89 \pm 0,62	7,68	10,09

Nitrógeno amoniacal asimilable ($\mu\text{g N-NH}_4 \text{ g}^{-1}$ suelo). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	6,1 \pm 0,05	5,97	6,21	6,65 \pm 0,65	5,44	7,90
		T2 - G75:L25	8,85 \pm 1,35	6,21	11,44	6,25 \pm 0,65	4,97	7,50
		T3 - G50:L50	6,95 \pm 0,85	5,32	8,62	7,8 \pm 0,6	6,60	8,96
		T4 - G25:L75	13,7 \pm 2,4	9,03	18,36	7,75 \pm 1,75	4,35	11,18
		T5 - L100	6,85 \pm 0,25	6,32	7,33	7,55 \pm 0,75	6,13	9,00
	+ P	T1 - G100	5,65 \pm 0,15	5,40	5,90	8,35 \pm 1,5	5,42	11,29
		T2 - G75:L25	6,8 \pm 0,2	6,43	7,21	7,1 \pm 0,9	5,29	8,87
		T3 - G50:L50	6,8 \pm 0,2	6,45	7,18	7,5 \pm 0,95	5,63	9,42
		T4 - G25:L75	6,25 \pm 0,05	6,17	6,35	6,95 \pm 0,7	5,62	8,28
		T5 - L100	6,9 \pm 0,1	6,68	7,13	6,95 \pm 0,2	6,58	7,30
Verano	- P	T1 - G100	1,85 \pm 0,35	1,22	2,49	5,6 \pm 0,6	4,41	6,80
		T2 - G75:L25	1,8 \pm 0,4	1,04	2,58	6,05 \pm 0,25	5,52	6,59
		T3 - G50:L50	2,85 \pm 0,6	1,69	4,04	5,85 \pm 0,15	5,58	6,13
		T4 - G25:L75	2,25 \pm 0,4	1,41	3,06	5,8 \pm 0,25	5,29	6,36
		T5 - L100	2,05 \pm 0,3	1,47	2,63	5,35 \pm 0,2	4,95	5,74
	+ P	T1 - G100	2,05 \pm 0,4	1,26	2,86	5,85 \pm 0,4	5,11	6,58
		T2 - G75:L25	2,85 \pm 0,8	1,33	4,39	5,9 \pm 0,45	5,03	6,75
		T3 - G50:L50	2 \pm 0,75	0,53	3,51	5,8 \pm 0,4	5,02	6,59
		T4 - G25:L75	2,7 \pm 0,5	1,73	3,70	5,9 \pm 0,15	5,60	6,17
		T5 - L100	2 \pm 0,4	1,21	2,76	5,45 \pm 0,4	4,68	6,21
Otoño	- P	T1 - G100	3,3 \pm 0,45	2,44	4,16	2,75 \pm 0,15	2,47	3,05
		T2 - G75:L25	4,35 \pm 1,25	1,92	6,82	3,35 \pm 0,35	2,64	4,10
		T3 - G50:L50	4,65 \pm 0,1	4,42	4,88	2,55 \pm 0,2	2,17	2,95
		T4 - G25:L75	3,35 \pm 0,1	3,16	3,55	3,25 \pm 0,35	2,55	3,98
		T5 - L100	3,2 \pm 0,35	2,58	3,85	3,1 \pm 0,25	2,60	3,56
	+ P	T1 - G100	3,15 \pm 0,35	2,47	3,84	2,75 \pm 0,2	2,35	3,17
		T2 - G75:L25	3,9 \pm 0,55	2,83	4,94	3,15 \pm 0,6	1,99	4,34
		T3 - G50:L50	3,5 \pm 0,1	3,32	3,65	2,95 \pm 0,25	2,50	3,42
		T4 - G25:L75	4,15 \pm 0,3	3,61	4,73	3,55 \pm 0,4	2,77	4,36
		T5 - L100	4,15 \pm 0,5	3,19	5,07	2,6 \pm 0,2	2,25	2,94

