

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author

Universitat Politècnica de Catalunya

Tesis Doctoral

Estudio de los cambios, durante el proceso de restauración, en la materia orgánica, la biomasa microbiana y la actividad biológica de suelos degradados enmendados con lodos de EDAR sometidos a diferentes postratamientos

Graciela Marando

Noviembre de 2012



Universitat Politècnica de Catalunya

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA AGROALIMENTÀRIA I
BIOTECNOLOGIA

Programa de Doctorado de Biotecnología Agroalimentaria y Sostenibilidad

Estudio de los cambios, durante el proceso de restauración, en la materia orgánica, la biomasa microbiana y la actividad biológica de suelos degradados enmendados con lodos de EDAR sometidos a diferentes postratamientos

Autor: Graciela Marando

Director de Tesis: Dr. Manuel Bonmatí Pont

Codirector de Tesis: Dr. Ramón Josa March

Memoria presentada para optar al título de

DOCTORA POR LA UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Casteldefells, Noviembre de 2012



Acta de qualificació de tesi doctoral

Curs acadèmic: 2012

Nom i cognoms

GRACIELA ALFONSINA MARANDO

DNI / NIE / Passaport

X4788957N

Programa de doctorat

BIOTECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIA I SOSTENIBILITAT

Unitat estructural responsable del programa

Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia

Resolució del Tribunal

Reunit el Tribunal designat a l'efecte, el doctorand / la doctoranda exposa el tema de la seva tesi doctoral titulada

Acabada la lectura i després de donar resposta a les qüestions formulades pels membres titulars del tribunal, aquest atorga la qualificació:

APTA/E NO APTA/E

(Nom, cognoms i signatura) President/a		(Nom, cognoms i signatura) Secretari/ària	
(Nom, cognoms i signatura) Vocal	(Nom, cognoms i signatura) Vocal	(Nom, cognoms i signatura) Vocal	

_____, _____ d'/de _____ de _____

El resultat de l'escrutini dels vots emesos pels membres titulars del tribunal, efectuat per l'Escola de Doctorat, a instància de la Comissió de Doctorat de la UPC, atorga la MENCIÓ CUM LAUDE:

SI NO

(Nom, cognoms i signatura) Presidenta de la Comissió de Doctorat	(Nom, cognoms i signatura) Secretària de la Comissió de Doctorat
---	---

Barcelona, _____ d'/de _____ de _____

RESUMEN

En España, la legislación minera obliga, desde el año 1982, a que todas las actividades mineras realicen trabajos de restauración con el fin de devolver al entorno aquellos terrenos afectados por las actividades extractivas. En la presente tesis doctoral se ha comprobado la aplicabilidad de los lodos de depuradora que han sido sometidos a secado térmico, como fuente de materia orgánica (MO) y nutrientes para sustratos minerales de restauración (residuos de extracción y de trituración) de áreas dedicadas a actividades extractivas de piedra caliza a cielo abierto. La mayoría de los trabajos de restauración de canteras se realizan con residuos de extracción de la propia explotación, sin embargo hasta el momento no se habían utilizado los residuos de trituración. Los residuos de trituración, contienen un alto porcentaje de fragmentos gruesos, que los hacen inhóspitos para la vegetación debido a su pobre capacidad de retener agua y a su capacidad limitada para suministrar nutrientes, por lo que la revegetación directa sería casi imposible. En nuestro trabajo hemos utilizado parámetros bioquímicos como índices de calidad del suelo o indicadores del éxito de la restauración. Los valores obtenidos en dichos indicadores se han comparado con los de los suelos naturales con mínima perturbación antropogénica considerados representativos de los distintos tipos de suelos que existen en Cataluña. Para facilitar los procedimientos rutinarios de análisis del suelo se evaluó el efecto del pre-tratamiento de los suelos (secado al aire o secado al aire y rehumedecimiento) sobre los parámetros bioquímicos.

En la primera parte de la tesis el estudio del rango de valores de Carbono orgánico (C), C-biomasa microbiana (CBM), carbohidratos totales (CHT), carbohidratos extraíbles (CHE), respiración basal (RB) y actividades β -glucosidasa (GLU) y β -galactosidasa (GAL) en los suelos naturales mostró que estos valores son muy variables, pero están generalmente dentro del rango de valores previamente publicados para suelos nativos bajo condiciones mediterráneas. Las variables C, CHT y CHE, CBM y GLU (directamente relacionadas con el contenido de MO, y con el contenido y actividad microbiana) fueron apropiadas para caracterizar los diez suelos estudiados. El secado al aire de las muestras de suelos puede considerarse un pre-tratamiento válido en las evaluaciones de CBM, RB, GLU y GAL de estos suelos. En cambio, el secado al aire y rehumedecimiento sobreestima y modifica el rango de las actividades enzimáticas estudiadas.

En la segunda parte de la tesis, se evaluó el efecto de tres lodos sometidos a secado térmico sobre CHT, CHE, Carbono orgánico extraíble (COE), CBM, RB, GLU y GAL y sobre las características fisicoquímicas de dos tipos de suelos residuales (de extracción y de trituración), y se comparó con la que proporcionaron tres lodos compostados. El ensayo se realizó en lisímetros que fueron llenados con las mezclas de lodo-suelo residual y con los controles, y los muestreos se realizaron inmediatamente después de la preparación de las mezclas y luego de dejarlos en el campo 13 meses. La adición del lodo mejoró claramente las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los suelos residuales y el efecto del tipo de

lodo fue mayor que el del tipo de suelo. El efecto de lodo fue generalmente más duradero sobre el suelo de trituración. Según los cambios observados en CBM y RB, no hay pruebas de que los lodos tuvieran efectos tóxicos importantes. La pérdida MO luego de 13 meses de agregada la enmienda fue menor en las mezclas que contenían lodos compostados. El efecto de los lodos disminuyó más en el tiempo en los parámetros asociados a la MO fácilmente degradable (RB, COE, CBM y CHE). El tipo de suelo residual empleado como substrato sólo tuvo efecto sobre los parámetros que caracterizan la composición de la MO del suelo: COE, CHT y CHE, sin embargo no afectó el CBM, RB y las actividades enzimáticas. Los exudados radiculares y los restos vegetales contribuyeron al incremento los valores de GLU y GAL. El efecto de los lodos difirió con el post tratamiento de los lodos; el secado térmico hizo la MO más fácilmente degradable. Los datos obtenidos en las muestras finales secadas al aire para CBM, GLU y GAL fueron representativos de aquellos obtenidos en muestras a humedad de campo. En contraste, el secado al aire y rehumedecimiento de las muestras de suelo sobreestima los valores de las actividades enzimáticas GLU y GAL, y las estimaciones en estas condiciones no fueron representativas de las realizadas a humedad de campo.

En la tercera parte de la tesis se evaluó la efectividad del proceso de restauración comparando los valores de los parámetros de los suelos restaurados con lo de los suelos naturales y también con los valores obtenidos en una experiencia previa de características similares (experiencia RUBAU). Los indicadores biológicos evaluados nos permitieron asimilar los suelos restaurados a los suelos naturales con características climáticas y litológicas similares, es decir suelos carbonatados con un contenido de orgánica menor al 3%, y con pH superiores a 8 correspondientes a la zona más árida. Los suelos restaurados no mostraron correlación significativa entre las actividades enzimáticas y la MO. Los suelos restaurados de RUBAU presentaron valores superiores de CBM, CHT y CHE, sin embargo, los valores de RB, GLU y GAL en estos suelos han sido inferiores a los hallados en nuestros suelos restaurados. Los valores medios de CBM en las muestras de suelos naturales secado al aire fueron significativamente menores que aquellos de suelos a humedad de campo. En cambio, en los suelos enmendados con lodos no se observaron diferencias significativas luego del pre-tratamiento. El secado al aire aumentó la RB de los suelos naturales, en cambio en los suelos enmendados con lodos, solo la mitad de las muestras analizadas aumentaron los valores de RB respecto a las muestras a humedad de campo. No se observaron diferencias en los efectos de secado al aire y secado al aire más rehumedecimiento sobre los valores GLU y GAL entre suelos restaurados y suelos naturales.

Palabras claves: *Suelos de Cataluña, suelos restaurados, lodos de secado térmico, lodos Compostados, actividad microbiana del suelo, enzimas del suelo, bioindicadores de suelo.*

ABSTRACT

Since 1982 Spanish legislation obliges all companies engaged in mining to carry out restoration work with the view to environmentally recuperate the lands affected by their activities. The present thesis has shown the applicability of sewage sludges that had been subjected to thermal drying or composting, as a source of organic matter (OM) and nutrients to restore mineral substrates (extraction and trituration residues) of areas dedicated to limestone quarrying activities in the open. Presently the quarry restoration activity is being performed with extraction residues; however so far no trituration residues have been used in reclamation work. Trituration residues have a high content of coarse fragments which makes these residual soils inhospitable to vegetation, due to their poor water holding capacity and limited ability to deliver nutrients to the plants; this fact making direct re vegetation almost impossible. In our work we used biochemical parameters as soil quality indices or indicators of restoration success. The values of these indicators were compared with those of natural soils with minimal anthropogenic disturbance. To facilitate the routine procedures of soil analysis, the effect of pre-treatment (air drying or air drying and rewetting) of the soil on its biochemical parameters was evaluated.

In the first part of this thesis β -glucosidase (GLU) and β -galactosidase (GAL) enzyme activities, total (TCH) and extractable (ECH) carbohydrates, organic carbon (C), extractable organic carbon (EOC), basal respiration (BR) and microbial biomass carbon (MBC) were determined in natural soils. The studied biochemical properties were highly variable between sites but their values were generally inside the range of those published before concerning native soils under Mediterranean conditions. The variables C, TCH, ECH, MBC and GLU were appropriated to characterize the ten studied soils. Air-drying soil samples can be considered as a valid pretreatment in MBC, BR, GLU and GAL evaluation of these soils, whereas air-drying plus rewetting led to an over estimation and a change in the ranking of both enzyme activities compared with field-moist samples.

In the second part of the thesis we aimed to evaluate the effects of three composted and three thermally dried sewage sludges on C, EOC, GLU, GAL, TCH, ECH, BR and MBC and on some physicochemical characteristics of two types of debris (extraction soil and trituration soil) from a limestone quarry. Lysimeters filled with debris-sludge mixtures and control soils were sampled immediately after preparation and after being left in the open for 13 months. Adding sewage sludge clearly improved the physicochemical and biological properties of the residual soil and the effect of the type of sludge was greater than that of the type of soil. The sludge effect was generally more durable over the trituration soil. At the end of the experiment the loss of organic matter was lower in the soils amended with composted sludge than in those amended with thermally dried sludge. The sludge effect decreased the most in MR, EOC, MBC and ECH endpoints. The soil type only affected EOC, TCH and ECH. Root exudates and plant debris contributed to β -glucosidase and β -galactosidase activities in the treated soils. The sludge effect differed with the post treatments of the sludges: thermal drying made the sludge organic matter more easily decomposable. The values of MBC and of β -glucosidase and β -galactosidase activities in air-

dried soils had the same ranking as in field-moist soils, whereas air-drying plus rewetting led to a change in the ranking of both enzyme activities compared with field-moist samples.

In the third part of the thesis we evaluated the effectiveness of the restoration process by comparing the values of the parameters of restored soils with those of natural soils and also with those of residual soils (RUBAU soils) that had been restored in a previous experience with similar characteristics. Evaluated soil biological indicators allowed us to assimilate restored soil to natural soils with similar climatic and lithological characteristics, namely carbonate soils with organic content of less than 3% and pH 8. The restored soils did not show significant correlation between the enzyme activity values and the value of C. The RUBAU soils presented higher values of MBC, TCH and ECH than our restored soils; nevertheless, the values of MR, GLU and GAL in these soils were lower than those present in our soils. MBC's average values in the samples of the natural air dried soils were significantly minor than those from soils to field moisture. On the other hand, in the soils amended with sewage sludge, significant differences were not observed after the pre-treatment. Air drying increased the BR of all the natural soils, whereas only 50% of the air dried soils amended with sewage sludge had higher BR values than those of their corresponding field moist samples. Differences were not observed in the effects of air drying or air-drying plus rewetting on the GLU and GAL values of restored and natural soils.

Keywords: Catalonia soils, soil restored, thermal drying sewage sludge, composted sewage sludge, soil microbial activity, soil enzymes, soil bioindicators.

A mis padres

a los soles de mi vida, Mati, Guille, Ana y Agustín

a Guillermo

Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa, ve... Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor... Quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas nada sabe acerca de las uvas.

Paracelso

Vivimos en una época peligrosa. El ser humano ha aprendido a dominar la naturaleza mucho antes de haber aprendido a dominarse a sí mismo.

Schweitzer, Albert

*No importa cuántas veces caíste, si cada vez te volviste a levantar,
el éxito en la vida no consiste en la prisa de correr, si no, en llegar.
No importa si perdiste una partida, acepta que ganaste en experiencia,
la lucha de la carrera de la vida no es de rapidez, si no, de resistencia.
No importa donde, como, ni por qué, en medio del error cometido ten
la grandeza de decir .ME EQUIVOQUE!
y si caíste estando a punto de llegar
¡TEN EL VALOR DE VOLVERTE A LEVANTAR!*

María Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

Es momento de mirar hacia atrás y recordar los momentos vividos, las alegrías y frustraciones compartidas y la gente que he conocido durante todos estos años y que han aportado su grano de arena para que esta tesis se concretara.

Quiero agradecer profundamente a mi director Manuel Bonmatí no solo por la confianza y apoyo académico brindados en todos estos años sino también por algo tan profundamente valioso como fue su apoyo humano en todo momento y sobre todo en los más difíciles.

Al profesor Ramón Josa por haber aceptado la codirección y porque fue un apoyo importante desde el inicio de esta tesis.

También agradezco a la profesora Marta Ginovart por su ayuda y asesoramiento en los análisis estadísticos.

A Giovanna Mejía del Instituto químico de Sarriá, por su colaboración en la determinación de aminoácidos en el suelo.

Gracias Oriol Ortiz por remover en el cajón de los recuerdos y facilitarme los datos de la cantera RUBAU.

A Patricia, con quien he compartido todos los avatares del proyecto, muestreos, laboratorio, análisis de resultados y quien colaboró minuciosamente en la corrección de la tesis.

María gracias por la paciencia en los primeros días cuando comencé a trabajar en el laboratorio y no encontraba nada, y por tu ayuda con las técnicas. Cuanto tiempo de eso y cuantos buenos momentos compartidos desde entonces, tanto dentro como fuera del trabajo.

A María Rodríguez, Toñi y Enric por facilitarme siempre el trabajo de laboratorio.

Gracias a mis compañeros de despacho Jordi, Basem y Joan no se imaginan cuánto me han ayudado y cuánto me han brindado en estos años.

Gracias al personal de la escuela y del Departamento que me han facilitado toda la información necesaria para superar los trámites burocráticos y al personal de conserjería por su amabilidad y disponibilidad.

A toda la gente del Proyecto de investigación RESMILOD, con quienes he compartido las experiencias de campo.

También agradezco muchísimo la posibilidad que tuve en estos años de compartir el día a día con tantos compañeros ya sean de doctorado, de proyecto, de comedor, de festejos: Clara, Cristina, Jordi Llorens, Marçal, Carlos Rubio, Marga, Oscar, Montse, Pilar, Eli, Piju, Sonia, Ingrid, Pablo, Joan Simó, Dani, Ana, Aurora, Xavi, Sheila Alcalá, Sheila Benitez, Marithza, gracias a todos por los buenos momentos.

Finalmente, quiero agradecer a las personas más importantes de mi vida, a mis padres incondicionales en su amor, respetuosos de mis decisiones y quienes con enormes sacrificios fueron los que me permitieron llegar hasta aquí. A mi hermana que aunque lejos siempre estamos cerca. A la paciencia, amor, ánimos y apoyo constante que recibí de Guillermo y los chicos Mati, Guille, Anita y Agustín, Uds. hacen que cada día valga la pena ser vivido.

Agradezco a todas aquellas personas que con una sonrisa o algunas palabras cruzadas en el pasillo hicieron que cada día fuera un día mejor. MUCHAS GRACIAS.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Concepto de calidad del suelo	1
1.1.1 Importancia y significado de la materia orgánica como indicadora de la calidad del suelo	3
1.1.1.1 La materia orgánica y su composición	3
1.1.1.2 Transformaciones de la materia orgánica. Consideraciones generales metabólicas	6
1.1.2 Parámetros biológicos y bioquímicos de calidad del suelo	7
1.1.2.1 Una visión general	7
1.1.2.2 Biomasa microbiana del suelo	10
1.1.2.3 Respiración del suelo	12
1.1.2.4 Carbohidratos del suelo	14
1.1.2.5 Actividades enzimáticas del suelo. Las Glucósido Hidrolasas	15
1.1.2.6 El nitrógeno proteico	19
1.2. Los suelos degradados procedentes de la explotación minera de calcárea y su restauración ...	20
1.3 Los lodos de depuradora y su utilización en la restauración de suelos degradados	21
1.3.1 Generación de los lodos de depuradora	22
1.3.2 Tratamiento de los lodos de depuradora	25
1.3.3 Post-tratamiento de los lodos	29
1.3.3.1 Compostaje	29
1.3.3.2 Secado térmico	30
1.3.4 Producción y gestión de los lodos de depuradoras	32
1.3.5 Normativa que regula la aplicación de lodos al suelo	33
1.3.5.1 En la aplicación agronómica	33
1.3.5.2 En la restauración de actividades extractivas	34
2. OBJETIVOS GENERALES	37
3. UTILIZACION DE LOS SUELOS NATURALES POCO PERTURBADOS DE CATALUÑA COMO REFERENTES DE CALIDAD. ESTUDIO DE LOS SISTEMAS DE POST-TRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	
3.1 Introducción	39
3.1.1 Antecedentes	39
3.1.2 El sistema de conservación y pre-tratamiento de los suelos antes de su determinación: el problema de la acumulación de muestras en un corto período de tiempo y la alternativa del secado o del secado y rehumedecimiento	42
3. 2 Objetivos	45
3.3 Materiales y Métodos	46
3.3.1 Área de estudio	46

3.3.1.1. <i>Clima</i>	48
3.3.1.2 <i>Litología y vegetación</i>	49
3.3.2. <i>Características físico-química de los suelos</i>	50
3.3.3 <i>Muestreo</i>	50
3.3.4 <i>Metodología analítica</i>	50
3.3.5 <i>Pre-tratamiento de las muestras</i>	53
3.3.6 <i>Análisis estadísticos</i>	54
3.4 <i>Resultados y Discusión</i>	55
3.4.1 <i>Caracterización físico- química de los suelos</i>	55
3.4.2 <i>Caracterización microbiológica y bioquímica de los suelos</i>	57
3.4.3 <i>Correlación entre los distintos parámetros biológicos</i>	61
3.4.4 <i>Variaciones entre de los parámetros en las distintas localidades</i>	62
3.4.5 <i>Efectos del secado al aire y del secado al aire más rehumedecimiento sobre el C- biomasa microbiana, la respiración basal, la evolución del proceso respiratorio y las actividades β-glucosidasa y β-galactosidasa</i>	64
3.4.5.1 <i>Resultados del ANOVA</i>	64
3.4.5.2 <i>Efecto del secado al aire sobre CBM, RB, EPR y qCO_2</i>	64
3.4.5.3 <i>Efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento sobre las actividades enzimáticas</i>	70
3.4.5.4 <i>Comparación de los efectos del secado al aire con los efectos del secado al aire y rehumedecimiento sobre los valores COE de los suelos</i>	72
4. <i>PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE SUELOS RESIDUALES DE CANTERAS DE PIEDRA CALIZA RESTAURADOS CON LODOS DE DEPURADORAS. EFECTOS DE LOS SISTEMAS DE POST-TRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS SOBRE ESTAS PROPIEDADES.</i>	
4.1 <i>Introducción</i>	75
4.1.1 <i>Los lodos de depuradora y su utilización en la restauración de suelos degradados. Parámetros indicadores de la evolución del proceso restaurador.</i>	75
4.1.2 <i>Efecto de los lodos de depuradora sobre las propiedades bioquímicas de los suelos</i>	76
4.2 <i>Objetivos</i>	79
4.3 <i>Materiales y Métodos</i>	80
4.3.1 <i>Área de Estudio</i>	80
4.3.2 <i>Característica de los Suelos Residuales</i>	81
4.3.3 <i>Características de los Lodos</i>	81
4.3.4 <i>Diseño Experimental</i>	82
4.3.5 <i>Mediciones analíticas de los substratos de restauración</i>	85
4.3.6 <i>Pre-tratamiento de las muestras</i>	86
4.3.7 <i>Análisis estadístico de los datos</i>	87
4.4 <i>Resultados y Discusión</i>	89
4.4.1. <i>Efectos generales</i>	89
4.4.2. <i>Efectos sobre los parámetros físico-químicos</i>	91