Fósforo inorgánico asimilable ($\mu\text{g P g}^{-1}$ suelo). Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	28,51 \pm 3,64	21,38	35,65	28,11 \pm 2,45	23,30	32,92
		T2 - G75:L25	25,27 \pm 5,18	15,11	35,43	18,04 \pm 3,54	11,11	24,97
		T3 - G50:L50	23,82 \pm 3,88	16,22	31,43	16,68 \pm 3,02	10,76	22,60
		T4 - G25:L75	23,17 \pm 3,93	15,46	30,88	14,78 \pm 2,52	9,85	19,72
		T5 - L100	29,36 \pm 5,22	19,12	39,60	18,86 \pm 4,46	10,11	27,61
	+ P	T1 - G100	35,33 \pm 2,89	29,66	41,00	59,48 \pm 3,98	51,69	67,28
		T2 - G75:L25	33,99 \pm 3,96	26,23	41,74	36,21 \pm 5,33	25,77	46,66
		T3 - G50:L50	32,78 \pm 4,62	23,72	41,83	37,36 \pm 7,80	22,07	52,66
		T4 - G25:L75	40,14 \pm 5,79	28,79	51,49	41,87 \pm 3,80	34,42	49,33
		T5 - L100	22,82 \pm 0,89	21,08	24,57	37,92 \pm 1,23	35,51	40,32
Verano	- P	T1 - G100	28,60 \pm 2,43	23,84	33,36	29,27 \pm 4,28	20,88	37,66
		T2 - G75:L25	27,93 \pm 5,96	16,24	39,62	23,57 \pm 7,39	9,08	38,06
		T3 - G50:L50	24,38 \pm 3,51	17,51	31,26	23,66 \pm 1,16	21,39	25,93
		T4 - G25:L75	24,98 \pm 4,30	16,55	33,41	26,81 \pm 3,82	19,33	34,30
		T5 - L100	38,07 \pm 6,46	25,40	50,73	15,48 \pm 3,97	7,69	23,27
	+ P	T1 - G100	39,85 \pm 3,47	33,05	46,66	69,48 \pm 10,08	49,72	89,25
		T2 - G75:L25	41,68 \pm 5,44	31,02	52,34	46,80 \pm 4,11	38,75	54,85
		T3 - G50:L50	37,35 \pm 5,33	26,91	47,79	51,09 \pm 12,31	26,96	75,21
		T4 - G25:L75	39,43 \pm 4,06	31,47	47,39	50,89 \pm 5,76	39,61	62,18
		T5 - L100	32,53 \pm 0,28	31,97	33,09	30,10 \pm 5,40	19,52	40,68
Otoño	- P	T1 - G100	30,42 \pm 4,81	20,99	39,85	30,81 \pm 5,01	21,00	40,62
		T2 - G75:L25	22,74 \pm 2,97	16,93	28,56	19,00 \pm 2,84	13,43	24,56
		T3 - G50:L50	21,07 \pm 2,69	15,79	26,35	31,68 \pm 7,65	16,69	46,66
		T4 - G25:L75	19,43 \pm 1,66	16,18	22,67	13,98 \pm 2,17	9,72	18,24
		T5 - L100	19,99 \pm 4,50	11,17	28,81	21,10 \pm 8,40	4,63	37,57
	+ P	T1 - G100	54,50 \pm 4,65	45,38	63,61	63,74 \pm 6,11	51,76	75,72
		T2 - G75:L25	33,33 \pm 3,80	25,88	40,78	40,71 \pm 3,90	33,07	48,34
		T3 - G50:L50	42,36 \pm 7,47	27,72	57,01	38,66 \pm 8,70	21,61	55,71
		T4 - G25:L75	47,40 \pm 2,56	42,38	52,42	57,54 \pm 10,70	36,56	78,52
		T5 - L100	45,34 \pm 6,25	33,10	57,58	68,55 \pm 8,97	50,97	86,12

pH. Valores obtenidos en los muestreos de primavera, verano y otoño de los años 2009 y 2010, ordenados por tratamiento de cobertura vegetal y fertilización fosfórica. Los valores expresados son la media \pm el error estándar de la media (ESM) de cuatro parcelas experimentales ($n = 4$), y los límites inferior (L. I.) y superior (L. S.) del intervalo de confianza de la media a un nivel de probabilidad del 95%.