4.4.3 Efectos generales sobre los parámetros biológicos.....	92
4.4.4 Cambios en el Carbono orgánico extraíble y en los Carbohidratos Extraíbles.....	93
4.4.5 Cambios en los Carbohidratos totales y en el C-Biomasa microbiana.....	95
4.4.6 Cambios en la respiración basal, en el coeficiente de mineralización y en el Cociente Metabólico.....	97
4.4.7 Cambios en el N proteico.....	101
4.4.8 Cambios en las actividades enzimáticas β -glucosidasa y β -galactosidasa.....	108
4.4.9. Correlaciones entre parámetros.....	112
4.4.10 Efecto del pre-tratamiento (secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento) de las muestras de suelo sobre los parámetros analizados.....	114
4.4.10.1 Resultados ANOVA.....	114
4.4.10.2 Efecto del secado al aire sobre CBM, RBy qCO_2	114
4.4.10.3 Efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento sobre las actividades enzimáticas.....	116
4.4.10.4 Regresión lineal simple de los valores de las actividades enzimáticas entre muestras de suelo secas al aire o secas al aire y rehumedecidas y muestras de suelo a humedad de campo.....	118
4.4.10.5 Estudio de los efectos del secado al aire con los efectos del secado al aire y rehumedecimiento sobre los valores COE de los suelos.....	119
5. EVALUACION DEL PROCESO DE RESTAURACION: COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE LOS PARÁMETROS DE LOS SUELOS RESTAURADOS CON LO DE LOS SUELOS NATURALES Y CON LOS DE OTRA EXPERIENCIA DE RESTAURACION DE SUELOS	
5.1 Introducción.....	121
5.2 Tratamiento de los datos.....	122
5.2.1 Comparación suelos enmendados/suelos naturales.....	122
5.2.2 Comparación del efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento entre suelos naturales y suelos enmendados con lodos sobre carbono de la biomasa microbiana, respiración basal, cociente metabólico y las actividades enzimáticas β -glucosidasa y β -galactosidasa de los suelos.....	122
5.2.3 Comparación de nuestros resultados con los de otra experiencia similar.....	123
5.3 Resultados y Discusión.....	124
5.3.1 Comparación suelos naturales y suelos restaurados.....	124
5.3.1.1 Comparación de los valores medios de los dos grupos de suelos: naturales y restaurados.....	124
5.3.2 Valores medios de los parámetros bioquímicos específicos.....	125
5.3.3 Valores de los parámetros ensayados en suelos naturales y en suelos restaurados.....	126
5.3.4 Análisis de Cluster.....	129
5.3.5 Comparación entre suelos restaurados con lodos de EDAR provenientes de dos experiencias diferentes (RESMILOD y RUBAU).....	132
5.3.6 Comparación del efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento entre suelos naturales y suelos enmendados con lodos sobre CMB, RB, qCO_2 y las actividades enzimáticas de los suelos.....	136
6. RESULTADOS MÁS RELEVANTES	
6.1 Efectos generales de la aplicación de lodos sobre los suelos residuales.....	141
6.2 Efectos del tipo de lodo utilizado en el proceso de restauración.....	142

<i>6.3 Efectos del tipo de suelo residual utilizado en el proceso de restauración.....</i>	<i>143</i>
<i>6.4 Efecto del pre-tratamiento de las muestras de suelo sobre los parámetros analizados.....</i>	<i>144</i>
<i>7. CONCLUSIONES.....</i>	<i>147</i>
<i>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	<i>151</i>
<i>9. PUBLICACIONES ASOCIADAS LA TESIS.....</i>	<i>173</i>

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Procesos asociados con el uso y prácticas de manejo que reducen la calidad del suelo.....	2
Tabla 3.1 Sitios y características de los suelos.....	47
Tabla 3.2 Características físico-químicas de los suelos seleccionados para estudio.....	55
Tabla 3.3 Parámetros biológicos generales y valores de C (valores medios, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) en suelos nativos de Cataluña desarrollados bajo vegetación climax	57
Tabla 3.4 Resultados de ANOVA de un-factor (localización de suelo) para los parámetros estudiados.....	58
Tabla 3.5 Parámetros específicos de los suelos analizados.....	60
Tabla 3.6 Coeficientes de correlación (coeficiente de Pearson) entre los diferentes parámetros biológicos de los suelos (n=9, se omitió muestra Panadella).....	62
Tabla 3.7. Tabla de ANOVA con los valores F en el análisis de los factores pre-tratamiento y tipo de suelo de los parámetros estudiados en los 10 suelos seleccionados.....	64
Tabla 3.8. Efectos del secado al aire sobre la evolución de la respiración CO ₂ -C (μg g ⁻¹ suelo h ⁻¹) durante los 7 días de incubación.....	69
Tabla 3.9. Actividades β-glucosidasa y β-galactosidasa en muestras de suelo a humedad de campo (HC), secas al aire (SA) y secas al aire y rehumedecidas (RH).....	71
Tabla 4.1. Origen, tratamiento y composición de los lodos de aguas residuales que se utilizaron como enmienda orgánica (datos expresados sobre materia seca).....	82
Tabla 4.2. Características físico-químicas iniciales de las mezclas lodo-suelo residual y de los controles...	85
Tabla 4.3. Tabla de ANOVA muestra los valores F de pH, Conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO) y Nitrógeno total (N) en las mezclas suelo-lodo.....	89
Tabla 4.4. Tabla de ANOVA y valores F de carbono orgánico extraíble (COE), carbohidratos totales (CHT), y carbohidratos extraíbles (CHE), carbono de la biomasa microbiana (CBM), respiración basal (RB), coeficiente de mineralización del C (CMC) y actividades β-glucosidasa (GLU) y β-galactosidasa (GAL) en las mezclas.....	90
Tabla 4.5. Propiedades físico-químicas de los controles y las mezclas lodo-suelo residual (valores promedio de 4 repeticiones) en M1* y M2 *.....	92
Tabla 4.6. Valores de carbono orgánico extraíble (COE) y carbohidratos extraíbles (CHE) en los controles y en las mezclas lodos-suelo residual.....	94
Tabla 4.7. Valores de C-Biomasa microbiana y Carbohidratos totales en los controles y en las mezclas lodos-suelo residual.....	96

Tabla 4.8. Valores de Respiración basal (RB) y Coeficiente de mineralización del C (CMC) en los controles y en las mezclas lodos-suelo residual	98
Tabla 4.9. Contenido de C orgánico, N orgánicos y Aminoácidos totales, en suelos enmendados con lodos y en los controles en el muestreo inicial (M1) y al cabo de 13 meses (M2).....	103
Tabla 4.10. Relación molar de cada aminoácido respecto al total de aminoácidos em los suelos enmendados y en los controles.....	107
Tabla 4.11. Valores de actividades β -glucosidasa (GLU) y β -galactosidasa (GAL) en los controles y en las mezclas lodos-suelo residual y su relación con el N-aminoácido (N-AA).....	109
Tabla 4.12 Tabla de ANOVA y valores F de las relaciones β -glucosidasa/C-biomasa microbiana (GLU/CBM) y β -galactosidasa/C-biomasa microbiana (GAL/CBM) en las mezclas lodo-suelo residual.....	111
Tabla 4.13 Variables específicas (β -glucosidasa/C biomasa microbiana y β -galactosidasa/C biomasa microbiana) en los controles y en las mezclas lodo-suelo residual	112
Tabla 4.14 Coeficientes de correlación entre las propiedades físico-químicas y bioquímicas evaluadas en el muestreo final (M2) en las mezclas lodo-suelo residual	113
Tabla 4.15. Tabla de ANOVA (factores pre-tratamiento y mezcla suelo-lodo) con los valores F del carbono de la biomasa microbiana (CBM), respiración basal del suelo (RB), actividades β -glucosidasa (GLU), β -galactosidasa (GAL) y Carbono orgánico extraíble (COE) en las mezclas lodo-suelo residual correspondientes al muestreo final (M2).....	114
Tabla 4.16. Efecto del secado al aire sobre el C-biomasa microbiana (CBM), la Respiración Basal del Suelo (RB) y el cociente metabólico (qCO_2) en las mezclas lodo suelo residual correspondientes al muestreo final (M2).....	115
Tabla 4.17. Actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa en muestras de suelo a humedad de campo (HC), secas al aire (SA) y secas al aire y rehumedecidas (RH).....	117
Tabla 5.1 Valores medios de los parámetros bioquímicos generales estudiados en los suelos restaurados con lodos de EDAR y en los suelos nativos de Cataluña desarrollados bajo vegetación climax	125
Tabla 5.2 Valores de los parámetros bioquímicos específicos en suelos restaurados con lodos de EDAR y en suelos nativos de Cataluña desarrollados bajo vegetación climax.....	125
Tabla 5.3 Resultados de ANOVA de un factor (suelos) para los parámetros estudiados en suelos naturales y suelos restaurados.....	127
Tabla 5.4 Propiedades físico químicas iniciales de los suelos control utilizados en las experiencias RESMILOD y RUBAU.....	132
Tabla 5.5 Propiedades bioquímicas de los suelos control de las experiencias RESMILOD y RUBAU en el muestreo inicial (M1).....	132

Tabla 5.6 Propiedades bioquímicas de los suelos enmendados con lodos de depuradora en las experiencias RESMILOD y RUBAU correspondientes al último muestreo.....	134
Tabla 5.7 Variables específicas en las mezclas lodos-suelo residual de 2 experiencias de restauración en Cataluña.....	136
Tabla 5.8 Prueba t para la comparación de medias de las diferencias en los valores de carbono de la biomasa microbiana (CBM), respiración basal (RB), cociente metabólico (qCO_2) y actividades β -glucosidasa (GLU) y β -galactosidasa (GAL) obtenidos en muestras de suelos secos al aire y muestras a humedad de campo en suelos naturales y en suelos restaurados suponiendo varianzas desiguales	137
Tabla 5.9 Prueba t para la comparación de medias de las diferencias en los valores de las actividades β -glucosidasa (GLU) y β -galactosidasa (GAL) obtenidos en muestras de suelos secos al aire y rehumedecidas y muestras a humedad de campo en suelos naturales y en suelos restaurados suponiendo varianzas desiguales de dos muestras suponiendo varianzas desiguales.....	139

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema del proceso de depuración de aguas residuales.....	25
Figura 1.2 Esquema básico de una línea de lodos.....	26
Figura 1.3 Tratamiento de los lodos	31
Figura 1.4 Destino final de los biosólidos.....	32
Figura 3.1. Distribución geográfica de las localidades de muestreo.....	46
Figura 3.2. División climática de Cataluña.....	49
Figura 3.3. Diagramas estrella de los parámetros estandarizados con la localización de los diez suelos. C: Carbono orgánico del suelo, CHE: Carbohidratos extraíbles, CHT: Carbohidratos totales, GLU: β -glucosidasa, CBM: C-Biomasa. GAL: β -galactosidasa. BR: Respiración Basal.....	63
Figura 3.4. Valores de C-biomasa microbiana en suelos a humedad de campo y secos al aire. Para cada pre-tratamiento medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los suelos ($P \leq 0,05$). Para cada suelo medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre pre-tratamientos ($P \leq 0,05$).....	65
Figura 3.5. Efecto del secado al aire sobre la Respiración Basal del suelo. Letra o letras diferentes indican diferencias significativas entre suelos y entre pre-tratamientos ($P \leq 0,05$).....	66
Figura 3.6. Efecto del secado al aire sobre el cociente metabólico (qCO_2). Letra o letras diferentes indican diferencias significativas entre suelos y entre pre-tratamientos ($P \leq 0,05$).....	67
Figura 3.7. Actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa determinadas en muestras de suelo bajo condiciones de campo, secas al aire y secas al aire y rehumedecidas.....	72
Figura 3.8. Valores de C orgánico extraíble en suelos secados al aire y secados al aire y rehumedecidos. Para cada suelo, medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre pre-tratamientos ($P \leq 0,05$).....	73
Figura 4.1 Mapa de localización de la zona de la experiencia.....	80
Figura 4.2 Equipo para la dosificación y mezcla de los residuos para la preparación de los substratos ensayados....	83
Figura 4.3 Carga de los substratos ensayados durante la experiencia.....	83
Figura 4.4 Gravas del fondo del contenedor para asegurar el drenaje.....	83
Figura 4.5 Colectores del agua de drenaje.....	84
Figura 4.6 Disposición de los lisímetros.....	84
Figura 4.7. Valores de cociente metabólico en suelos control y en suelos enmendados con lodos en los dos períodos de muestreo (M1 y M2). Barras dentro de un mismo período de muestreo con la misma letra o letras minúsculas no muestran diferencias significativas entre los distintos tratamientos de acuerdo a la prueba de SNK ($P < 0,05$). Barras dentro de un mismo tratamiento con la misma letra mayúscula no muestran diferencias significativas entre periodos de muestreo de acuerdo a la prueba de SNK ($P < 0,05$).....	101
Figura 4.8. Perfil cromatográfico representativo de aminoácidos totales obtenidos de la mezclas MT-E. Asp asparagina más ácido aspártico, Ser serina, Glu glutamina más ácido glutámico, Gly glicina, His histidina, NH ₃ amoniaco, Arg arginina, Thr treonina, Ala alanina, Pro prolina, Cys cisteína, Tyr tirosina, Val valina, Met metionina, Lys lisina, Ile isoleucina, Leu leucina, N-Leu norleucine, Phe fenilalanina.....	101

Figura 4.9. Relación entre los aminoácidos totales de la materia orgánica del suelo (muestras suelo residual-lodos y controles) y el carbono orgánico del suelo en (M1) muestreo inicial y en (M2) muestreo final. ** indica $P < 0,01$ y *** indica $P < 0,001$	102
Figura 4.10. Relación entre el N aminoácido y el nitrógeno orgánico total (N) en las mezclas lodo-suelo residual y en los controles en (M1) muestreo inicial y en (M2) muestreo final. ** indica $P < 0,01$ y *** indica $P < 0,001$	104
Figura 4.11. Actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa determinadas en muestras de suelo a humedad de campo, secas al aire y secas al aire y rehumedecidas.....	118
Figura 4.12 Valores de C orgánico extraíble en suelos secados al aire y secados al aire y rehumedecidos. Para cada suelo, medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre pre-tratamientos ($P \leq 0,05$).....	119
Figura 5.1 Dendograma que muestra la agrupación de los suelos.....	129
Figura 5.2 Dendograma que muestra la agrupación de las variables en el conjunto de suelos.....	130
Figura 5.3 Dendograma que muestra la agrupación de las variables en los suelos naturales.....	131
Figura 5.4 Dendograma que muestra la agrupación de las variables en los suelos restaurados.....	131
Figura 5.5 Diferencias en los valores medios de los parámetros bioquímicos entre los suelos restaurados y los suelos control en los muestreos finales. L-S: mezcla lodos suelo RUBAU, S: suelo RUBAU sin enmienda; L-T: media de las mezclas lodos suelo residual de Trituración, T: suelo residual de Trituración; L-E: media de las mezclas lodos suelo residual de Extracción, E: suelo residual de Extracción.....	135

ABREVIATURAS

LT: Suelo natural de la localidad Serra Litoral
CR: Suelo natural de la localidad Serra del Corredor
MN: Suelo natural de la localidad Serra del Montnegre
VC: Suelo natural de la localidad Plana de Vic
OR: Suelo natural de la localidad Serra de l'Ordal
IG: Suelo natural de la localidad Conca d'Odena, Igualada
PN: Suelo natural de la localidad La Panadella
BL: Suelo natural de la localidad Serres dels Camps, Balaguer
LG: Suelo natural de la localidad Serra de la Picarda, La Granja d'Escarp
SG: Suelo natural de la localidad Segre

C: Contenido de Carbono de las muestras de suelo
N: Contenido de Nitrógeno de las muestras de suelo
COE: Carbono orgánico extraíble
CHT: Carbohidratos totales
CHE: Carbohidratos extraíble
RB: Respiración Basal
CBM: Carbono de la biomasa microbiana
GLU: actividad enzimática β -glucosidasa
GAL: actividad enzimática β -galactosidasa
qCO₂: Cociente metabólico
CMC: coeficiente de mineralización del carbono
pNP: para-nitrofenol

BL: Lodo de EDAR de Blanes
MN: Lodo de EDAR de Manresa
VL: Lodo de EDAR de Vilaseca
SB: Lodo de EDAR de Sabadell
MT: Lodo de EDAR de Mataró
BE: Lodo de EDAR de Besos
T: suelo residual de Trituración
E: suelo residual de Extracción

1

INTRODUCCIÓN GENERAL



Introducción general

1.1 Concepto de calidad del suelo

La formación de los suelos depende de un largo y complejo proceso de descomposición de las rocas, en el cual intervienen factores físicos, químicos y biológicos. La interacción de éstos factores, con factores ecológicos, provoca la desintegración de los minerales que, unidos a los restos de animales y plantas en forma de materia orgánica, originan el suelo. El suelo no es un cuerpo estático sino que mantiene un equilibrio dinámico con el medio que lo rodea, de modo que continuamente se está formando y destruyendo. La destrucción del suelo está provocada por los fenómenos erosivos cuya intensidad natural es similar a la de su formación, una vez alcanzado el equilibrio y el espesor máximo que corresponde a su situación natural. Desde este punto de vista, el suelo se considera un recurso natural renovable, pero el equilibrio del suelo puede ser fácilmente alterado, y la superficie de terrenos fuertemente degradados tiende a aumentar con el consiguiente deterioro del paisaje y de la productividad agrícola o ecológica. Por la forma en que se ha incrementado su velocidad de destrucción, mientras que la de formación permanece invariable, el suelo se ha convertido en un recurso **no renovable** (al menos en una escala de tiempo humano).

El suelo, considerado uno de los ecosistemas terrestres más vitales, es esencial para la continuidad de la vida en el planeta. Como fuentes, depósitos y transformadores de nutrientes de las plantas, los suelos poseen una influencia primordial sobre los ecosistemas terrestres. Los suelos reciclan continuamente restos de plantas y animales, son los mayores sistemas de soporte de la vida humana y determinan la capacidad de producción agrícola de las tierras. Los suelos pueden amortiguar y filtrar contaminantes, almacenar humedad y nutrientes, y son también importantes fuentes y receptores de CO₂, metano y óxido nitroso. Son un sistema clave para el ciclo hidrológico y también constituyen un archivo de información sobre las condiciones climáticas pasadas y de las influencias humanas (Blum, 1998).

Los suelos europeos, y particularmente los mediterráneos, cuentan en su haber con una larga tradición de uso que los sitúa entre los suelos terrestres más afectados por la presión antrópica, lo que los ha llevado a que perdieran calidad y fertilidad (Rubio y Recatalá, 1998). La idea de desarrollar criterios de calidad de suelo y utilizarlos para facilitar el mejor uso y manejo del mismo fue introducida hace más de 30 años (Alexander, 1971, Warkentin y Fletcher, 1977) pero su más rápida evolución y adopción se dio durante la última década (Karlen *et al.*, 2003). En el pasado, la calidad del suelo se entendía como la capacidad inherente del suelo para suministrar nutrientes esenciales a las plantas. Este criterio ha variado: Larson y Pierce, (1991) definen la calidad del suelo como “*la capacidad de un suelo para funcionar*

dentro de los límites del ecosistema y para interactuar positivamente con el ecosistema circundante”. La calidad del suelo comenzó a ser vista como un instrumento sensible y dinámico para documentar la respuesta del suelo al manejo, o a la resistencia al estrés impuesta por las fuerzas naturales o usos humanos (Arshad y Coen, 1992; Haberern, 1992). Doran (2002), define la calidad del suelo como la “capacidad de éste para funcionar dentro de los límites de un ecosistema, sostener la productividad de plantas y animales, mantener o mejorar la calidad del aire y del agua, y sostener la salud humana y el hábitat”. La calidad debe interpretarse como la utilidad del suelo para un propósito específico en una escala amplia de tiempo (Carter *et al.*, 1997).

Con frecuencia el suelo tiene la capacidad de amortiguar los efectos de condiciones potencialmente perjudiciales o puede filtrar materiales incorporados que son potencialmente peligrosos, por lo menos hasta un cierto valor. En algunas circunstancias el potencial del suelo para atenuar las consecuencias del cambio por influencias externas, por ejemplo, las aplicaciones de lodos de depuradora que contienen metales pesados, podría ser considerado una propiedad de alto valor del suelo. En este contexto, el suelo podría tener una gran calidad, pero por esta capacidad amortiguadora, en el suelo pueden acumularse contaminantes hasta niveles que sobrepasen un umbral y como consecuencia, el suelo enmendado se consideraría de mala calidad (Nortcliff, 2002). Los cambios en la calidad del suelo pueden ocurrir por muchas razones, en la Tabla 1.1 se resumen una serie de procesos asociados con el uso del suelo que reducen la calidad del mismo.

Tabla 1.1: Procesos asociados con el uso y prácticas de manejo que reducen la calidad del suelo (Carter *et al.* 1997).

Proceso	Efecto en la calidad/atributos del suelo	Posibles efectos en el ambiente
Erosión	Remoción de los primeros centímetros de suelo, pérdida de nutrientes, reducción de la capacidad de regular los flujos de agua y energía.	Deposición de materiales del suelo y pesticidas en ríos y arroyos.
Pérdida de materia orgánica	Reducción de la fertilidad y la estabilidad de la estructura; reducción de la capacidad de regular el flujo de energía en el suelo.	Erosión y degradación del suelo incrementados; efecto invernadero incrementado, debido a la liberación de CO ₂ .
Pérdida de estructura	Reducción de la porosidad y la estabilidad del suelo; reducción de la capacidad de almacenar y transmitir agua en el suelo.	Incremento de la escorrentía y de la erosión hídrica.
Salinización	Exceso de sales solubles y desbalance nutricional; medio adverso para el crecimiento de los cultivos.	Incremento de suelo desnudo y erosión del suelo por el viento.
Contaminación química	Presencia de toxinas; se sobrepasa la capacidad tamponadora del suelo.	Movimiento de elementos químicos por escorrentía y/o lixiviación.

Además de los procesos mencionados en la tabla 1.1, debemos agregar la impermeabilización o sellado del suelo por la construcción de viviendas, carreteras y otras infraestructuras, la compactación, derivada de la utilización de maquinaria pesada, la intensidad del pastoreo, etc., y la disminución de la biodiversidad.

1.1.1 Importancia y significado de la materia orgánica como indicadora de la calidad del suelo

1.1.1.1 La materia orgánica y su composición

La casi totalidad de la materia orgánica presente en los suelos proviene de la macroflora, mientras que la mayor parte de los compuestos originados en su descomposición se deben a la actividad de la microflora.

La materia orgánica (MO) es un atributo clave en la calidad el suelo, ya que contribuye de manera importante en sus principales propiedades químicas, físicas y biológicas. Tiene una relación directa con la estructura del suelo, con los ciclos de los nutrientes, con la movilidad de los contaminantes, y promueve la actividad biológica. Por este motivo, la materia orgánica es necesaria para evitar la degradación, para aportar nutrientes a los cultivos y para mantener equilibrios vitales en el suelo, entre otras funciones. La materia orgánica del suelo es una mezcla de compuestos orgánicos de complejidad variable, desde los residuos poco transformados hasta el material altamente humificado. Ambos extremos tienen características, propiedades y composición diferentes, que afectan a su velocidad de descomposición así como a la cantidad de nutrientes liberados (Doran y Parkin, 1994). Estas diferencias en el estado de transformación de la MO permiten distinguir fracciones que se caracterizan por sus diferentes efectos según su calidad o resistencia a la degradación.

En los últimos años se ha prestado especial atención a la separación de dos fracciones orgánicas: la MO humificada o asociada con la fracción mineral (MOM) y la MO joven o particulada (MOP). La primera es una fracción estable en el tiempo, difícil de degradar por su estructura muy compleja y diferente a la del material que le dió origen. De allí que normalmente hablamos de una composición transformada. Este alto grado de transformación a su vez va acompañado de diferentes formas de protección (la protección física en microporos por la asociación con las partículas minerales del suelo o la protección biológica realizada por los microorganismos integrados en su estructura) que la hacen resistente a la degradación. Esta fracción constituye la porción principal y abarca el 85-95% de la reserva total de MO (Anderson 1979). Por el contrario, la MOP es una fracción poco transformada y por su menor grado de asociación con la parte mineral del suelo resulta una fracción más susceptible a la oxidación. Está formada por restos orgánicos identificables y productos de su descomposición o los productos de la actividad vital de la población microbiana; entre estos productos encontramos proteínas y aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos de distinta naturaleza, ceras, resinas, ligninas y otros (Galantini y Suñer, 2008). Todos estos compuestos representan aproximadamente el 10-15% de la reserva total de MO; constituyen la parte más dinámica de la MO del suelo y se encuentran asociados a la

disponibilidad de los nutrientes (N, P y S) en el corto plazo. Es por esta razón que los componentes lábiles de la materia orgánica pueden ser menos apropiados para indicar la calidad del ecosistema suelo. En cambio los componentes estables, como los materiales humificados (MOM), pueden ser más apropiados para la definición de “calidad del suelo” ya que pueden ser considerados como indicadores de la historia del suelo (Masciandaro *et al.*, 1999).

La materia orgánica en el suelo sigue dos caminos generales de transformación; uno de ellos es su rápida mineralización; otro es la formación de complejos coloidales húmicos, estables y resistentes a la acción de los microorganismos (humus), y por lo tanto de lenta mineralización.

En términos generales el humus se mineraliza a razón 1,5% a 2% al año, en cambio la materia orgánica que se mineraliza rápidamente lo hace a razón de un 30% a 40% al año.

El papel de los microorganismos en la modificación de la materia orgánica se puede sintetizar de la siguiente manera (Frioni, 1999):

- Descomposición de la materia original en compuestos simples, incluyendo la materia orgánica que sirve como unidad estructural en las moléculas de las sustancias húmicas, como las de taninos y ligninas
- Generación de productos de resíntesis y del metabolismo que forman parte de las moléculas de humus (amino-ácidos, proteínas, amino-azúcares y compuestos de naturaleza aromática)
- Producción de fenoloxidasas que oxidan los polifenoles a quinonas.

Comparando los residuos humificados y no humificados, se observa que las mayores pérdidas durante la humificación corresponden a azúcares, almidón, celulosa, grasas y ceras. Las pérdidas en proteínas y descomposición de hemicelulosa son menores debido a su síntesis secundaria en las células microbianas. Las ligninas son los compuestos más estables y sufren muy pocas pérdidas.

Al modificar la acidez y la alcalinidad hacia valores cercanos a la neutralidad, el carbono orgánico de suelo (C) aumenta la solubilidad de varios nutrientes. La materia orgánica del suelo proporciona coloides de alta capacidad de intercambio catiónico. Su efecto en las propiedades físicas se manifiesta mediante la modificación de la estructura y la distribución del espacio poroso del suelo. La cantidad de C no solo depende de las condiciones ambientales locales, sino que es afectada fuertemente por el manejo del suelo.

Carbono y Nitrógeno orgánico

El carbono orgánico del suelo (C) es un componente importante del ciclo global del C, y representa el 69,8 % del C orgánico de la biosfera (FAO, 2001).

El C orgánico del suelo es el principal elemento que forma parte de la MO, por esto es común que ambos términos se confundan o se hable indistintamente de uno u otro. Al respecto cabe señalar que los

métodos analíticos determinan C, (oxidación húmeda o calcinación) y que la MO se estima a partir del C multiplicado por factores empíricos como el de van Benmelen, de valor 1,724 (Jackson, 1964).

El N orgánico del suelo consiste de una mezcla heterogénea de compuestos que van desde los residuos de animales y vegetales, biomasa microbiana, metabolitos microbianos adsorbidos sobre los coloides del suelo y sustancias orgánicas humificadas de mayor estabilidad (Curtin y Weng, 1999).

El N orgánico total está constituido por una fracción activa y otra pasiva (Jansson, 1958). La primera la componen gran parte del N de los residuos frescos de cosechas (en cultivos) u hojarascas (en bosques) o el N de la propia biomasa microbiana, responsable de su mineralización. La fracción pasiva es un material humificado y bioestable, que ya no participa activamente en el proceso catabólico.

Posiblemente a excepción de pequeñas cantidades de nitrógeno (N) de origen geogenico (procedentes de la roca madre, de actividad volcánica, o de la lixiviación de mineralizaciones), el N es el único nutriente esencial para las plantas que no se libera por la alteración de los minerales en suelos.

La mayor proporción del N en la tierra se encuentra en la materia orgánica del suelo (55×10^{10} t). Los microorganismos convierten el N orgánico en formas minerales (NO_3^- , NH_4^+). Estas formas de N constituyen el sustento de la biomasa en crecimiento (plantas y animales). Un compartimiento de relevancia está constituido por los vegetales y sus residuos (1,77%) y una muy pequeña fracción corresponde a los organismos (0,17%) y a las formas disponibles de N (0,17%) (Haynes, 1986, citado por Echeverría y Rozas, 2005).

La relación C/N es un parámetro que evalúa la calidad de los restos orgánicos de los suelos. Es importante conocer la relación C/N de los residuos que se incorporan al suelo para poder determinar el tiempo y la cantidad de N que será inmovilizado por los microorganismos del suelo, que utilizan el N para descomponer los restos orgánicos (inmovilización microbiana), por lo que este nutriente no está disponible para la planta durante el período inicial de descomposición de los restos. Generalmente una relación 20:1, es decir 20 partes de C por 1 parte de N, marca el límite entre la inmovilización y liberación de N.

En general, los lodos de depuradora contienen una gran cantidad de nutrientes para las plantas, tales como nitrógeno (N) y fósforo (P), y su reciclaje se ha practicado durante décadas en la agricultura como sustituto de la fertilización mineral. La velocidad con que las fuentes de nitrógeno orgánico se mineralizan depende de las propiedades del suelo y del residuo orgánico utilizado (Parker y Sommers 1983). Dependiendo del tipo de residuo adicionado al suelo se puede producir una fuerte inmovilización del nitrógeno como en el caso de suelos que han sido mezclados con residuos sólidos urbanos e incubados durante 42 semanas en laboratorio (Delgado et al. 1999), una ligera inmovilización como en el caso de los lodos de secado térmico y excretas sólidas o una liberación rápida del nitrógeno como en el caso de los lodos frescos o purines (Martín et al., 2006).

C y N mineralizables

El carbono y nitrógeno mineralizables son un buen estimador de la materia orgánica lábil, que consiste en materiales con una relación promedio relativamente alta de C/N (15 a 30) y una corta vida media (la mitad de esos materiales pueden ser metabolizados entre unos pocos meses y unos pocos años). Los componentes incluyen la biomasa viva, alguna de las partículas finas de detritus (la referida MOP), la mayoría de los polisacáridos y otras sustancias no húmicas, así como algunos de los ácidos fúlvicos más lábiles. Este pool activo provee la mayoría del sustrato fácilmente accesible para los microorganismos y la mayoría del nitrógeno mineralizable. Es responsable de gran parte de los efectos beneficiosos sobre la estabilidad estructural, que conduce a aumentar la infiltración de agua, la resistencia a la erosión y la facilidad de laboreo. Este pool raramente sobrepasa del 10 al 20 % del total de MO.

Fracción ligera

El fraccionamiento físico del suelo que usa la separación por densidad puede ayudar a evaluar la dinámica de la MO. La fracción ligera (FL) es un material relativamente inalterado y está caracterizada por una alta relación C/N, tiene una rápida tasa de recambio, su densidad específica es menor que la de los minerales del suelo y es de origen más reciente que la fracción pesada (FP).

1.1.1.2 Transformaciones de la materia orgánica. Consideraciones generales metabólicas

Las transformaciones de la materia orgánica se realizan principalmente por hidrólisis, oxidación-reducción, generación de radicales libres, condensación y polimerización o fototransformación (Kononova, 1966). La mayor parte de las transformaciones de las moléculas orgánicas transcurre en la solución del suelo y están reguladas por enzimas que afectan a los más de diez mil compuestos diferentes que puede llegar a tener un suelo. Las enzimas del suelo pueden proceder tanto de microorganismos como de plantas y animales, aunque se considera que la fuente principal de enzimas son los microorganismos; no obstante, la aportación de cada uno de éstos, respecto al contenido enzimático total, varía considerablemente. Globalmente son las bacterias las que contribuyen mayoritariamente al pool enzimático, ya que se estima que son responsables de más del 90 % de los procesos de degradación de la materia orgánica, aunque otros organismos o los exudados radiculares participan significativamente en determinadas transformaciones (Nannipieri *et al.*, 2002).

Los ciclos biogeoquímicos se mantienen porque prácticamente todos los compuestos orgánicos, incluso los xenobióticos persistentes y compuestos polifenólicos de origen natural son degradados por los microorganismos del suelo; el 80-90% de los procesos en el suelo son reacciones mediadas por los microbios (Nannipieri y Badalucco, 2003). La actividad metabólica es la responsable en un suelo de procesos, por ejemplo, tan importantes como los de mineralización y humificación de su materia

orgánica, lo cual incide sobre otra serie de procesos en que se ven incluidos elementos fundamentales en el suelo (C, N, P y S), así como todas las transformaciones en que interviene la biomasa microbiana del suelo. La actividad biológica del suelo se sustenta en las sustancias orgánicas en distintas etapas de descomposición y en los microorganismos vivientes que utilizan el sustrato orgánico como fuente de energía y de carbono. En el suelo ocurren procesos catabólicos y anabólicos en torno a los materiales orgánicos e inorgánicos. El primer proceso proporciona moléculas simples, ATP, energía calórica y CO₂, gas que se utiliza como indicador de la actividad microbiana del suelo. El segundo proceso, el anabolismo, consiste en la síntesis de biomoléculas más complejas a partir de moléculas más sencillas, orgánicas o inorgánicas, con requerimiento de energía (reacciones endergónicas) y de poder reductor, al contrario que el catabolismo. Los microorganismos autótrofos son capaces de sintetizar sus biomoléculas partiendo de sustancia inorgánicas, mientras que los microorganismos heterótrofos deben utilizar los precursores orgánicos fabricados por los autótrofos. Estos procesos del metabolismo, que tienen como resultado la síntesis de componentes celulares a partir de precursores de baja masa molecular, generan la biomasa microbiana del suelo (Sparling, 1997). Por lo general, una disminución de cualquier grupo de especies tiene poco efecto sobre los procesos globales en el suelo debido a que otros microorganismos pueden suplir esa función (Nanninpiéri *et al.*, 2003).

1.1.2 Parámetros biológicos y bioquímicos de calidad del suelo

1.1.2.1 Una visión general

Durante las últimas dos décadas se ha reconocido la importancia del suelo como un componente clave de los ecosistemas naturales influenciados por el hombre. Ha habido un aumento de la demanda para establecer criterios para determinar la calidad del suelo y para desarrollar índices que pueden utilizarse para clasificar y comparar la calidad de los suelos en diferentes ubicaciones o en el mismo lugar a través del tiempo. Nortcliff (2002), considera que la obtención de índices cuantitativos para evaluar la calidad del suelo es difícil, especialmente cuando uno considera que muchos cambios tienen lugar a largo plazo, y por lo tanto un cambio en la calidad del suelo sólo se percibe cuando se combinan todos los efectos durante un período de tiempo. Según Bastida *et al.* (2008) un índice de calidad de suelo podría definirse como el conjunto mínimo de parámetros que, cuando son interrelacionados, proporcionan datos numéricos sobre la capacidad de un suelo para llevar a cabo una o más funciones. Un indicador de calidad de suelo es una propiedad medible que influye en la capacidad de un suelo para llevar a cabo una función dada.

La identificación efectiva de indicadores apropiados para evaluar la calidad del suelo debe considerar los múltiples componentes de la función del suelo, en particular el productivo y el ambiental (Barrios *et al.*, 2006).

Larson y Pierce (1991) y Doran y Parkin (1994) plantearon un conjunto mínimo de propiedades del suelo para ser usadas como indicadores que puedan reflejar posibles problemas de producción y que sean capaces de monitorizar cambios en el tiempo de la calidad sostenible y ambiental del suelo. La identificación de los parámetros de calidad es compleja por la multiplicidad de factores químicos, físicos y biológicos que controlan los procesos biogeoquímicos y su variación en intensidad con respecto al tiempo y al espacio (Doran *et al.*, 1996).

Larson y Pierce (1991) recomendaron una serie de indicadores sensibles a los efectos del manejo que pueden ser determinados fácilmente por medio de métodos estándar. El conjunto de estos indicadores constituyen el “Minimum Data Set (MDS)”. Entre los principales indicadores físicos, químicos y biológicos que integran el MDS se citan: nutrientes disponibles, fracción lábil y total del carbono orgánico, textura, capacidad para almacenar agua útil para los cultivos, estructura del suelo, resistencia a la penetración, profundidad máxima de exploración de las raíces, pH y conductividad eléctrica. Doran y Parkin (1994) ampliaron este listado e incorporaron indicadores biológicos relacionados con los procesos microbianos: la tasa de descomposición de la materia orgánica del suelo, la biomasa microbiana, el ciclo del nitrógeno y la actividad enzimática, los cuales aseguran una mayor sensibilidad en la determinación de cambios en la calidad del suelo.

Trasar-Cepeda *et al.* (1998) propusieron un índice de calidad bioquímica como una forma de reflejar mejor los complejos procesos que afectan a los suelos. Al respecto, comprobaron una relación entre el contenido de materia orgánica y las propiedades bioquímicas y biológicas. De manera similar, Leiros *et al.* (1999) propusieron que el contenido de nitrógeno total está en función de cinco parámetros bioquímicos y microbiológicos: carbono en la biomasa microbiana, nitrógeno mineralizado, actividad de la ureasa, de la β -glucosidasa y de la fosfomonoesterasa.

Los parámetros físicos y químicos del suelo, tales como la materia orgánica, el contenido de nutrientes y el contenido de agregados, cambian muy lentamente y se requieren muchos años para obtener cambios significativos. Así que los mencionados parámetros son de poca utilidad ya que solo se alteran cuando el suelo ha sufrido un cambio drástico (Filip, 2002). Por el contrario, las propiedades biológicas y bioquímicas del suelo son responsables de los pequeños cambios que ocurren en el suelo, por lo tanto proporcionan información inmediata y precisa sobre los cambios en la calidad del mismo (Nannipieri *et al.*, 1990), ya que la actividad microbiana tiene una influencia directa en la estabilidad y fertilidad de un ecosistema.

Por lo tanto, en las evaluaciones de la calidad del suelo, es de suma importancia que se considere el examen de sus funciones reales y potenciales, y además es importante tener en cuenta los cambios que se traducen en una disminución o pérdida de la función (Nortcliff, 2002). Así pues los indicadores que son especialmente valiosos en el estudio de la calidad del suelo son aquellos que reflejan

o miden los cambios que se producen en las funciones del suelo y que permiten detectar la pérdida o el incremento de calidad (Karlen *et al.*, 2003).

Para que las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo sean consideradas indicadores de calidad deben cubrir las siguientes condiciones (Doran y Parkin, 1994):

- describir los procesos del ecosistema;
- integrar propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo;
- reflejar los atributos de sostenibilidad que se pretenden medir;
- ser sensibles a variaciones de clima y manejo;
- ser accesibles a muchos usuarios y aplicables en condiciones de campo;
- ser reproducibles;
- ser fácilmente interpretables;
- ser sensibles a los cambios en el suelo que ocurren como resultado de la degradación antropogénica;
- y, cuando sea posible, ser componentes de una base de datos del suelo ya existente.

De acuerdo a una revisión realizada por Gil-Sotres *et al.* (2005), sobre indicadores de calidad del suelo, se pone de manifiesto que en la mayoría de los trabajos publicados se elige un pequeño grupo de propiedades edáficas (básicamente propiedades biológicas y bioquímicas) para evaluar la calidad del suelo. Sin embargo también destaca que por desgracia, hay una notable falta de procedimientos adecuados y acordados de evaluación para que estas propiedades sean medidas adecuadamente.

La justificación del uso de funciones microbianas y bioquímicas como indicadores de la calidad del suelo se basa en su papel central en el ciclo del C y del N y en su sensibilidad al cambio. La actividad microbiana es un término usado para indicar la amplia gama de actividades llevadas a cabo por los microorganismos del suelo, mientras que actividad biológica refleja no sólo las actividades microbianas, sino también las actividades de otros organismos en el suelo, incluidas las raíces de las plantas (Nannipieri *et al.*, 1990).

Los atributos biológicos de calidad del suelo incluyen la mayoría de los componentes del suelo y los procesos relacionados con el ciclo de la materia orgánica, tales como C y N orgánico total, biomasa microbiana, C y N mineralizable, y la fracción ligera; actividad enzimática y flora y fauna del suelo (Karlen *et al.*, 1997).

1.1.2.2 Biomasa microbiana del suelo

La biomasa microbiana es el componente viviente de la materia orgánica del suelo, con exclusión de los animales y las raíces de las plantas. Generalmente se expresa en miligramos de carbono por cada kilogramo de suelo seco o microgramos de carbono por gramo de peso seco de suelo. Aunque la biomasa microbiana generalmente representa del 1 al 5 % de materia orgánica del suelo (Dalal, 1998), ejerce una gran influencia tanto en las transformaciones de la materia orgánica (participa en las transformaciones del C, N, P y S, en la degradación de compuestos orgánicos xenobióticos, en la inmovilización de metales pesados, en la formación de la estructura del suelo, etc.), como en el almacenamiento de carbono y nutrientes y sirve por lo tanto como fuente y destino de los nutrientes en los ecosistemas terrestres (Wardle, 1992).