Estación	Fertilización	Tratamiento	año 2009			año 2010		
			Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)		Media \pm ESM	Intervalo de Confianza (95%)	
				L. I.	L. S.		L. I.	L. S.
Primavera	- P	T1 - G100	7,18 \pm 0,06	7,06	7,30	7,18 \pm 0,06	7,06	7,29
		T2 - G75:L25	7,07 \pm 0,11	6,86	7,28	7,02 \pm 0,06	6,90	7,14
		T3 - G50:L50	6,99 \pm 0,13	6,73	7,25	6,95 \pm 0,06	6,83	7,08
		T4 - G25:L75	6,97 \pm 0,04	6,89	7,05	6,84 \pm 0,04	6,75	6,92
		T5 - L100	6,93 \pm 0,05	6,83	7,03	6,80 \pm 0,16	6,49	7,10
	+ P	T1 - G100	7,13 \pm 0,02	7,10	7,16	7,16 \pm 0,04	7,09	7,23
		T2 - G75:L25	6,96 \pm 0,09	6,79	7,12	6,89 \pm 0,12	6,66	7,11
		T3 - G50:L50	7,00 \pm 0,05	6,90	7,09	6,89 \pm 0,07	6,76	7,03
		T4 - G25:L75	6,96 \pm 0,09	6,77	7,14	6,84 \pm 0,10	6,65	7,03
		T5 - L100	6,89 \pm 0,07	6,74	7,03	6,75 \pm 0,05	6,66	6,84
Verano	- P	T1 - G100	7,39 \pm 0,03	7,32	7,45	7,41 \pm 0,07	7,28	7,53
		T2 - G75:L25	6,98 \pm 0,08	6,83	7,13	7,14 \pm 0,10	6,94	7,34
		T3 - G50:L50	7,14 \pm 0,06	7,03	7,25	7,07 \pm 0,02	7,03	7,12
		T4 - G25:L75	7,02 \pm 0,09	6,84	7,19	7,20 \pm 0,02	7,15	7,24
		T5 - L100	6,99 \pm 0,05	6,89	7,09	7,05 \pm 0,04	6,96	7,13
	+ P	T1 - G100	7,37 \pm 0,03	7,31	7,44	7,34 \pm 0,05	7,25	7,43
		T2 - G75:L25	6,94 \pm 0,12	6,70	7,18	7,06 \pm 0,02	7,03	7,09
		T3 - G50:L50	7,13 \pm 0,05	7,03	7,23	7,09 \pm 0,05	6,99	7,18
		T4 - G25:L75	7,01 \pm 0,10	6,80	7,21	7,00 \pm 0,09	6,82	7,18
		T5 - L100	7,02 \pm 0,03	6,96	7,07	7,04 \pm 0,08	6,89	7,19
Otoño	- P	T1 - G100	7,71 \pm 0,05	7,60	7,81	7,52 \pm 0,08	7,36	7,68
		T2 - G75:L25	7,41 \pm 0,11	7,20	7,62	7,33 \pm 0,06	7,20	7,45
		T3 - G50:L50	7,36 \pm 0,09	7,18	7,54	7,31 \pm 0,08	7,14	7,48
		T4 - G25:L75	7,45 \pm 0,04	7,38	7,53	7,17 \pm 0,07	7,04	7,30
		T5 - L100	7,46 \pm 0,10	7,27	7,66	7,18 \pm 0,08	7,03	7,33
	+ P	T1 - G100	7,54 \pm 0,04	7,47	7,62	7,47 \pm 0,05	7,38	7,56
		T2 - G75:L25	7,44 \pm 0,05	7,34	7,53	7,15 \pm 0,06	7,02	7,27
		T3 - G50:L50	7,40 \pm 0,02	7,37	7,43	7,14 \pm 0,08	6,99	7,29
		T4 - G25:L75	7,29 \pm 0,07	7,15	7,43	7,09 \pm 0,08	6,93	7,24
		T5 - L100	7,19 \pm 0,03	7,14	7,24	7,16 \pm 0,08	7,00	7,32

Parámetros del suelo (marzo de 2008). Determinaciones realizadas sobre muestras representativas del suelo donde se establecerían las parcelas experimentales. Los valores expresados son la media y el error estándar de la media (ESM) ($n = 4$).

Determinaciones		unidades	media	ESM
elementos asimilables	P	mg kg ⁻¹	35,33	1,546
	Ca	mg kg ⁻¹	1516,08	88,876
	Mg	mg kg ⁻¹	244,93	28,365
	K	mg kg ⁻¹	64,33	4,200
cationes de cambio	Ca ²⁺	cmol (+) kg ⁻¹	7,66	0,168
	Mg ²⁺	cmol (+) kg ⁻¹	1,75	0,163
	K ⁺	cmol (+) kg ⁻¹	0,43	0,007
	Na ⁺	cmol (+) kg ⁻¹	0,77	0,011
	NH ₄ ⁺	cmol (+) kg ⁻¹	9,13	0,571
otras determinaciones	pH (en agua)		7,01	0,019
	Materia orgánica	%	1,24	0,043
	C	%	0,72	0,025
	N	%	0,08	0,003
	C/N		9,32	0,107
Análisis mecánico				
carbonatos y M.O.	CaCO ₃	%	0,10	0,002
	Materia orgánica	%	1,22	0,010
fracciones	Limo	%	5,74	0,213
	Arcilla	%	20,60	1,700
	Arena gruesa	%	25,47	2,194
	Arena fina	%	47,93	0,300
totales	Total mineral	%	99,74	0,406
	Total mineral+MO+CaCO ₃	%	101,06	0,398