Las condiciones ambientales del suelo son generalmente desfavorables para el crecimiento microbiano, por lo tanto, la microbiota de suelo debe ajustar su fisiología. Los organismos no activos, incluidos los microorganismos en estado de latencia, son los que dominan las comunidades microbianas del suelo en los ecosistemas naturales (Heinemeyer *et al.*, 1989) y la adición de nutrientes limitantes, como es el N, generalmente promueve la descomposición de la materia orgánica debido a la disminución de la relación C/N (Mamilov y Dilly 2002). Durante la descomposición los microorganismos convierten los materiales orgánicos en fuente de energía y en nuevos metabolitos celulares que permiten su crecimiento y mantenimiento. Como el suelo es una fuente limitada de C, la disponibilidad de C dependerá de los materiales orgánicos que se introduzcan en el suelo, además de otros elementos nutritivos esenciales particularmente N, P, K. Bajo las condiciones ambientales adecuadas el reciclado de estos nutrientes estará controlado por el tamaño y la actividad de la biomasa microbiana. Se requiere una cuantificación fiable de la biomasa microbiana con el fin de dilucidar las intrincadas interrelaciones y los mecanismos de control del flujo de entrada/salida de nutrientes y energía en el ecosistema del suelo. La biomasa microbiana representa una fracción lábil de C y elementos nutrientes. De acuerdo a Smith y Paul (1990), los contenidos de biomasa microbiana, teniendo en cuenta diferentes tipos de suelos, bajo distinto tipo de vegetación y de distintas localidades alrededor del mundo, oscilan entre 110 y 2240 kg C biomasa ha⁻¹ (Dilly y Blume, 1998). En los suelos agrícolas a menudo se encuentran entre 200-1000 µg C-biomasa microbiana g⁻¹ de suelo. Esta masa celular fija de 100-600 kg de N y de 50-300 kg de P por hectárea en los 30 cm superiores del suelo. La liberación o fijación de estos nutrientes depende de la dinámica de la vida de los microorganismos.

Las estimaciones de la biomasa microbiana demostraron ser útiles en distintos estudios comparativos de diferentes ecosistemas. Generalmente se han investigado fluctuaciones temporales de la biomasa en sistemas naturales y perturbados, así como también los efectos que sobre ella provocan la labranza, el tipo de suelo, el clima y los cultivos (Pankhurst *et al.*, 1997).

Además del efecto sobre el ciclo de los nutrientes, los microorganismos afectan también a las propiedades físicas del suelo. Los polisacáridos extracelulares microbianos actúan como agentes cementantes de las partículas del suelo, permiten la estabilización de los agregados y ayudan al mantenimiento de la estructura del suelo; por lo tanto, también afectan la capacidad de retención de agua, la velocidad de infiltración, la formación costras, la erodabilidad y la susceptibilidad a la compactación (Nielsen y Winding, 2002). A su vez, la actividad biológica está influenciada por numerosos factores que en definitiva se relacionan con la estructura del suelo, tales como humedad, temperatura, contenido de arcilla, etc.

La biomasa microbiana del suelo se compone de una gran variedad de especies. La diversidad de especies de una comunidad microbiana está relacionada con su estabilidad y cuando una o varias especies alcanzan una alta densidad, la estabilidad generalmente disminuye. Las comunidades heterogéneas establecidas muestran mecanismos homeostáticos que tienden a mantener unas condiciones estables y por lo tanto, contrarrestar las influencias externas, tales como la adición de microorganismos exógenos que podría alterar la composición biológica (Nanninpiéri *et al.*, 1983). Tales mecanismos autorreguladores, junto con la disponibilidad de los espacios "activos" o "biológicos" pueden controlar la calidad y la cantidad de biomasa en el suelo. Dado que las células microbianas generalmente constituyen menos del 1% del suelo, se ha asumido que el factor limitante de la proliferación de microbios en el suelo es el espacio "activo" o "biológico", en lugar del espacio físico o total (Stotzky, 1972).

De acuerdo con Hattori (1973), casi el 80-90% de los microorganismos que habitan en el suelo lo hacen en superficies sólidas. Los mecanismos por los cuales los microorganismos interactúan con la superficie del suelo han sido muy estudiados. Chen (1998) y Huang y Bollag (1998) demostraron que algunas células bacterianas producen polisacáridos extracelulares que interactúan con las partículas de arcilla y que estos complejos polisacáridos-arcilla pueden persistir incluso después de la muerte de los microbios. La adsorción de compuestos orgánicos por los coloides del suelo retarda su degradación microbiana, la ubicación de los posibles sustratos dentro de los poros o microagregados reduce su accesibilidad a los microorganismos del suelo (Ladd *et al.*, 1996).

Los microorganismos están íntimamente relacionados con el ambiente circundante y poseen una alta proporción superficie/volumen que les permite responder rápidamente a los cambios, en comparación a los organismos superiores, y adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales. Teniendo en cuenta las funciones claves de la biomasa microbiana en el buen funcionamiento del suelo, su uso generalizado como un indicador de calidad de suelo no es sorprendente. En algunos casos, los cambios en las poblaciones microbianas o en la actividad pueden preceder a cambios detectables en las propiedades físicas y químicas del suelo con lo que dan una señal temprana del mejoramiento del suelo o una alerta temprana de la degradación del mismo (Nielsen y Winding, 2002).

La biomasa microbiana ha sido sugerida por Powlson y Jenkinson (1981) y Carter *et al.* (1999) como un indicador de los cambios experimentados por la materia orgánica del suelo, y se ha hallado una relación estrecha entre dicha biomasa y el contenido en carbono orgánico del suelo (Jenkinson y Ladd, 1981).

Según Powlson *et al.*, 1987, las medidas a corto plazo de la biomasa microbiana pueden marcar la tendencia de la materia orgánica a largo plazo. Van Gestel *et al.* (1991), consideran que las alteraciones en la biomasa microbiana, como el descenso de la misma, parecen estar determinadas por propiedades de las comunidades microbianas, su tipología y actividad, así como por las condiciones climáticas a las que se ve sometido el suelo, más que a las características edáficas del suelo.

La cantidad de carbono de la biomasa microbiana (CBM) puede ser relacionada con el contenido de carbono total (C) por el cociente microbiano ó biomasa microbiana específica (CBM/C). Este cociente da una medida de la dinámica de la materia orgánica y puede ser usado como indicador de pérdida o acumulación neta de C (Anderson y Domsch, 1989). Utilizando este cociente evitamos el problema de comparar suelos de diferente contenido de materia orgánica (Sparling, 1997).

1.1.2.3 Respiración del suelo

Aunque el CO₂ producido en el interior del suelo puede tener también un origen abiótico (Miglietta *et al.*, 1993), fundamentalmente proviene de su actividad biológica. La producción de CO₂ está asociada a la biomasa microbiana y es un indicador de la actividad microbiológica del suelo (Anderson y Domsch, 1989; 1990). Esta variable puede acusar cambios con el tipo de cubierta vegetal, puede presentar variaciones estacionales y estar vinculada a la etapa de descomposición de los residuos orgánicos (Gispert y Arcara, 1988). También es sensible a las alteraciones producidas por distintos sistemas de labranza (Carter, 1991) y/o rotaciones de cultivo (Campbell *et al.*, 1991), a la presencia de contaminantes (Chander y Brookes, 1993) y a su vez, se acrecienta por la adición de materiales orgánicos.

Según Moreira y Siqueira (2002), la respiración es uno de los parámetros más antiguos de cuantificación de la actividad microbiana. La actividad respiratoria es considerada como una medida de la actividad heterotrófica de los organismos, y el CO₂ es el producto final de la respiración aeróbica (Tate, 1987). La respiración del suelo es el componente más importante en el ciclo del carbono. Se estima que entre el 50-84% del total de CO₂ emitido a la atmósfera desde la superficie de la tierra está constituido por la respiración del suelo (FAO, 2001). La oxidación de los residuos orgánicos que se incorporan al suelo es llevada a cabo por la actividad de los microorganismos y puede valorarse por la producción de CO₂ (dióxido de carbono), que es consecuencia de dicho proceso de oxidación. La cantidad de CO₂ liberado durante la mineralización de la materia orgánica varía ampliamente con el tipo de suelo. Las estimaciones de la producción de CO₂ bajo condiciones controladas de laboratorio incluyen las actividades

microbiológicas; en cambio, en las realizadas a campo influyen también las actividades respiratorias de raíces y animales del suelo.

Rangos usuales de respiración se encuentran entre 10 – 100 kg CO₂ ha⁻¹d⁻¹, pero la mayoría de suelos se encuentran en el rango 25 - 40 kg CO₂ ha⁻¹d⁻¹. En climas cálidos las tasas de respiración son mayores y varían con el pH del suelo, contenido de humedad y disponibilidad de O₂ y de N. Además, son mayores cerca de la superficie del suelo, debido a altas concentraciones de MO y a la disponibilidad de oxígeno. Valores elevados en el flujo de CO₂ indican elevados contenidos de materia orgánica, además de una biomasa microbiana metabólicamente activa y no afectada por factores que puedan inhibir su desarrollo (Jandl y Sollins, 1997; Fu *et al.*, 2000). Por el contrario, valores menores indican bajos contenidos de materia orgánica o una actividad metabólica reducida (Anderson y Domsch, 1993; García y Hernández, 1997; Speir *et al.*, 1999). García *et al.* (1994), en un estudio de actividad microbiana en suelos bajo condiciones ambientales mediterráneas, hallaron valores de aproximadamente 3 mg CO₂-C 100 g⁻¹ suelo día⁻¹ en la mayoría de los suelos estudiados.

La aplicación de fertilizantes orgánicos al suelo es uno de los principales factores que influyen en la emisión de CO₂ y existe una gran demanda de métodos que permitan estimar el impacto de estas aplicaciones en las emisiones gaseosas (Ajwa y Tabatabai, 1994).

El hecho de que la respiración pueda inducirse con diferentes fuentes de energía (respiración inducida) es un reflejo de la potencialidad microbiana de este parámetro (Bastida *et al.*, 2008).

A pesar de sus limitaciones, la respiración continúa siendo el método más común que se usa como indicador de la actividad microbiana y de la descomposición de sustratos específicos del suelo. Estos parámetros indican de manera fehaciente la mineralización que ocurre en el sustrato orgánico del suelo y son indicadores de la calidad de la materia orgánica y salud del suelo.

El coeficiente de mineralización del carbono (CMC) (CO₂/C) (Guitián y Carballas, 1976), que es la proporción estimada de CO₂ en función al C-total del suelo (%) expresa el porcentaje de C orgánico inicial que se mineraliza en un período de tiempo determinado. Constituye un indicador de la actividad biológica en un medio dado y está relacionado con la actividad respiratoria y con la eficacia relativa de los microorganismos en los procesos de descomposición.

Tras el análisis de la biomasa microbiana y la respiración del suelo, el *cociente metabólico* (qCO₂ µg C-CO₂ · mg⁻¹ CBM h⁻¹) (tasa de respiración por unidad de C microbiano) ha sido sugerido para evaluar los efectos de las condiciones ambientales (Anderson y Domsch, 1993; Fließbach *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 1999) y para cuantificar la eficiencia de utilización del sustrato (Wardle y Ghani, 1995; Dilly y Munch, 1998). Un alto qCO₂ puede indicar desde un aumento de la disponibilidad de la fuente de C lábil por unidad de biomasa a un cambio en las poblaciones microbianas (por ejemplo la relación entre la biomasa de hongos y bacterias) (Fließbach *et al.*, 1994; Mamilov y Dilly, 2002) y / o un aumento de la

proporción de la biomasa activa (Wardle y Ghani, 1995; Álvarez y Álvarez, 2000). Valores muy altos de qCO_2 podrían indicar una menor calidad de los sustratos y una disminución en la eficiencia de los microorganismos, según la hipótesis de la optimización energética de los ecosistemas, derivada de la teoría ecológica de Odum (1985) sobre la sucesión de los ecosistemas y la eficiencia metabólica de la microflora edáfica. Así, en ecosistemas jóvenes (inmaduros) el valor de qCO_2 debe ser elevado y en ecosistemas maduros bajo; es decir, la relación entre la respiración total y la biomasa total de un ecosistema debe disminuir progresivamente a medida que el ecosistema alcanza el estado de equilibrio o de estabilidad, salvo que las condiciones sean adversas para el buen funcionamiento del mismo (Doran *et al.*, 1994).

1.1.2.4 Carbohidratos del suelo

Los carbohidratos constituyen del 5-25 % de la materia orgánica del suelo y derivan de varias fuentes: tejidos de plantas y animales, exudados de plantas, tejidos celulares y productos extracelulares microbianos. Los materiales que juegan un rol principal como componente estructural de las plantas superiores son la celulosa (el 15-60 %), la hemicelulosa (el 10-30 %) y la lignina (el 5-30 %), y representan la mayor fuente de carbono y energía para los microorganismos del suelo, a partir de los cuales sintetizan sus polisacáridos y otros carbohidratos que constituyen la mayor parte de los glúcidos hallados en el suelo, por lo tanto gobiernan la actividad biológica (García *et al.*, 2000). Los carbohidratos y gomas microbianas han recibido una especial atención y se considera que solo aquellos derivados de microorganismos parecen estar directamente involucrados en la estabilización del suelo (Albiach *et al.*, 2001). Los carbohidratos aislados hasta ahora en el suelo son monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (cadenas, ramificadas o no, de más de diez monosacáridos). Los polisacáridos representan una clase importante de polímeros biológicos. Su función en los organismos vivos está relacionada usualmente con estructura o almacenamiento (almidón, glucógeno, celulosa, hemicelulosa, quitina).

Como norma general se puede señalar que la estabilidad o resistencia a la descomposición microbiológica de los carbohidratos aumenta en el siguiente orden: azúcares reductores, carbohidratos no reductores, pectina, hemicelulosa y celulosa. Su descomposición se dificulta si forman complejos con compuestos orgánicos (ácidos húmicos, lignina y proteínas) o con materiales inorgánicos (arcillas). Las formas libres de carbohidratos en los suelos son escasas y permanecen en equilibrio dinámico: síntesis-descomposición, ocasionado por la actividad de los microorganismos. La mayor contribución al porcentaje total de carbohidratos en los suelos corresponde a los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa). Los disacáridos y los polisacáridos deben ser hidrolizados hasta monosacáridos para poder pasar la pared celular e ingresar al interior de las células para su utilización.

Existen evidencias que indican que los carbohidratos del suelo, incluyendo los polisacáridos extracelulares microbianos son un factor importante en la estabilización de los agregados del suelo y mejoran la estructura del suelo.

Roberson *et al.* (1991), hallaron que la estabilidad de agregados no era explicada por el carbono orgánico total sino por una fracción de este, los carbohidratos complejos. Jastrow (1996) relaciona la estabilidad de agregados a la fracción liviana de la materia orgánica particulada; Bronick y Lal (2005) mencionan además que la lignina, fenoles, lípidos y polisacáridos entre otros componentes de la materia orgánica inciden en la agregación del suelo. Haynes (2000), al evaluar la relación entre la estabilidad de los agregados y los constituyentes orgánicos, sugiere a los carbohidratos como la fracción orgánica más importante en la formación de agregados estables, de acuerdo con la alta correlación encontrada entre ambas.

1.1.2.5 Actividades enzimáticas del suelo. Las Glucósido Hidrolasas.

En los procesos que conducen a la biodegradación de la materia orgánica participan equipos enzimáticos especializados de los microorganismos.

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones químicas en los sistemas vivos y actúan sobre sustratos específicos transformándolos en productos necesarios para los ciclos biológicos. El estudio de la actividad enzimática de los suelos se basa en el principio de que la mayoría de las transformaciones de su materia orgánica son catalizadas por enzimas cuyo origen se encuentra en las bacterias, hongos, animales del suelo y sistema radicular de vegetales superiores. Globalmente son las bacterias las que contribuyen mayoritariamente a la actividad enzimática, aunque otros organismos o los exudados radiculares participan significativamente en determinadas transformaciones.

Las actividades enzimáticas del suelo están relacionadas con la materia orgánica, las propiedades físicas y la actividad microbiana o biomasa del suelo; cambian mucho más pronto que otros parámetros, y pueden ser usadas como medidas de la actividad microbiana, de la productividad de suelo, y de los efectos inhibitorios de los agentes contaminantes (Tate, 1995). Las perturbaciones en la actividad microbiana del suelo, mostradas por cambios en los niveles de enzimas metabólicas, pueden servir como una estimación de la perturbación del ecosistema.

Los primeros informes sobre las enzimas del suelo fueron presentados por Woods, en el año 1899, (Skujins, 1978). Sin embargo, los progresos fueron pequeños en el área de la enzimología, hasta el año 1950, debido a la falta de una metodología adecuada y la comprensión de la verdadera naturaleza de las enzimas.

Burns (1982) clasificó a las enzimas de acuerdo a su localización en el suelo: (i) activas y presentes intracelularmente en células vivientes, (ii) presentes en restos celulares y células muertas, (iii) extracelularmente libres en la solución del suelo, (iv) adsorbidas a coloides inorgánicos o (v) asociadas con moléculas húmicas. La actividad de una enzima en particular en el suelo depende de las diferentes localizaciones que puede tener la enzima.

Los productos liberados por las complejas enzimas del suelo, pueden ser degradados por otras enzimas presentes o ser utilizados por los microorganismos. Esto puede ser una situación ventajosa para las células microbianas localizadas sobre la superficie de coloides húmicos y que contienen moléculas enzimáticas. De hecho para algunas especies microbianas, el éxito de sobrevivir en ambientes de suelos hostiles, podría depender de una posible asociación con complejos humus-enzima.

Solo un bajo porcentaje de las enzimas que abandonan las células se encuentran estabilizadas, ya que se liberan a un ambiente inhóspito donde pueden ser sometidas a desnaturalización, adsorción, inactivación o degradación por proteasas.

Las enzimas del suelo pueden retener su actividad durante períodos sorprendentemente largos si están adsorbidas a los coloides del suelo o incorporadas en moléculas húmicas (Nannipieri *et al.*, 2002). Estas enzimas unidas a los coloides del suelo son menos susceptibles a la desnaturalización y podrían tener un importante rol ecológico sobre la calidad del suelo debido a que su actividad bioquímica podría permanecer en el suelo a pesar de una rápida reducción de la población microbiana, por lo tanto juegan un rol importante en la función de descomposición de la materia orgánica del suelo (García *et al.*, 1993). La interacción de las enzimas con los diferentes componentes de la fase sólida del suelo se da por diversos mecanismos entre los cuales se incluyen: microencapsulación, enlaces transversales, formación de copolímeros, adsorción, atrapamiento, intercambio iónico y enlaces covalentes (Dick y Tabatabai, 1992).

Sólo las actividades enzimáticas estrictamente intracelulares pueden realmente reflejar la actividad microbiana, ya que la contribución de la enzima extracelular libre activa liberada por las células microbianas es insignificante. Los análisis de las actividades enzimáticas en el suelo no distinguen la contribución de la actividad enzimática intracelular de la extracelular y de la actividad enzimática estabilizada, por lo tanto no dan información válida sobre la distribución y la importancia comparativa de las reacciones mediadas por microbios (Nannipieri *et al.*, 2002). Landi *et al.* (2000) han sugerido que el cálculo de la relación entre la actividad enzimática medida y la biomasa microbiana proporcionaría información más significativa sobre la localización de las actividades enzimáticas medidas. Sin embargo, cualquier cambio en la relación no depende exclusivamente de las variaciones de la actividad enzimática extracelular estabilizada debido a que la actividad de la enzima intracelular también puede aumentar o disminuir sin ningún cambio en la biomasa microbiana (Nannipieri *et al.*, 2003).

El primer problema que limita en gran medida el uso de las actividades enzimáticas individuales como indicadores de la calidad del suelo es que incluso en suelos de alta calidad, tales como suelos climax, muestran un alto grado de variabilidad debido al clima, temporada, ubicación geográfica y factores pedogenéticos. También es muy difícil comparar los valores obtenidos en un experimento con los de otro, porque por lo general se obtienen con diferentes protocolos experimentales, ya sea porque no hay métodos estandarizados o debido a que las muestras de suelo pueden haber sido sometidas a diferentes

tratamientos previos (recogida de muestras, almacenamiento de muestras, secado al aire, etc.) antes de su análisis (Gil-Sotres *et al.*, 2005).

Los tratamientos y métodos de preparación de los suelos tienen un marcado efecto sobre los resultados obtenidos en los ensayos enzimáticos. Así se ha documentado el efecto del secado al aire, las condiciones y temperaturas de almacenamiento y el molido de los suelos (Tabatabai y Bremner, 1970a; Speir y Ross, 1975; Zantua y Bremner 1975; Speir, 1977). Cuando se trabaja con enzimas, es importante homogeneizar las muestras de suelo, porque las enzimas están desigualmente distribuidas en sus fracciones (Speir, 1977). Conviene señalar que las actividades enzimáticas que podemos medir, deben de ser consideradas como medidas potenciales, ya que se miden “in vitro” bajo condiciones óptimas de temperatura y pH y como hemos dicho, a saturación de sustrato.

El uso de soluciones tamponadas, que mantiene el pH óptimo durante la reacción, es esencialmente importante en ensayos enzimáticos en el suelo ya que permiten el control de la ionización de las enzimas y el sustrato.

Alberty (1956) citado por Frankenberger y Johanson (1982), puntualizó que los cambios en la concentración electrolítica cambiaban los coeficientes de activación de los reactivos y el complejo activado y que en consecuencia, el grado de ionización de los grupos ácidos o básicos en la molécula de proteína, podía ser cambiado por la presencia de sales. Todos estos efectos podían provocar un aceleramiento o desaceleramiento de la actividad enzimática del suelo.

Las enzimas del suelo son similares a las enzimas de otros sistemas y la velocidad de la reacción que catalizan depende marcadamente del pH, fuerza iónica, temperatura y presencia o ausencia de inhibidores (Burns, 1978; Tabatabai, 1982). La velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de la enzima si la enzima está saturada de sustrato. En los ensayos de rutina, es normal determinar la actividad enzimática en condiciones de saturación de sustrato. Las investigaciones en cinética enzimática indican que las enzimas libres y las inmovilizadas en diferentes soportes responden, ambas, a las leyes de Michaelis-Menten (Lai y Tabatabai, 1992; Gianfreda *et al.*, 1992). La constante de Michaelis-Menten (K_m) es un parámetro característico de cada enzima en condiciones experimentales, se relaciona con una serie de tasas constantes y mide la afinidad de la enzima por el sustrato. Para la caracterización de las enzimas del suelo, varios investigadores han determinado la K_m , siguiendo el mismo procedimiento empleado para una sola enzima en condiciones experimentales homogéneas. La heterogeneidad del sistema suelo y la presencia de varias enzimas que catalizan la misma reacción hace que la interpretación de la K_m de las enzimas del suelo sea más compleja (Nanninpiéri *et al.*, 1982).

Se conoce a través de distintos trabajos que un buen número de las enzimas del suelo son parcialmente inactivadas (desnaturalizadas) a temperaturas entre 60°C y 70°C (Tabatabai y Bremner, 1970b; Tabatabai y Singh, 1976; Browman y Tabatabai, 1978; Tabatabai y Dick, 1979; Frankenberger y Tabatabai, 1980, 1981).

La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de bioquímica ha clasificado todas estas enzimas en 39 grupos. Estos incluyen enzimas tales como la celulasa y amilasa y algunas glicosidasas que catalizan la hidrólisis de disacáridos.

Las enzimas que actúan sobre glucósidos (CE 3.2) incluyen las glucósido-hidrolasas (CE 3.2.1). Entre las hidrolasas, la α y β -glucosidasas y α y β -galactosidasas son las más importantes debido a que sus productos de hidrólisis, los azúcares, son una importante fuente de energía para los microorganismos del suelo (Eivazi y Tabatabai, 1990). La ecuación de la reacción que catalizan las glucósido hidrolasas es: Glucósido + H₂O ---> Azúcar + aglicon. Se designa como glucósido aquellas sustancias que, sobre la hidrólisis ácida, liberan a uno o varios monosacáridos y un aglicon.

Las glicosidasas generalmente se nombran de acuerdo a los tipos de enlace que hidrolizan. Entre las glicosidasas, la α -glucosidasa (nombre obsoleto maltasa, CE 3.2.1.20), que cataliza la hidrólisis de α -D-glucopiranosidos y la β -glucosidasa (nombre obsoleto gentiobiasa o cellobiasa, CE 3.2.1.21) que cataliza la hidrólisis de β -D-glucopiranosidos, están involucradas en la hidrólisis de maltosa y celobiosa, respectivamente. La β -galactosidasa (CE 3.2.1.23) cataliza la hidrólisis de melibiosa y lactosa y se distribuye ampliamente en la naturaleza. Ha sido detectada en microorganismos, animales y plantas y también ha sido demostrada su presencia en el suelo (Eivazi y Tabatabai, 1988).

Los resultados de Eivazi y Tabatabai (1988), mostraron que, en el suelo, estas enzimas tienen su actividad óptima a pH 6. La temperatura de inactivación enzimática es de 60 ° C para α y β -galactosidasas y α -glucosidasa y 70 ° C para β -glucosidasa. El promedio de los valores de energía de activación de estas enzimas en tres suelos fueron 43,1, 30,8, 57,0 y 32,6 kJ mol⁻¹ para α -glucosidasa, β -glucosidasa, α -galactosidasa y β -galactosidasa respectivamente.

Se ha propuesto la medida de la función catalítica de las glicosidasas en la descomposición de distintas enmiendas orgánicas para evaluar el efecto de las enmiendas sobre la calidad del suelo (Bandick y Dick, 1999). En el caso del añadido cada vez más frecuente de lodos de depuradoras de aguas residuales y de residuos sólidos urbanos compostados, la actividad enzimática del suelo puede verse a su vez afectada por la presencia de metales pesados y de distintos contaminantes orgánicos (Eivazi y Tabatabai, 1990).

Hayano y Tubaki (1985), iniciaron los estudios sobre la distribución y el origen de β -glucosidasa en el suelo. Determinaron, en un suelo con monocultivo de tomate, que más del 50% de la actividad β -glucosidasa se encontraba en la fracción <2 mm. La inhibición selectiva del crecimiento bacteriano o micótico en el suelo seco y rehumedecido, indicó que los hongos eran la fuente más importante de β -glucosidasa en ese suelo.

En cuanto a los valores de actividad β -glucosidasa, Eivazi y Tabatabai (1988), en siete suelos con contenidos de C orgánico entre 5 y 55 mg C g⁻¹ de suelo, la actividad β -glucosidasa varió entre 0,42

y $3,78 \mu\text{mol } p\text{NP g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1}$, mientras que Bandick y Dick (1999) midieron actividades entre $0,29$ y $2,11 \mu\text{mol } p\text{NP g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1}$ en suelos con contenidos de materia orgánica entre el 23 y 41 mg C g^{-1} de suelo bajo diferentes rotaciones de cultivo, fertilizantes y aplicaciones de estiércol. Turner et al. (2002), en un estudio de 29 suelos de praderas permanentes de Inglaterra, de contrastadas propiedades fisicoquímicas y biológicas (contenido de arcilla del $22-68 \%$; carbón total $29-80 \text{ mg g}^{-1}$; C-biomasa microbiano $412-3412 \mu\text{g g}^{-1}$), detectaron una fuerte correlación entre la actividad β -glucosidasa y la relación C_{mic} a C_{total} . Por otra parte, la correlación entre la actividad β -glucosidasa y el contenido de arcilla podría reflejar el potencial de la enzima inmovilizada en el suelo, como se sugiere en varios estudios (Hayano y Katami, 1977; Lensi et al, 1991; Busto y Pérez-Mateos, 2000). Los estudios de Eivazi y Tabatabaí (1990), en 5 suelos agrícolas, mostraron que los valores de la enzima la β -glucosidasa fueron entre 2 y 10 veces superiores a los valores de la enzima β -galactosidasa. Además, observaron que la actividad enzimática disminuía con la profundidad y lo hallaron más correlacionado con los contenidos de C orgánico. En cuanto al efecto de los fertilizantes observaron que las formas alfa sufrían mayor inhibición por sales que las formas beta y la galactosidasa más que la glucosidasa.

La enzima β -glucosidasa puede ser particularmente útil para el control de la calidad del suelo debido a su papel central en el ciclo de la materia orgánica. Las investigaciones han demostrado que de las tres enzimas involucradas en la degradación de la celulosa en el suelo la β -glucosidasa es la más abundante y fácil de detectar, y rara vez está limitada por el sustrato (Debosz *et al.* 1999; Eivazi y Tabatabaí, 1988). De hecho, proporciona una indicación temprana de cambios en el estado de la materia orgánica y su reciclaje (Bandick y Dick, 1999; Debosz *et al.* 1999; Monreal y Bergstrom, 2000).

Recientemente se ha propuesto la medida de inhibición de la actividad de β -galactosidasa como un ensayo rápido y eficaz para medir la toxicidad de los compuestos xenobióticos sobre los microorganismos del suelo (Carbonell *et al.*, 2000; Brohom et al., 2001).

1.1.2.6 El nitrógeno proteico

Las formas orgánicas del nitrógeno del suelo se encuentran en forma de N-proteico (40-50%), aminoazúcares (5-10%), bases púricas y pirimídicas que no exceden el 1% y N de aminoácidos libres (0,4-0,5%). La naturaleza química del resto del N orgánico del suelo es difícil de determinar, integra los heterociclos de las moléculas húmicas lentamente degradables. Un grupo muy estable de aminoácidos y proteínas son los que se encuentran en combinación con arcillas, lignina y otros minerales (Stevenson y Cole 1999). En las fracciones de los ácidos húmicos, un 20-50% del N está constituido por aminoácidos, un 3-10% por aminoazúcares y una pequeña cantidad por bases derivadas de ADN y ARN bacteriano sobre todo. En la fracción fúlvica, un 20-30% es N-aminoácido y 8-10% es N-aminoazúcar.

En la solución del suelo o en los microporos podemos encontrar los aminoácidos libres pero el nivel pocas veces supera $2 \mu\text{g} / \text{g}$ aunque puede ser mucho más alto en la rizosfera. La fracción de

AA libres está muy influenciada por el tiempo, la humedad, el tipo de planta y su edad y la adición de residuos orgánicos. Niveles más altos de AA libres asociados a mayor actividad microbiana. La mineralización del N afecta a un 60-80% de las entradas anuales de N dependiendo del tipo de MO que se incorpore pero siempre queda un remanente de N orgánico asociado al humus en formas muy estables. Éste tiene un tiempo de residencia de siglos y en cambio el N de proteínas y ácidos nucleicos es metabólicamente muy activo y por lo tanto está sujeto a una rápida renovación. La actividad biológica del suelo depende en gran medida de la disponibilidad de este elemento (Alcañiz et al., 2005).

1.2. Los suelos degradados procedentes de la explotación minera de calcárea y su restauración

Los suelos en Europa, como en muchas partes del mundo, se degradan por actividades humanas como la agricultura, la industria, el desarrollo urbanístico, las actividades extractivas y el turismo. Las actividades extractivas, necesarias para el desarrollo económico y social, generan muchas veces un impacto ambiental negativo. La destrucción del suelo y la vegetación y la modificación del relieve original de la zona constituyen los efectos más visibles de este impacto, dado que los materiales se extraen directamente de la tierra en excavaciones superficiales, como canteras o fosos, aunque las repercusiones negativas afectan también a las aguas y a la atmósfera. También existen repercusiones económicas debido al uso de la energía asociada a la extracción y el transporte de dichos materiales. La eliminación de vegetación y la falta de suelo disponible en laderas empinadas inducen un riesgo muy alto de erosión en estas áreas. Además, el método común de explotación de la cantera en terrazas aumenta el drenaje y la erosión física y química del sustrato y dificulta la germinación natural y el establecimiento de las plantas jóvenes, retrasando así la recolonización (Sort y Alcañiz 1996). Por otra parte, las limitaciones de agua y nutrientes en los ecosistemas mediterráneos se incrementan en estas condiciones ambientales.

En Cataluña, la caliza es uno de los recursos más explotados y la fabricación de cemento y áridos constituyen los sectores industriales principales de consumo, actualmente en expansión. El consumo de áridos para la construcción en el año 2008 fue de 44,2 millones de toneladas y la producción de cemento de 6,9 millones de toneladas. La superficie afectada por actividades extractivas es de 14.016 ha (0,44% de la superficie de Cataluña), correspondientes a unas 700 explotaciones activas (*Departament de Medi Ambient i del Habitatge 2011*).

El desarrollo sostenible propone un balance entre el crecimiento económico, en el cual las fuentes naturales sean explotadas con prudencia, y la preservación del ambiente.

El Real Decreto 2994/1982 sobre restauración del espacio natural afectado por actividades mineras utiliza el término “*restauración*” para designar la labor de devolver al entorno aquellos terrenos afectados por las actividades extractivas. Los esfuerzos de recuperación de suelos, incluyendo la restauración, o rehabilitación, se están convirtiendo en una práctica común en áreas sometidas a problemas de degradación.

En los primeros años de entrada en vigor de la ley, la restauración de una actividad extractiva se planteaba mayoritariamente como una repoblación forestal, sin tener en cuenta la reposición del suelo o su fertilidad, lo que provocaba que los árboles plantados no alcanzaran su desarrollo óptimo. Por lo tanto, la reposición de la capa superficial del suelo natural es una pieza esencial para el éxito de toda restauración, ya que de esta operación dependerá, en gran medida, la fertilidad y el desarrollo de la vegetación que se quiere implantar. En la mayoría de los casos no se dispone de tierra suficiente para restaurar toda la zona afectada y frecuentemente se utilizan materiales minerales de rechazo de la actividad extractiva como formadores de suelos en la restauración (Guilamany y Noguera, 1998). Los residuos minerales que se generan en dichos sectores pueden representar entre el 5-10% del recurso mineral extraído. Estos materiales suelen presentar granulometrías desequilibradas y baja fertilidad (deficiencia de nutrientes y baja actividad biológica). Por tal motivo, casi siempre es necesario el empleo de importantes cantidades de abonos y enmiendas orgánicas para conseguir un sustrato que permita un correcto desarrollo de la vegetación. Esto genera una demanda de biosólidos y abre una oportunidad para el aprovechamiento de determinados residuos orgánicos biogénicos, como distintos tipos de compost y lodos de depuradoras, aplicados desde hace tiempo en agricultura ya que, convenientemente estabilizados y controlados, presentan una composición que permite utilizarlos como sustitutos de los abonos orgánicos tradicionales.

1.2 Los lodos de depuradora y su utilización en la restauración de suelos degradados

En los últimos años, los lodos de depuradora están siendo uno de los residuos orgánicos que más interés han despertado para ser aplicados al suelo, y ha sido una opción económicamente ventajosa basada en el beneficio agronómico de añadir elementos fertilizantes (nitrógeno y fósforo) y materia orgánica al suelo (Pascual *et al.*, 1999). La aplicación de estos residuos urbanos como enmiendas propicia una creciente protección y conservación del suelo y contribuye a asegurar las características físico-químicas y biológicas necesarias para mantener el equilibrio del ecosistema (Navas *et al.*, 1999). De esta manera se obtiene un doble beneficio: incrementar los niveles de materia orgánica (MO) del suelo y disminuir el gran volumen de lodos que genera la depuración de aguas residuales.

Aunque el uso de lodos en la restauración de actividades extractivas suponga un riesgo menor que en la agricultura, no por ello deben ser de peor calidad, de forma que sólo se utilizarán en restauración los lodos que también sean aptos para abonar suelos agrícolas. El uso de lodos en la restauración de espacios degradados, en comparación con el uso agrícola, se caracteriza por aportaciones relativamente altas, pero únicas, por unidad de superficie. Además, estas aplicaciones tienen poca tendencia estacional y limitan la dispersión de contaminantes, ya que se aplican en áreas muy localizadas. La información analítica disponible sobre los lodos permite calcular las dosis necesarias con bastante precisión.

Los lodos incorporados al suelo se descomponen rápidamente y favorecen la mineralización del nitrógeno que contienen, con el consiguiente aumento de la concentración de nitratos que pueden ser

lixiviados si no hay plantas que los absorban (Ojeda *et al.*, 2006; Tarrasón *et al.*, 2007). Por este motivo, el aporte de lodos para la restauración está limitado según su contenido de materia orgánica lábil. Así, se recomienda utilizar lodos tan estabilizados como sea posible, y evitar utilizar lodos con grados de estabilidad (materia orgánica resistente en relación a la materia orgánica total) menores al 30 %. Se establece que nunca debe superarse la dosis de 50 toneladas de lodo deshidratado por hectárea (expresada en materia seca) (Alcañiz *et al.*, 2009).

Los metales pesados que puedan contener los lodos suponen un riesgo muy pequeño en las zonas restauradas, ya que se ha comprobado su baja movilidad en el suelo y la limitada transferencia a las plantas (Ortiz y Alcañiz, 2006). Los materiales calcáreos, las margas y los sedimentos arcillosos son los más adecuados para la restauración con lodos y las limitaciones más importantes se presentan en sustratos ácidos y arenosos que facilitan la movilidad o la lixiviación de algunos contaminantes que contienen los lodos.

Respecto a los efectos de los lodos sobre los microorganismos del suelo, Ortiz y Alcañiz (1994) observaron, en un estudio de aplicación de lodos a un suelo calcáreo en dosis de 7,5% y 15%, que la respiración del suelo y la biomasa microbiana fueron proporcionales al contenido de lodos y no detectaron inhibición del crecimiento microbiano a pesar del hecho de que la dosis del 15% de los lodos duplicó la dosis máxima recomendada aplicable al suelo.

1.3.1 Generación de los lodos de depuradora

Durante años y debido al incremento de población y del uso de agua, se ha provocado la pérdida de capacidad autodepuradora de muchos cauces públicos.

Los diversos procesos involucrados en la extracción, tratamiento y control sanitario de los productos de desechos arrastrados por el agua y procedentes de viviendas e industrias, son conocidos con el nombre de depuración de aguas. Los métodos de depuración de aguas se remontan a la antigüedad. Se han encontrado instalaciones de alcantarillado en lugares prehistóricos de Creta y en las antiguas ciudades asirias y aún perduran las canalizaciones de desagüe construidas por los romanos. A finales del siglo XIX la mayor parte de la población de los países desarrollados recolectaba y trataba sistemáticamente las aguas residuales. El establecimiento, con carácter obligatorio, de depuradoras mejora la calidad de las aguas y cauces, sin embargo, el aumento de la calidad y cantidad de los tratamientos genera, a su vez, una gran cantidad de lodos.

Los lodos generados durante el proceso de depuración de las aguas residuales están constituidos por partículas minerales finas y una cantidad importante de materia orgánica. Pueden ser definidos como un subproducto procedente de la transformación microbiológica de la materia orgánica de las aguas residuales. Su producción resulta de un proceso de acumulación consecutivo de tres fenómenos combinados:

- la producción de microorganismos

- la acumulación de materias minerales en suspensión
- la acumulación de materias orgánicas no biodegradables en las condiciones de trabajo

En los procesos de depuración de aguas residuales, la eliminación de la materia orgánica y otras partículas en suspensión de las aguas, genera lodos en dos etapas (Figura 1.1). En la primera etapa (denominada tratamiento primario) los sólidos en suspensión se eliminan del agua por fenómenos meramente físicos mediante un proceso de decantación. En la segunda etapa (denominada tratamiento secundario) se elimina la materia orgánica biodegradable presente en las aguas residuales y que no ha sido retirada durante el tratamiento primario. El tratamiento secundario consiste en favorecer el desarrollo de microorganismos capaces de asimilar la materia orgánica. Una parte de la materia orgánica solubilizada es metabolizada a CO_2 y H_2O , y la otra parte es transformada en materia viva a través del desarrollo microbiano.

Convencionalmente, los procesos de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) se agrupan en: línea de aguas (Pre tratamiento, Tratamiento primario, secundario y terciario) y líneas de lodos (Espesamiento, Digestión, Acondicionamiento, Secado y Eliminación) (Metcalf y Eddy, 1996).

Línea de aguas:

a) Pre-tratamiento: En toda EDAR resulta necesario un tratamiento previo que elimine del agua residual aquellas materias que pueden obstruir las bombas y canalizaciones, o bien interferir en el desarrollo de los procesos posteriores. En el pre-tratamiento se eliminan los sólidos voluminosos, las arenas y gravas, y parte de las grasas mediante tratamientos físicos como tamizado, precipitación física forzada, separación con inyección de aire, etc.

b) Tratamiento primario: Se entiende por tratamiento primario aquel proceso o conjunto de procesos que tienen como misión la separación por medios físicos de las partículas en suspensión no retenidas en el pre-tratamiento. Se realiza, generalmente, en balsas circulares (decantadores primarios) de fondo cónico, donde una parte de la materia orgánica e inorgánica que lleva en suspensión el agua residual se deposita en el fondo por efecto de la gravedad. Las depuraciones biológicas (tratamientos secundarios) pueden incluir esta etapa o no, en función del grado de contaminación del agua. El lodo obtenido en esta etapa se denomina *lodo primario*.

c) Tratamiento Secundario: Su finalidad es la reducción de la materia orgánica presente en las aguas residuales una vez superadas las fases de pre-tratamiento y tratamiento primario. El tratamiento secundario más comúnmente empleado para las aguas residuales urbanas consiste en un proceso biológico aerobio seguido por una decantación, denominada secundaria.

Depuración biológica: el agua llega desde el pre-tratamiento o desde el decantador primario a un reactor donde la materia orgánica contenida en las aguas residuales se digiere mediante la actividad biológica de los microorganismos presentes. Esta actividad se optimiza con la incorporación de aire, de manera que se produce un rápido crecimiento microbiano alimentado por esta materia orgánica y, como consecuencia, disminuye considerablemente su concentración. Esto da lugar a grandes virutas de material en suspensión que se separan en la decantación secundaria. Dentro de este proceso también se puede conseguir la reducción de los compuestos de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes presentes en el agua residual.

Decantación secundaria: es un proceso muy similar a la decantación primaria, donde se produce la separación del agua depurada de los lodos biológicos. El producto que se obtiene se denomina *lodo activo*.

e) Tratamiento terciario: es el tratamiento más avanzado de depuración de las aguas residuales. El objetivo de este tratamiento es la eliminación de sales disueltas, nutrientes, patógenos y materia orgánica refractaria y perfeccionar la reducción de sólidos y demanda biológica de oxígeno. Este tratamiento consiste en un proceso físico-químico que utiliza la precipitación, la filtración y/o la cloración para reducir drásticamente los niveles de nutrientes inorgánicos, especialmente los fosfatos y nitratos del efluente final. El agua residual que recibe un tratamiento terciario adecuado no permite un desarrollo microbiano considerable. Este tratamiento garantiza la desinfección del agua, de forma que se consiga una calidad superior a la de los tratamientos convencionales, que la haga apta para su reutilización en usos que no requieran una calidad de agua potable.

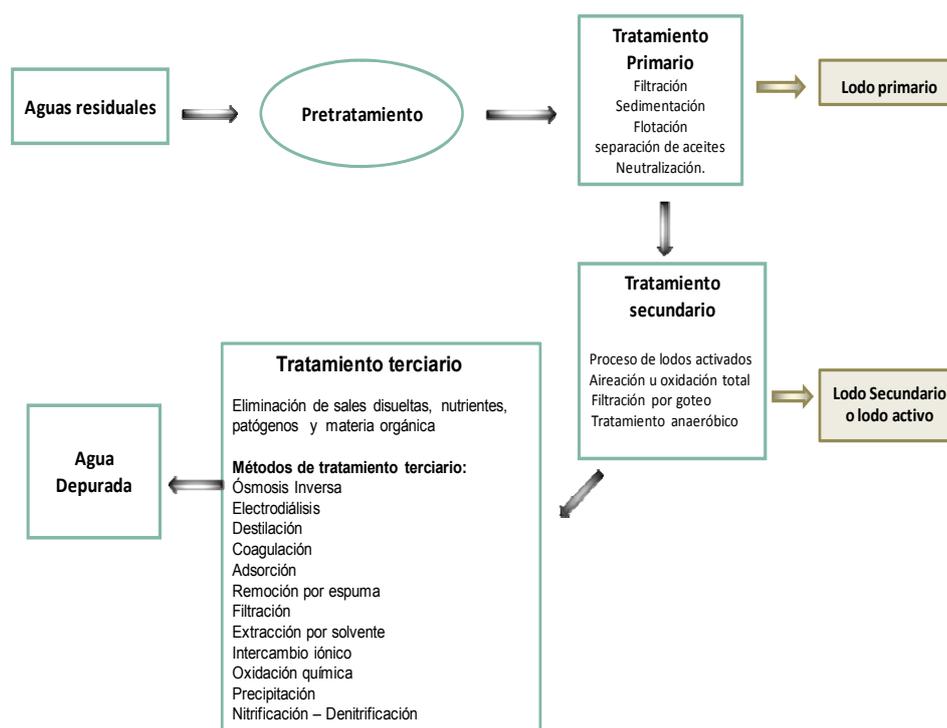


Figura 1.1. Esquema del proceso de depuración de aguas residuales

1.3.2 Tratamiento de los lodos de depuradora

Línea de lodos: En función del diseño de la línea de agua, los lodos generados en una EDAR pueden ser primarios, secundarios o mixtos (mezcla de ambos lodos). Los lodos crudos deben ser sometidos a una serie de procesos para facilitar la gestión de los mismos y minimizar el riesgo medioambiental y salud pública. Con estos procesos se intenta conseguir principalmente: i) Concentrar los lodos para reducir su volumen, ii) estabilizarlos para reducir los microorganismos patógenos presentes en los lodos provenientes de la EDAR, eliminar los olores desagradables y eliminar la capacidad de putrefacción y iii) deshidratarlos para conseguir una textura que permita manipularlos y transportarlos más fácilmente.

Los procesos que se utilizan para alcanzar estos objetivos se presentan en la Figura 1.2 y son los siguientes:

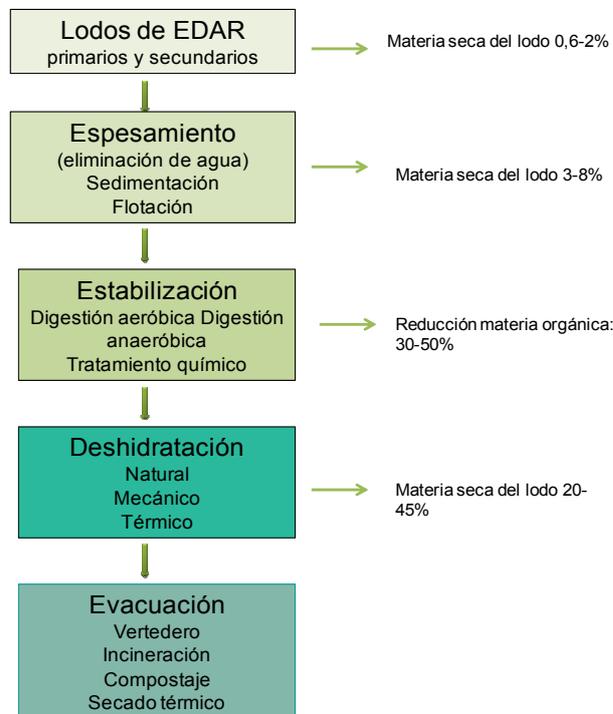


Figura 1.2 Esquema básico de una línea de lodos

a) *Espesamiento:* El espesamiento es un procedimiento que se emplea para reducir el volumen de los lodos mediante concentración o eliminación parcial de agua en tanques de sedimentación o flotación, según la naturaleza del lodo. A veces se realiza un acondicionamiento previo, de tipo físico-químico (coagulación/floculación, elutriación) o térmico.

Los lodos activados que normalmente se bombean desde los tanques de decantación secundaria con un contenido de sólidos del 0.8% pueden espesarse hasta un contenido del 4% de sólidos, consiguiéndose de esta manera una reducción del volumen del lodo a una quinta parte del volumen inicial. Además de la ventaja de reducir el volumen, también se reduce la cantidad de calor requerida para el calentamiento de los lodos en procesos tales como digestión anaerobia, secado térmico e incineración.

b) *Estabilización:* Los medios de estabilización más eficaces son la reducción biológica de la materia lábil, la oxidación química de la materia lábil, la adición de agentes químicos para el control del desarrollo microbiano y la aplicación de calor con el objetivo de desinfectar o esterilizar el lodo.

Existen diferentes técnicas de estabilización, las más utilizadas son:

- i) digestión aerobia
- ii) digestión anaerobia
- iii) estabilización con cal

Los lodos provenientes de la etapa de espesamiento de una EDAR tienen una concentración de sólidos que puede ir desde el 8-10% en los lodos primarios, hasta el 4-7% en lodos mixtos, o el 2-3% en lodos secundarios. De este contenido total de materia sólida de un lodo se puede considerar que aproximadamente un 70% en peso está formado de materia orgánica y un 30% de materia inorgánica o mineral. Sólo la primera puede descomponerse en un proceso de digestión o estabilización.

i) Digestión aerobia: La digestión aerobia de los sólidos se produce, sea o no intencionadamente en cualquiera de los casos de tratamiento secundario convencional. El lodo producido en exceso se conduce, bien sólo o bien mezclado con los lodos primarios, al proceso de aireación prolongada para reducir al máximo la materia orgánica volátil. El lodo secundario tiene una gran cantidad de materia orgánica en forma de células y microorganismos que han estado oxidando la materia orgánica en el tratamiento secundario y que después de éste se encuentra en pequeña proporción. En la estabilización lo que se pretende es continuar la oxidación de la materia orgánica que, en este caso, es celular. Durante la primera fase los organismos consumen la materia orgánica disponible para el crecimiento celular (fase de asimilación o síntesis). Cuando el sustrato disponible se agota, los microorganismos consumen sus reservas y, por tanto, parte de su propia biomasa para obtener la energía necesaria para las reacciones de mantenimiento celular (fase de respiración endógena).

En el tratamiento secundario se desarrolla principalmente la primera fase y cuando los lodos (que son básicamente células) llegan a la estabilización aerobia se desarrolla fundamentalmente la fase de respiración endógena, para completar así la oxidación total de la materia orgánica que entró en la planta de tratamiento. El tejido celular se oxida a dióxido de carbono, amoníaco y agua por vía aerobia. En la práctica solo se puede oxidar del 75-80% del tejido celular.

La digestión aerobia se utiliza en plantas de tratamiento con capacidad inferior a 20.000 m³/día y en procesos biológicos que no tienen tratamiento primario, como es el caso de la aireación prolongada a baja carga. En este último caso, la baja carga y los altos períodos de retención hacen que los lodos biológicos ya estén en parte estabilizados y, por tanto, las necesidades de oxígeno (O₂) son menores, reduciéndose así los costes de explotación. Además, en baja carga la producción de lodos es menor.

La digestión aerobia también se utiliza para lodos mixtos, pero en este caso se necesita un aporte de O₂ hasta 9 veces mayor que cuando se emplea sólo lodo biológico. Esto hace que muchos países no utilicen la estabilización aerobia cuando existen lodos primarios. En cualquier caso, dado el alto coste

económico, en España sólo se utiliza en poblaciones de 40-50000 habitantes, aunque en otros países este límite es más bajo (hasta 10000 habitantes en Inglaterra).

ii) Digestión anaerobia: La digestión anaerobia es uno de los procesos más antiguos utilizados en la estabilización de los lodos. En este proceso la degradación de la materia orgánica contenida en los lodos se realiza en ausencia de oxígeno y consta de tres etapas:

- Hidrólisis de polímeros de la materia orgánica en monómeros.
- Acidogénesis: los monómeros generados (carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos) son convertidos por acción bacteriana en compuestos intermedios identificables de menor peso molecular.
- Metanogénesis: conversión bacteriana de compuestos intermedios a productos finales más simples, principalmente metano y dióxido de carbono.

Sin oxígeno, es imposible oxidar completamente toda la materia orgánica a dióxido de carbono, pero las bacterias obtienen suficiente energía para prosperar gracias a los procesos metabólicos de la fermentación o respiración anaerobia en los que la materia orgánica es degradada en parte.

iii) Estabilización con cal: El fundamento de la estabilización del lodo con cal es la creación de condiciones fisicoquímicas capaces de inhibir el proceso de degradación biológica de la materia orgánica que éste contiene, evitando así la producción de malos olores. Valores elevados de pH (mayor a 12) por un mínimo de dos horas eliminan los estreptococos fecales, se seca la torta y elimina el mal olor propio de los residuos que contiene. Una dosis común implica agregar de 227 a 272 kg de cal viva por tonelada de lodos. Este proceso es tan efectivo como la digestión aeróbica o la anaeróbica, pero a un costo mucho menor (Metcalf y Eddy, 1996). Un pH alto hace precipitar la mayor parte de los metales pesados presentes en el lodo reduciendo su solubilidad y movilidad. La estabilización de lodos con cal puede realizarse tanto con óxido de calcio (CaO) o como con hidróxido de calcio (Ca(OH)₂). El inconveniente que ocasiona este tipo de tratamiento es que se incrementa el volumen de lodos por la cantidad de óxido o hidróxido de Ca añadido.

e) Deshidratación: Luego del proceso de digestión o estabilización con cal, el lodo debe secarse y evacuarse de la manera más práctica y menos costosa posible, aumentando el porcentaje de materia seca para reducir su volumen al máximo. El sistema de deshidratación empleado dependerá de las características de la EDAR, del tipo de lodo y del destino final de los mismos. Las deshidrataciones actuales son casi en su totalidad de tipo mecánico (filtros de vacío, filtros prensa, filtros banda, centrífugas, evaporación térmica o en eras de secado) y con los métodos que se emplean se consiguen lodos deshidratados con un 20-40% en peso de materia seca.

1.3.3 Post-tratamiento de los lodos

Después de su deshidratación parcial, los lodos pueden ser sometidos a dos tipos de procesos: el compostaje ó el secado térmico. Los lodos térmicos y compostados son generados en cantidades importantes, los primeros con el objetivo inicial de adecuar los lodos de EDAR a la normativa de vertederos (Directiva 31/99) y los segundos para ser aplicados en agricultura en caso de cumplir la normativa específica (RD1310/1990) que regula la aplicación de los lodos a los suelos agrícolas y que incorpora la Directiva 86/278 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura.

1.3.3.1 Compostaje

El proceso de compostaje permite producir una enmienda orgánica ambientalmente segura y agronómicamente ventajosa a un costo operacional aceptable.

Se entiende por compostaje la degradación biológica aeróbica de la materia orgánica en condiciones controladas de temperatura, humedad y pH. El compostaje se desarrolla en dos fases: descomposición y maduración. Los lodos tienen una composición y unas características físicas poco adecuadas para el compostaje (exceso de agua y de nitrógeno y pastosidad). Para poder adecuarlos al compostaje es necesario mezclarlos con otros materiales para conseguir que tengan las siguientes características:

- menor contenido en humedad y nitrógeno
- mejor estructura
- relación C/N equilibrada
- proporción adecuada en biopolímeros.

Es aconsejable mezclarlos con materiales residuales ricos en celulosa y ligninas. Los materiales más convenientes para las mezclas son restos vegetales de distintos tamaños y composición, que permiten mejorar la aireación de la mezcla, aportar el equilibrio en biopolímeros y una relación C/N adecuada (Soliva y Huerta, 2004).

Durante el proceso de compostaje la materia orgánica sufre una degradación biológica por microorganismos facultativos. La mezcla sufre una serie de transformaciones: se reduce la humedad y el contenido en MO, varían los contenidos en las distintas formas de nitrógeno, aumenta la estabilidad de la MO y se incrementan relativamente todos los componentes minerales que no puedan ser perdidos por lixiviación o volatilización; algunos fitonutrientes se vuelven más difícilmente asimilables; y aumentan el pH, la conductividad eléctrica y las densidades aparente y real (Mena *et al.*, 2003).

El compost es el producto final obtenido del proceso de compostaje y se caracteriza por estar estabilizado, ser inocuo, estar libre de sustancias fitotóxicas y tener un alto valor fertilizante. El compost posee la capacidad de enmendar las características físicas del suelo pues contribuye a la estabilidad de las

estructuras de sus agregados gracias a la acción de la materia orgánica. El compost también aumenta la capacidad de retención de agua, lo que confiere resistencia a la sequía; mejora la porosidad, lo que facilita la aireación y por ende la respiración de las raíces, y aumenta la infiltración y la permeabilidad al mejorar su estructura. Desde el punto de vista químico el compost tiene una gran capacidad de intercambio catiónico, superior a la de cualquier arcilla; suministra nitrógeno, potasio y fósforo; aporta oligoelementos tales como hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno; y contribuye a solubilizar a algunos elementos minerales del suelo facilitando su asimilación por las plantas. También la actividad biológica del suelo se ve favorecida por la aplicación de compost, no solo por el aporte de un número importante de bacterias, sino por el estímulo al desarrollo de microorganismos autóctonos que contribuyen a la solubilización de componentes minerales insolubles, como los fosfatos, que son necesarios para el desarrollo de las plantas y evita la lixiviación del nitrógeno soluble al transformarlo en nitrógeno orgánico (Torres-Lozada *et al.*, 2005).

1.3.3.2 Secado térmico

Un proceso relativamente nuevo es el secado térmico que utiliza calor intenso (deshidratación a 130° C), para eliminar el agua del lodo hasta el límite para el que se haya diseñado (normalmente alrededor del 90% de sequedad en el lodo). Permite transformar un producto pastoso (20-35% de materia seca) en un producto seco, generalmente en forma de pelets o bolas de entre 1 y 3 mm. Además, provoca la inactivación de patógenos y la eliminación de sustancias químicas volátiles y se obtiene un producto final con bajo olor y ventajas en el transporte y aplicación, debido a la reducción del volumen y al mayor porcentaje de materia seca. Este secado térmico puede ser natural, en camas de arena, o artificial en tambores de secado, los cuales pueden producir concentraciones de sólidos cercanas al 100% (Vesilind, 2003).

En función de la forma de transmisión del calor hay dos tipos de secadores:

Convección: un gas caliente transmite directamente el calor a la materia a secar. La gama de temperaturas del gas es muy variable.

Contacto: los sólidos a secar son calentados por contacto con una superficie caliente (indirecta) por medio de vapor o aceite térmico.

Los secadores de convección necesitan una gran superficie de lodo expuesta a la corriente de gases caliente. En la mayoría de los casos, es necesaria una mezcla de lodo deshidratado y de lodo ya seco, para conseguir formar pequeñas bolas que ofrecen mayor superficie de contacto con el gas y conseguir además una mezcla con el 55% de sequedad para evitar así la fase plástica.

Los lodos provenientes del secado térmico, pueden ser empleados como:

- Corrector orgánico para mejorar la estructura del suelo en la agricultura, si sus características de composición (especialmente en cuanto a metales pesados) lo hacen apto para este fin.
- Combustible de baja calidad, en general en cementeras, incineradoras de basuras y plantas térmicas, con un valor calorífico equivalente aproximado de 4 kg pelets = 1 litro de gasoil.

Cuando no existe otra alternativa que llevar los lodos a vertedero, el secado térmico también minimiza el impacto ambiental ya que se eliminan los lixiviados que pudiera generar y se alarga la vida útil del vertedero.

Al margen de los beneficios medioambientales, la reducción del volumen de lodo a transportar no compensa el coste energético del proceso. Por este motivo, el secado térmico se ha combinado con la instalación de una planta de cogeneración de energía eléctrica, que utiliza como combustible, además de gas natural, el biogás producido en el proceso de digestión del lodo. Al aprovechamiento del biogás se añade la utilización del calor de los gases de combustión y del circuito de refrigeración de los motogeneradores para el proceso de secado, y la producción de energía eléctrica para su utilización en las instalaciones de la depuradora.

Prácticamente la totalidad del lodo generado en Cataluña se ha tratado antes de su destino final. El siguiente gráfico (Figura 1.3) recoge los tratamientos a los que han sido sometidos los biosólidos.

Total de lodo generado: 123.755 toneladas de materia seca

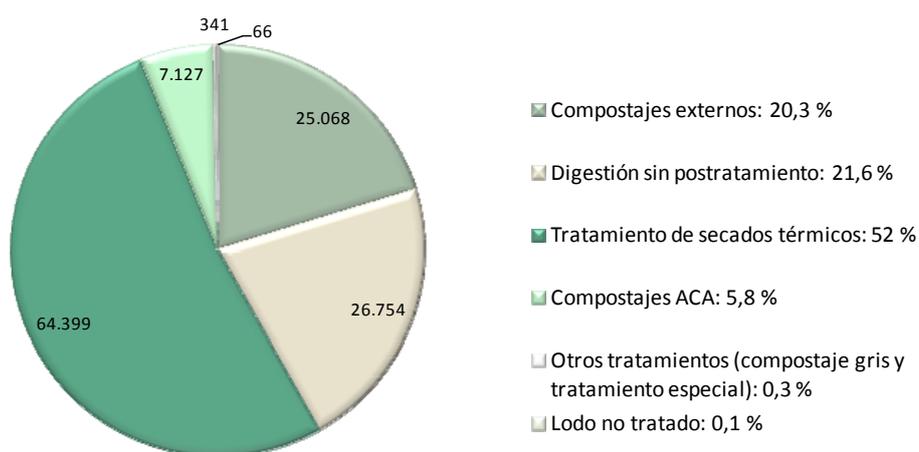


Figura 1.3 Tratamiento de los lodos (Agencia Catalana del Agua, 2011)

1.3.4 Producción y gestión de los lodos de depuradoras

Los lodos provenientes de las EDAR han aumentando considerablemente desde que en 2006 entró en vigor la Directiva europea 91/271 sobre tratamiento de aguas residuales urbanas, transpuesta de la Ley 11/1995 de nuestra legislación. Esta norma obliga a que las poblaciones de más de 2.000 habitantes que viertan en aguas continentales, depuren sus aguas urbanas. En Cataluña en el año 2011 se generaron 123.755 t de materia seca de lodos, provenientes de 414 estaciones depuradoras en funcionamiento. El creciente aumento en la producción de lodos es uno de los principales problemas con los que se enfrenta la Junta de Sanejament para su almacenamiento, transformación y, sobre todo, para su eliminación.

Durante el año 2011, (Figura 1.4) el destino final de los biosólidos producidos por las EDAR urbanas en Cataluña ha sido mayoritariamente la aplicación al suelo. A su vez, una parte importante de los biosólidos ha sido valorizada energéticamente en cementeras tras su secado. En los casos en los que no ha sido posible la valorización de los lodos, estos se han destinado a la disposición en depósito controlado. La aplicación en el suelo incluye el lodo que se ha aplicado de forma directa en la agricultura, el lodo compostado utilizado en jardinería y el utilizado en la restauración de actividades extractivas.

Total eliminado: 117.745 toneladas de materia seca

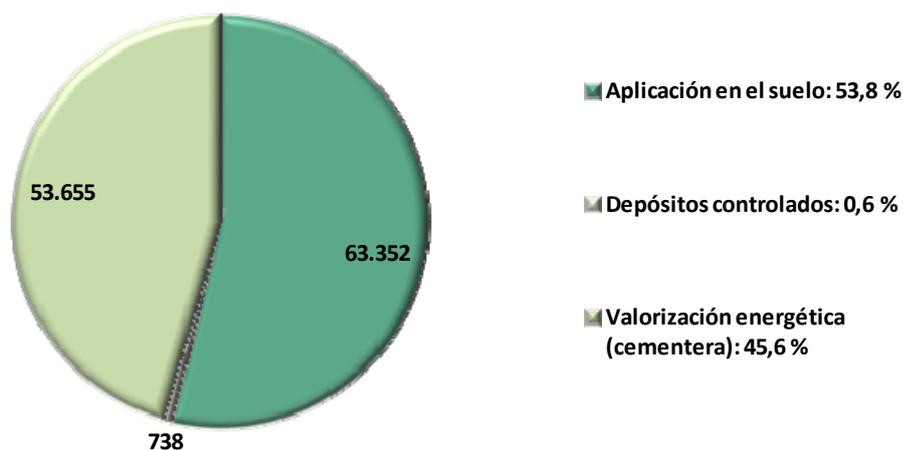


Figura 1.4 Destino final de los biosólidos (Agencia Catalana del Agua, 2011)

1.3.5 Normativa que regula la aplicación de lodos al suelo

1.3.5.1 En la aplicación agronómica

Los lodos de depuración son considerados como residuos no peligrosos y se clasifican con el código **CER 190805** dentro del Catálogo Europeo de Residuos. La Unión Europea regula la utilización de los lodos de depuradora y tiene, con respecto a otros tipos de residuos, la peculiaridad de que ciertos usos y posibilidades de reciclaje están regulados por normas específicas, algunas de carácter agronómico al existir la posibilidad de utilizarlos como abonos y enmiendas orgánicas en los suelos. En este sentido cabe mencionar la Directiva 86/278/CEE y su transposición al derecho español está recogida en el Real Decreto 1310/1990, relativa a la protección del medio ambiente y en particular de los suelos en la utilización de los lodos con fines agrícolas. Esta Directiva regula las condiciones en que podrán ser aplicados los lodos a los suelos agrícolas, condiciones tendientes a la protección del posible efecto nocivo sobre las aguas, el suelo, la vegetación, los animales y el propio hombre. En la Directiva figuran los valores límites relativos a las concentraciones de metales pesados en los suelos (anexo IA), en los lodos (anexo IB), y a las cantidades máximas anuales de estos metales pesados que pueden ser introducidas en los suelos destinados a la agricultura (anexo IC).

La normativa que regula la utilización agrícola de lodos, prohíbe el empleo de lodos no tratados, aunque los Estados miembros pueden autorizar, en las condiciones que determinen, la utilización de los lodos no tratados cuando se inyecten o se entierren en el suelo (en España no está permitido).

La Directiva 91/676/CEE, transpuesta al Derecho español mediante el Real Decreto 261/1996, también se aplica a los lodos para evitar la contaminación producida por nitratos procedentes de fuentes agrarias.

Una Orden del 26 de octubre de 1993, añade algunos requisitos sobre la utilización de lodos en agricultura, tales como la obligatoriedad del suministro de información de la estación depuradora al inicio de su funcionamiento y el envío por el responsable de la depuradora de una ficha semestral elaborada por la entidad que gestiona los lodos de uso agrícola de forma que permita controlar las cantidades dedicadas a fines agronómicos. Además, establece el funcionamiento del Registro Nacional de Lodos adscrito al Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

En el Plan Nacional de Lodos 2001-2006 (Resolución de 14 de junio de 2001), se establecieron las acciones tecnológicas para su reutilización y valoración, según la jerarquía siguiente: aplicación al suelo con fines de fertilización y reciclaje de nutrientes y MO, valorización energética en todas sus variantes (incluida la biometanización), y depósito en vertedero. Así mismo se fijan los principios de gestión, los objetivos ecológicos y la financiación. Se destaca además el interés por caracterizar los lodos, implementar tecnologías de depuración de acuerdo a su reutilización, elaborar códigos para su correcta gestión y desarrollar programas de aplicación en los suelos, así como fomentar el desarrollo de otros usos distintos a la aplicación al suelo.

1.3.5.2 En la restauración de actividades extractivas

Una alternativa para el destino final de los lodos lo constituye el empleo de los mismos para restauración y acondicionamiento de espacios afectados por actividades extractivas, con el fin de recuperar las minas a prados y terreno forestal, y si es posible también la recuperación para la agricultura.

En Cataluña, el marco legal básico referente a la protección y a la restauración de los espacios afectados por actividades extractivas a cielo abierto está constituido, por una parte, por la Ley 12/1981, por la que se establecen normas adicionales de protección de los espacios de especial interés natural afectados por actividades extractivas y, por la otra, por su decreto que la desarrolla: el Decreto 343/1983. Ambas disposiciones son actualizadas por el Decreto 202/1994 y por el Decreto legislativo 14/1994, que establecen normas adicionales más adecuadas al proceso evolutivo que han experimentado la gestión y el control de estas actividades desde 1983. A escala estatal, el marco legislativo básico lo conforman la Ley 22/1973, de 21 de julio, de minas, y el Reglamento de minas, desarrollado en el Decreto 2857/1978.

La Ley 12/1981 fija las directrices básicas para la restauración de los espacios afectados por actividades extractivas con la finalidad de conseguir que, al terminar la explotación, puedan integrarse en el conjunto natural en el que se encuentran. Durante los primeros años de vigencia de la Ley se instauró definitivamente el concepto de restauración integrada. La restauración integrada se basa, entre otros, en el principio de minería de transferencia, que procura aprovechar los movimientos de tierra que genera la misma actividad extractiva para restaurar paralelamente las zonas ya explotadas. La restauración integrada también asegura la reducción de las áreas afectadas a las mínimas imprescindibles, y refuerza el vínculo afección/restauración como premisa obligada de cualquier actividad minera a cielo abierto.

Aunque en las aplicaciones de lodos para la restauración de actividades extractivas debe considerarse la normativa general anteriormente citada, no existe una normativa específica que regule la aplicación de lodos, compost u otros residuos orgánicos en la restauración de explotaciones mineras. No son directamente aplicables las directrices comunitarias o las disposiciones españolas sobre limitaciones en la utilización agrícola de lodos de depuradora (Directiva CEE 86/278, Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 181, de 4 de julio de 1986; Real Decreto 1310/1990), ya que, en muchos casos, el uso final de los terrenos de explotaciones mineras no es agrícola ni la finalidad es mantener o mejorar la fertilidad del suelo con aportaciones periódicas de lodos de depuradora. Contrariamente, se pretende preparar un suelo o sustrato que permita, en una sola intervención, recuperar la vegetación de la zona sin que sea necesario volver a aplicar lodos u otros fertilizantes.

Asimismo, se aconseja tener en cuenta, pese a no ser directamente aplicable en la restauración de actividades extractivas, el Decreto 205/2000 de aprobación del programa de medidas agronómicas aplicables a las zonas vulnerables en relación con la contaminación por nitratos procedentes de fuentes agrarias, así como los decretos 283/1998, y 476/2004, ya que la lixiviación de nitratos constituye uno de

los principales riesgos de las aplicaciones de lodos en la restauración de actividades extractivas. Sin embargo, este riesgo suele ser muy limitado, si se tiene en cuenta la pequeña superficie afectada en cada restauración.

Desde el año 1988, miembros del Centro de Investigación Ecológica y Aplicaciones Forestales, en colaboración con otras entidades del ámbito universitario, han participado, junto con la Sección de Restauración de Actividades Extractivas, la Junta de Saneamiento y, más tarde, la Agencia Catalana del Agua, en distintos proyectos de investigación sobre aplicaciones de lodos en canteras, pruebas de revegetación, plantaciones experimentales y seguimientos de zonas restauradas, que han sido pioneros en este ámbito y que han permitido mejorar el conocimiento científico-técnico sobre la restauración de actividades extractivas. Fruto de estos trabajos, en el año 1996 se publicó el *Manual de restauració d'activitats extractives amb fangs de depuradora*, que reflejaba el estado de conocimientos del momento, basado en los resultados de parcelas experimentales y pruebas piloto realizadas entre 1992 y 1995.

En el año 2005 se actualiza el manual a partir de nuevos conocimientos técnicos adquiridos, incorporando una orientación más ecológica en relación con el conjunto del proceso de restauración, cálculo de la dosis de lodos y estableciendo un procedimiento administrativo validado por todas las instituciones implicadas.

2

OBJETIVOS GENERALES



OBJETIVOS GENERALES

Este trabajo ha sido parte de un programa multidisciplinario que lleva por título: “*Estudio de la aplicabilidad de los lodos de EDAR secados térmicamente en la rehabilitación de áreas degradadas por la minería de piedra caliza: comparación con la de lodos de EDAR compostados*”. En el proyecto coordinado por el C.R.E.A.F. (Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals, U.A.B.) han participado además la E.S.A.B. (Escola Superior d’Agricultura de Barcelona, U.P.C.), IQS Institut Químic de Sarrià (Universitat Ramon Llull) y el Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia (U.B.).

El proyecto fue subvencionado por el Ministerio Español de Medio Ambiente y la Agencia Catalana del Agua (ACA) Generalitat de Catalunya (Proyectos: **(Exp150/2004/3; Exp4.3-236/2005/2-B)**).

Este proyecto tenía por objetivo comprobar la aplicabilidad de los lodos de depuradora sometidos a secado térmico (LT) como enmiendas de los sustratos de restauración usados en los trabajos de restauración de áreas dedicadas a actividades extractivas de piedra caliza a cielo abierto. En estos trabajos se utilizaron como sustrato los residuos de extracción y de trituración generados en la explotación. Dado que los residuos de trituración, a diferencia de los de extracción, han sido muy poco utilizados hasta ahora en los procesos de restauración, este proyecto tenía el interés de dilucidar su idoneidad. El estudio de aplicabilidad incluyó la comprobación del cumplimiento de las limitaciones que forman parte de la directiva de la UE para lodos de EDAR (EU, 2000) en lo que respecta al control de su potencial contaminante. La eficiencia de los LT, como fuente de materia orgánica y de nutrientes para sustratos minerales, se comparó con la que proporcionaron los lodos de EDAR previamente sometidos a compostaje (LC).

Los objetivos de la presente tesis doctoral fueron:

- Cuantificar, mediante una prueba de campo, el efecto de la aplicación de lodos de EDAR a dos suelos residuales provenientes de explotación de calcárea, sobre la actividad respiratoria, la biomasa microbiana, el contenido de carbohidratos totales y extraíble, las

actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa y el N de aminoácidos durante el proceso de restauración de estos suelos.

- evaluar la influencia del tipo de lodo y tipo de suelo utilizado y sus efectos sobre los parámetros anteriormente mencionados

Estos objetivos generales se han desarrollado a través de los siguientes objetivos específicos secuenciales:

1. Estudiar el rango de valores de biomasa microbiana, carbohidratos totales, carbohidratos extraíbles, respiración basal y actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa en suelos naturales catalanes con el fin de utilizarlos como referentes en el control del proceso de restauración de los suelos degradados.
2. En la experiencia de restauración de residuos de cantera
 - 2.1 Cuantificar los cambios experimentados por los parámetros mencionados al cabo de un año del inicio del proceso de restauración de los suelos enmendados con lodos y compararlos con los cambios experimentados por los suelos control.
 - 2.2 Dilucidar si el tipo de lodo utilizado influye en el efecto de los lodos sobre los residuos de trituración y extracción
 - 2.3 Cuantificar el efecto del secado al aire y del secado al aire y rehumedecimiento sobre los parámetros estudiados en las muestras finales de los suelos restaurados y compararlo con este mismo efecto en los suelos naturales
 - 2.4 Evaluar la efectividad del proceso de restauración comparando los valores de los parámetros de los suelos restaurados con lo de los suelos naturales.
 - 2.5 Evaluar comparativamente los valores de los mismos parámetros en nuestra experiencia y en una experiencia previa de características similares

3

UTILIZACION DE SUELOS NATURALES POCO PERTURBADOS DE CATALUÑA COMO REFERENTES DE CALIDAD. ESTUDIO DE LOS SISTEMAS DE POST-TRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

3

Utilización de suelos naturales poco perturbados de Cataluña como referentes de calidad. Estudio de los sistemas de post-tratamiento y conservación de las muestras

3.1 Introducción

El interés en la evaluación de la calidad y la salud del suelo aumentó en la medida que se tomó conciencia que el suelo es un componente fundamental de la biosfera terrestre, que funciona no sólo en la producción de alimentos y fibra, sino también en el mantenimiento de los ecosistemas y de la calidad del medio ambiente local, regional y global (Glanz, 1995).

Debido a la falta de acuerdo sobre la definición de la calidad del suelo, no existe ningún consenso general sobre los suelos que deben ser considerados de máxima calidad y por lo tanto, que se pueden utilizar como suelos de referencia para comparar los suelos afectados por el uso (Gil-Sotres *et al.*, 2005). Los suelos de los ecosistemas naturales tienen propiedades físicas, químicas y bioquímicas específicas determinadas por las condiciones en las que se han desarrollado. La idea de usar suelos naturales estables fue sugerida por Fedoroff (1987) y está basado en el hecho de que los suelos que se desarrollan sin perturbaciones externas alcanzan un equilibrio entre sus propiedades (Gil-Sotres *et al.*, 2005). Por otro lado, también se supone que el uso del suelo alterará ese equilibrio, y que esta modificación se reflejará en el comportamiento de sus propiedades bioquímicas. Las tierras no perturbadas, tales como pastizales no cultivados y bosques, pueden actuar como sitios de referencia para su comparación con suelos sujetos a cambios provocados por las actividades humanas relacionadas con la silvicultura, la agricultura y la urbanización.

3.1.1 Antecedentes

Diversos autores han utilizado los suelos naturales como suelos de referencia para comparar los cambios en la calidad de diferentes suelos. Estos autores han demostrado que el máximo potencial y la capacidad de adaptación de estos suelos varían según las características medioambientales, y que por lo tanto el impacto de las actividades humanas en estos ecosistemas tiene repercusiones ecológicas diferentes (Miralles *et al.* 2007).

García y Hernández (1997), compararon el contenido de materia orgánica, respiración basal, C-biomasa microbiana y actividades enzimáticas de 21 suelos agrícolas abandonados de distintas zonas áridas mediterráneas del SE de España, sometidos a un alto grado de erosión, con los suelos naturales de

la misma zona (suelos inalterados con vegetación de matorral, principalmente de *Quercus rotundifolia*, y suelos que se sometieron a la reforestación con pino 50 años antes). El contenido de materia orgánica de estos suelos abandonados (valor medio 11,8 g kg⁻¹) fue aproximadamente un tercio del valor promedio del contenido de materia orgánica de los suelos naturales. La respiración basal y el C-biomasa también presentaron valores bajos y se correlacionaron positivamente con el contenido de materia orgánica. Los suelos degradados presentaron bajos valores de actividades deshidrogenasa y catalasa indicativos de una baja actividad biológica. Las hidrolasas estudiadas (ureasa, proteasa, β-glucosidasa y arilsulfatasa) se correlacionaron positivamente entre sí, y con el contenido de materia orgánica. Las actividades arilsulfatasa y β-glucosidasa fueron las hidrolasas más afectadas por procesos de erosión del suelo. García *et al.* (1997), no observaron correlación entre la actividad de deshidrogenasa de los suelos degradados con sus contenidos de materia orgánica, lo que indicaba que la materia orgánica total no era representativa de la actividad microbiana de los suelos degradados.

Siguiendo los estudios dentro de la provincia de Murcia, Pascual *et al.* (2000), estudiaron la rehabilitación de suelos de cultivo intensivo en el sudeste de la región mediterránea española, que habían sido abandonados (es decir, no se utilizaban en la agricultura) por diferentes periodos de tiempo. Estos suelos habían sufrido una disminución general del carbono orgánico, sustancias húmicas extraíbles, carbono soluble en agua, hidratos de carbono, biomasa microbiana y la respiración, con el tiempo transcurrido desde su abandono en comparación con los suelos adyacentes naturales que nunca se había utilizado para la agricultura. Además se observaron los menores valores de actividad deshidrogenasa en los suelos abandonados durante más tiempo.

En Galicia, el estudio de los suelos naturales se realizó para obtener parámetros de referencia para evaluar el aumento de calidad que adquirirían los suelos de minas desde el momento de su revegetación. Trasar-Cepeda *et al.* (1998), mostraron que en suelos nativos bajo vegetación clímax, y sin distorsión humana, el equilibrio bioquímico que es característico de un ecosistema estable maduro puede ser expresado matemáticamente como una relación entre varias propiedades microbiológicas y bioquímicas seleccionadas (biomasa microbiana, N mineralizado, fosfomonoesterasa, β-glucosidasa y Ureasa) y el contenido de N en el suelo.

Siguiendo con el estudio de los suelos naturales, Trasar-Cepeda *et al.* (2000b) y Leirós *et al.* (2000), estudiaron las propiedades bioquímicas de los horizontes O y Ah de 40 Umbrisoles nativos bajo vegetación clímax de robledal Atlántico, distribuidos por todo Galicia. Los autores observaron que los valores de las variables estudiadas estaban dentro de los rangos previamente publicados (Trasar-Cepeda *et al.* 1998), y encontraron una amplia variabilidad geográfica, puesta de manifiesto por los elevados valores de desviación estándar. Además, observaron una fuerte disminución de las propiedades bioquímicas con la profundidad. Las correlaciones entre los parámetros bioquímicos y variables químicas mostraron que en estos suelos el tamaño de la población microbiana y la actividad están directamente relacionadas con el contenido de materia orgánica y nutrientes disponibles. Posteriormente, Trasar-Cepeda *et al.* (2008a),

evaluaron el estado bioquímico de 45 suelos cultivados en Galicia, y observaron que el contenido de materia orgánica y los valores de las propiedades bioquímicas estudiadas (CM-celulasa, β -glucosidasa, invertasa, casein-proteasa, BAA-proteasa, ureasa, fosfomonoesterasa, fosfodiesterasa y arilsulfatasa) fueron mucho más bajos que los correspondientes a los suelos clímax (suelos naturales de la más alta calidad posible). Sin embargo, cuando las propiedades bioquímicas se expresaron por unidad de C orgánico, los valores de ambos tipos de suelos fueron muy similares, y para algunas propiedades los valores de los suelos cultivados fueron incluso más altos.

Los mismos autores (Trasar-Cepeda *et al.* 2008b) han comparado 194 suelos bajo diferentes usos (78 suelos reforestados, 56 suelos de pastos con fertilización orgánica a base de estiércol y 60 suelos agrícolas) con 40 suelos de la zona desarrollados bajo vegetación local potencial (suelos de calidad biológica en la región). Sus resultados mostraron que el uso del suelo no necesariamente disminuye las actividades enzimáticas estudiadas (CM-celulasa, β -glucosidasa, invertasa, casein-proteasa, BAA-proteasa, ureasa, fosfomonoesterasa, fosfodiesterasa y arilsulfatasa) y que dichos resultados dependían del tipo de enzima y el tipo de uso del suelo que se examinó. Los valores encontrados fueron inferiores, iguales o incluso superiores a los suelos naturales de referencia, en algunos casos dependiendo de la fertilización. Los valores de actividad enzimática por unidad de carbono fueron mayores en los suelos sujetos a la interferencia humana que en los suelos bajo vegetación clímax, lo que indicaba un enriquecimiento relativo de la actividad enzimática en suelos agrícolas y forestales.

Bastida *et al.* (2006), realizaron una caracterización microbiológica y bioquímica de suelo de diferentes toposecuencias en Murcia, incluyendo una amplia gama de densidades de cubierta vegetal en un intento de evaluar la idoneidad de los parámetros medidos (carbono orgánico total, carbono soluble en agua y carbohidratos solubles en agua, carbono de biomasa microbiana, respiración del suelo y actividades enzimáticas) para reflejar el estado de degradación de los suelos. Los valores de estos parámetros se hallaron estrechamente relacionados con el grado de cobertura vegetal; los suelos de bosque, con un alto valor de cobertura, mostraron los índices más altos. El estudio proporciona un índice de degradación de suelos basado en sus propiedades microbiológicas (MDI: Índice de degradación microbiológica) válido para su uso en climas semiáridos. Este índice es una función de la actividad deshidrogenasa, los carbohidratos solubles en agua, la actividad ureasa, el carbono soluble en agua y la respiración.

Zornoza *et al.* (2007), establecieron dos modelos que representan el equilibrio entre el carbono orgánico y algunas propiedades físicas, químicas y bioquímicas de los suelos forestales inalterados en condiciones semiáridas mediterráneas en Alicante (SE de España), basados en el uso de regresiones lineales múltiples. El Modelo 1, en el que explica el 92% de la variación en carbono orgánico del suelo (C), mostró que el C puede ser calculada por una combinación lineal de 6 propiedades físicas, químicas y bioquímicas: fosfatasa ácida, capacidad campo, conductividad eléctrica (CE), fósforo disponible (P), capacidad de intercambio catiónico (CIC) y estabilidad de los agregados. El Modelo 2 explica el 89% de

la variación en el C, que puede ser calculado por medio de 7 propiedades químicas y bioquímicas: actividades de ureasa, fosfatasa y β -glucosidasa, pH, CE, P y CIC. Posteriormente Zornoza *et al.* (2008) confirmaron en once suelos forestales no perturbados, la existencia de un equilibrio entre el carbono orgánico de los suelos de alta calidad y las propiedades físicas, químicas y bioquímicas anteriormente seleccionadas como indicadoras de la calidad del suelo (Zornoza *et al.* 2007). La perturbación debe ir acompañada de la pérdida de este equilibrio. Los suelos agrícolas y los suelos agrícolas abandonados han demostrado un desequilibrio entre el contenido de carbono orgánico y las propiedades físicas, químicas y bioquímicas. Además, los suelos de campos abandonados mostraban la menor desviación en el equilibrio natural, lo que indica una recuperación de la calidad del suelo.

En Italia, Masciandaro *et al.* (1998), estimaron los efectos del uso agronómico sobre las propiedades del suelo basadas en la actividad metabólica y la evolución de la materia orgánica. En comparación con los suelos nativos sin perturbar (suelos nativos mediterráneos de clima templado-húmedo del centro-oeste de Italia Central y de la zona semiárida del centro-oeste de España), los suelos agrícolas abandonados y los suelos intensamente cultivadas redujeron la concentración de materia orgánica del suelo, incluyendo el carbono orgánico total y el nitrógeno, el carbono húmico y los sustratos orgánicos fácilmente degradables, tales como carbono soluble en agua, compuestos antrona-reactivos y folin-reactivos. Ceccanti *et al.* (2008), midieron en cinco sitios seleccionados en el centro-oeste de Italia (Toscana) bajo clima Mediterráneo templado los parámetros convencionales (carbono orgánico total, nitrógeno total, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos) frecuentemente asociados con la calidad del suelo y los compararon con la actividad de β -glucosidasa asociada con el complejo de humus-enzima. La actividad del complejo humus- β -glucosidasa como actividad total del suelo o como porcentaje del contenido de C-húmico, demostró ser un parámetro discriminante de la calidad bioquímica de los suelos. La calidad de los suelos se distribuyeron en un orden decreciente de calidad: pradera sin perturbar > suelo reforestado con *Populus nigra* > viñedo de 60 años > suelos agrícolas > viñedo de 1 año.

3.1.2 El sistema de conservación y pre-tratamiento de los suelos antes de su determinación: el problema de la acumulación de muestras en un corto período de tiempo y la alternativa del secado al aire o del secado al aire y rehumedecimiento.

Los parámetros biológicos del suelo presentan la ventaja de ser sensibles a las agresiones externas sobre el suelo. Sin embargo, esta sensibilidad es también una posible desventaja debido a que el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y el análisis pueden cambiar el valor de los parámetros a analizar durante el almacenamiento. Las propiedades del suelo son susceptibles de cambiar bajo diferentes condiciones de almacenamiento y pre-tratamiento, ya que en la muestra recolectada se genera un nuevo ambiente al cambiar algunas condiciones (temperatura, oclusión de la materia orgánica, variación de la

humedad, etc.), y se crean nuevos límites a la densidad y actividad de los microorganismos (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000a). Los parámetros biológicos del suelo deberían ser analizados inmediatamente después del muestreo, pero esto raras veces es posible debido al número de ensayos que a menudo son realizados. El secado al aire facilita enormemente el manejo de las muestras de suelo y el empleo de este pre-tratamiento o el de secado al aire más rehumedecimiento facilitaría la adopción de parámetros biológicos como parte de un índice de calidad de suelo, pero las operaciones mencionadas, tal como hemos comentado, podrían influir sobre las propiedades biológicas. A pesar de las alteraciones provocadas por el pre-tratamiento, es importante que se mantenga la capacidad de discriminación entre los suelos y puedan ser seleccionados como indicadores de calidad del suelo. El pre-tratamiento de secado al aire representa una ventaja importante ya que las muestras secadas al aire son estables durante largos períodos.

Se han realizado pocos estudios sistemáticos para determinar el efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento sobre una gama de propiedades biológicas en distintos tipos de suelos mediterráneos bajo vegetación clímax, expondremos a continuación algunos resultados obtenidos por diversos autores.

El secado al aire provoca la muerte de los microorganismos sensibles o los induce a un estado de reposo o resistencia y produce además un cambio en la composición de la comunidad microbiana (Kieft *et al.*, 1987; Van Gestel *et al.*, 1993; Tate III, 2000, Wu y Brookes, 2005). Además de causar la lisis de los microorganismos y probablemente destruir las enzimas secretadas por las células vivas, acelera su adsorción a los coloides del suelo: los inmoviliza uniéndolos a la matriz del humus y este proceso completa la estabilización de las enzimas.

El C de la biomasa microbiana (CBM) determinado después del rehumedecimiento y antes de la estabilización del suelo mediante un periodo de incubación, puede que no represente precisamente a la biomasa en el momento del muestreo (Sparling *et al.*, 1986). Sin embargo, si la determinación del CBM se realiza en un suelo seco y rehumedecido e incubado de 3 a 10 días los valores obtenidos pueden ser equivalentes a los de las muestras a humedad de campo (Franzluebbers *et al.*, 2000).

En la determinación de la actividad enzimática, cuando se incuba una muestra a humedad de campo durante menos de cuatro horas, la actividad enzimática total podría provenir de la que aporta la biomasa microbiana existente, de las enzimas libres del suelo, de las enzimas asociadas a los restos celulares o células que no proliferan y a aquellas inmovilizadas en los coloides del suelo. Cuando en la determinación de la actividad enzimática se incuban muestras de suelo secas al aire, los dos primeros componentes mencionados podrían haberse destruido en su mayor parte (Bonmatí *et al.*, 2003).

Se han realizado diversos estudios sobre el efecto del secado al aire del suelo sobre la actividad enzimática.

Sparling *et al.*, (1986), estimaron la actividad de la fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa antes y después del secado al aire en muestras de suelo de pastizales de Nueva Zelanda y observaron una disminución en su actividad del 38% y 29% respectivamente. Bandick y Dick (1999), observaron que los ensayos de las actividades enzimáticas β -glucosidasa, amidasa, arilsulfatasa, y ureasa realizados en muestras secas al aire presentaban la misma distribución en los suelos ensayados que las muestras a humedad de campo. Trasar-Cepeda *et al.*, (2000a), ensayaron el efecto de diferentes condiciones de almacenamiento (refrigeración a 4° C, congelación a -20° C, secado al aire) durante un año sobre diversas propiedades bioquímicas de los suelos de Galicia, y el secado al aire fue el procedimiento que causó mayor alteración en las actividades de las enzimas BBA-proteasa, ureasa, invertasa y β -glucosidasa.

Hinojosa *et al.*, (2004), observaron que las actividades enzimáticas, con excepción de β -glucosidasa, fueron significativamente mayores en los suelos secos y rehumedecidos al 80% de retención de agua e incubados durante 7 días a 21 °C, respecto a los suelos a humedad de campo.

Wu y Brookes (2005), establecieron, en un suelo de pastizales permanentes del Reino Unido abonado con glucosa, cinco ciclos de secado al aire y rehumedecimiento al 50% de su capacidad de campo, cada uno seguido de 7 días de incubación a 25 °C. Comprobaron que durante los primeros días de incubación después del rehumedecimiento, la actividad microbiana aumentaba en comparación a la del suelo a humedad de campo, y causaba un aumento de la mineralización del carbono orgánico del suelo y otros nutrientes. En general, esta cantidad de C-CO₂ liberado disminuyó a medida que aumentaban el número de ciclos de secado al aire y rehumedecimiento. Los autores observaron que en el primer ciclo, la cantidad de C de la biomasa disminuyó en un 44% y el ATP microbiano en un 70%, mientras que las concentraciones de C extraíble casi se duplicaron. Sin embargo, luego del primer ciclo de secado al aire y rehumedecimiento, dichos parámetros se recuperaron rápidamente 1-3 días después del rehumedecimiento y el C-biomasa fue el 87% y el ATP el 78% de la concentración inicial medida antes del secado al aire.

Zornoza *et al.*, (2006 y 2007c), estudiaron, en suelos de regiones semiáridas y secas Mediterráneas en el SE de España el efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento sobre las actividades enzimáticas β -glucosidasa, fosfatasa ácida y ureasa, y sobre el CBM, la respiración basal (RB), el cociente metabólico (qCO₂) y el carbono soluble en agua. Observaron que la actividad de las enzimas estudiadas fue levemente afectada por el secado al aire. Sin embargo el rehumedecimiento de suelos secos al aire durante cortos períodos de incubación (4, 8 y 12 días a 23 °C), mostraba distintos patrones de comportamiento dependiendo de la enzima estudiada. Las actividades de la ureasa y β -glucosidasa fueron relativamente estables durante la incubación. Sin embargo la fosfatasa ácida mostró un aumento en su actividad con la incubación. Los valores de CBM y RB de muestras de suelo secas y rehumedecidas e incubadas por cortos períodos de tiempo (4, 8 y 12 días a 23 °C) fueron menores que los valores de las muestras a humedad de campo.

3. 2 Objetivos

Los objetivos en esta etapa de nuestro estudio fueron:

- Determinar una variedad de propiedades bioquímicas de los suelos con mínima perturbación antropogénica de Cataluña y discutir la relación entre sí y con los parámetros físico y químico de los suelos. Además describir las diferencias según el tipo de suelo y su ubicación.
- Evaluar el efecto del secado al aire y/o secado al aire y rehumedecimiento sobre el C de la biomasa Microbiana (CBM), respiración basal (RB), evolución del proceso de respiración (EPR), cociente metabólico (qCO_2) y actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa en estos suelos.
- Ensayar si el secado al aire o secado al aire y rehumedecimiento de las muestras de suelo es un pre-tratamiento apropiado cuando se usan las mencionadas propiedades para evaluar la calidad de los suelos estudiados.

3.3 Materiales y Métodos

La primera parte de la experiencia que corresponde a este capítulo forma parte de una de las actividades de investigación de Grupo Español de Enzimología de Suelos (GEES). Este proyecto tiene por objetivo constituir una base de datos sobre parámetros bioquímicos de suelos naturales de diferentes regiones de la Península Ibérica.

3.3.1 Área de estudio

Los suelos analizados corresponden a diez localidades de Cataluña: Serra Litoral (LT) coordenadas UTM (huso 31 T) $x=438318$ $y=4595988$ $z=200$ m (s.n.m.), Serra del Corredor (CR) ($x=468852$ $y=4613285$ $z=600$ m), Serra del Montnegre (MN) ($x=469095$ $y=4614800$ $z=400$ m), Plana de Vic (VC) ($x=441966$ $y=4447214$ $z=460$ m), Serra de l'Ordal (OR) ($x=402038$ $y=4582681$ $z=385$ m), Conca d'Odena, Igualada (IG) ($x=388992$ $y=4603432$ $z=321$ m), La Panadella (PN) ($x=367168$ $y=4606839$ $z=773$ m), Serres dels Camps, Balaguer (BL) ($x=321063$ $y=4629917$ $z=259$ m), Serra de la Picarda, La Granja d'Escarp (LG) ($x=279887$ $y=4588362$ $z=177$ m) y Segre (SG) ($x=281854$ $y=4590988$ $z=90$ m).

Las localidades fueron seleccionadas con el objetivo de abarcar la variabilidad litológica, climática y de vegetación del territorio. Nos centramos en suelos nativos bajo vegetación natural y autóctona, o lo más cercano posible de la vegetación potencial (Rivas-Martínez, 1987), que no habían sido recientemente alterados por la acción humana en un indeterminado número de décadas. Tuvimos en cuenta en la selección de los sitios que la proporción entre suelos carbonatados y no carbonatados reflejara las condiciones reales de la cobertura edáfica. La distribución geográfica de las localidades escogidas se muestra en la Figura 3.1. En la Tabla 3.1 y la Tabla 3.2 se presentan las características de los suelos.

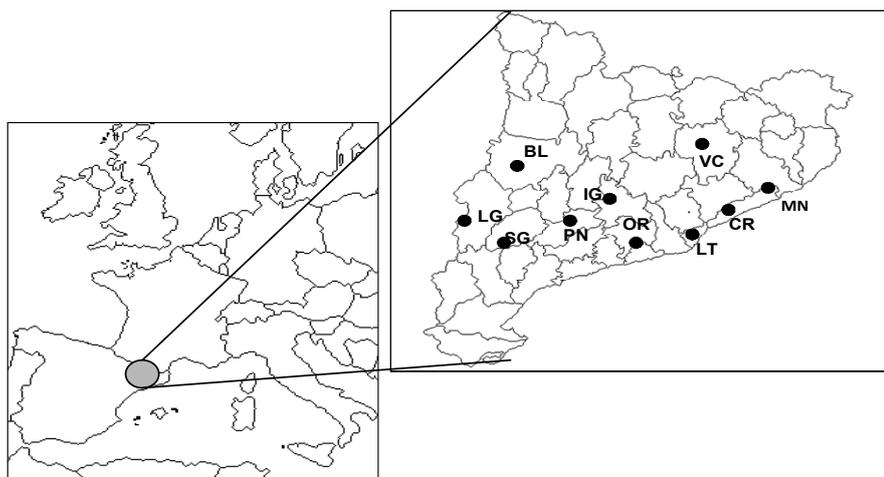


Figura 3.1. Distribución geográfica de las localidades de muestreo

Tabla 3.1 Sitios y características de los suelos estudiados

Localización	Simbolos	Roca madre	Tipo suelo [‡]	Tipo Habitat	Uso del suelo	T* °C (2006)	P** mm (2006)	Clima
Litoral	LT	Granodiorita	Cambisol	MF Qi	Forestal	15.5	504	
Corredor	CR	Pizarras	Ranker	MF Qs	Forestal	13.5	461	Mediterráneo Litoral (sub-tipo central)
Montnegre	MN	Granodiorita	Ranker	MF Qs	Forestal	13.5	461	
Vic	VC	Margas	Cambisol	AG	Prado	12.3	564	Mediterráneo Continental (sub-tipo húmedo)
Ordal	OR	Calcáreo	Luvisol	MF Pf	Forestal	15.3	404	Mediterráneo Litoral (sub-tipo sur)
Igalada	IG	Margas	Cambisol	DG	Agrícola abandonado	12.9	311	
Panadella	PN	Calcáreo	Xerosol	MF Qi	Forestal	12.9	311	
Balaguer	BL	Yeso	Xerosol	RGa	Prado	14.9	237	Mediterráneo Continental (sub-tipo seco)
La Granja	LG	Margas	Cambisol	DG	Estepa	15.6	137	
Segre	SG	Depósito aluvial	Fluvisol	RP	Forestal	15.6	137	

‡FAO – Unesco, 1974. *Temperatura promedio del aire; ** precipitación

MF: Bosque Mediterráneo; Qi: Encinares de tierra baja; Qs: Alcornocal; AG: Prados de junquillo falso (prados submediterráneos); Pf: Pinares de pino blanco; DG: Prados basófilos secos de tierras bajas/montaña media; RGa: Matorrales dominados por romero; RP: Albaredas y otros bosque de ribera mediterránea.

3.3.1.1. Clima

La variedad geográfica de Cataluña ocasiona grandes contrastes climáticos y meteorológicos (Figura 3.2). La gama de altitudes cubre más de 3.000 metros, lo cual produce unos pisos climáticos, en especial térmicos, que generan temperaturas medias anuales que van desde los 17 °C a los 0 °C. La manifestación de estos contrastes se puede apreciar en el mapa de precipitación media anual, donde los totales pluviométricos oscilan entre los más de 1.200 mm en determinados puntos de los Pirineos y los menos de 400 mm a poniente de la Depresión Central.

Desde un punto de vista climático, en Cataluña se distinguen dos grandes zonas: la zona húmeda y la seca.

- La zona húmeda (Pirineo, Pre-pirineo y ámbitos más altos de la Depresión Central y del Sistema Litoral) se caracteriza por precipitaciones superiores a los 600 mm anuales, veranos frescos e inviernos fríos (15 °C de oscilación térmica en Olot y 955 mm de precipitación anual). Éste clima corresponde al clima mediterráneo de alta montaña.

- La segunda zona (costa y núcleo interior de la Depresión Central Catalana) se caracteriza por un clima seco (precipitaciones inferiores a los 600 mm). En ella cabe distinguir la tendencia continentalizadora en el interior, con oscilación térmica acusada (20 °C de oscilación térmica y 351 mm de precipitación en Lleida), de la propiamente mediterránea de la costa (veranos largos y secos, inviernos muy suaves, máximo de precipitaciones en otoño).

Las precipitaciones medias anuales en la zona litoral están entre los 700 mm (Baix Empordà) y los 480 mm (Tarragona). La irregularidad de las lluvias es la típica del clima mediterráneo. En el clima mediterráneo continental la variación de las temperaturas a lo largo del año es mayor que en la costa. De acuerdo con estas características climáticas los suelos estudiados pueden agruparse de la siguiente manera: Mediterráneo litoral, suelos LT, CR y MN; Mediterráneo continental (sub-tipo húmedo), suelo de VC; Mediterráneo Litoral (sub-tipo sur), suelo OR; y Mediterráneo Continental (sub-tipo seco), los suelos IG, PN, BL, LG y SG (Tabla 3.1).



Figura 3.2. División climática de Cataluña (Martín-Vide, J., 1992)

3.3.1.2 Litología y vegetación

En los suelos del área mediterránea, sometidos a clima semiárido, el sustrato litológico más característico de esta zona son las rocas carbonatadas, los sedimentos cuaternarios y las formaciones de margas, las cuales dan lugar a suelos muy fácilmente erosionables, y que pueden estar sometidos a procesos de degradación biológica, física y/o salinización.

Los sitios presentan variaciones en la vegetación natural. Los suelos desarrollados sobre material no calcáreo (MN y CR) presentan una vegetación de bosque mediterráneo. La especie dominante es la encina (*Quercus ilex rotundifolia*) y el alcornoque (*Quercus suber*). En los suelos LT y PN la vegetación está compuesta por encinas (*Quercus ilex*), en cambio en MN y CR el bosque esclerófilo está formado mayoritariamente por alcornoques (*Quercus suber*), con mayor exigencia en cuanto a profundidad del suelo y humedad. En cambio el suelo OR presenta bosques de coníferas y sus especies más características son el pino piñonero (*Pinus pinea*), el carrasco (*Pinus halepensis*) y el laricio o salgareño (*Pinus nigra*). En el suelo de VC, encontramos prados de junquillos (*Aphyllanthes monspeliensis*), comunidades vegetales en las que predominan las hierbas perennes con abundancia de gramíneas. En los suelos IG y LG la vegetación es un prado basófilo seco de tierra baja o media con pastizales propios de superficies pedregosas. En el suelo LG, la vegetación de la estepa es del tipo xerófilo, que se caracteriza por su adaptación a la escasez de agua: aunque los tallos se sequen la planta se mantiene con vida debajo de la

tierra; las escasas precipitaciones no permiten el desarrollo de pastos; predomina la vegetación herbácea con arbustos aislados. En el suelo BL, la vegetación es un matorral mediterráneo de romero (*Rosmarinus officinalis*), acompañada por arbustos de tamaño similar. En el suelo SG predomina el bosque mediterráneo de ribera, las especies más representativas son el aliso (*Alnus glutinosa*), el fresno (*Fraxinus excelsior*) y el chopo (*Populus nigra*). Estos bosques tienen mucha importancia en la regulación de la escorrentía, en la prevención de inundaciones y como protectores frente a la erosión.

3.3.2. Características físico-química de los suelos

Las principales características físicas y químicas (conductividad eléctrica, pH, carbonatos totales, N y C) fueron realizadas por diferentes centros que constituyen el Grupo Español de Enzimología del Suelo (GEES). La conductividad eléctrica fue medida en extracto acuoso 1:5 y el pH real en una suspensión 1:2,5 en agua. El contenido de **carbonatos totales** fue determinado en analizador Shimadzu TOC-V-Series SSM 5000A (acidificación con H₃PO₄ y tratamiento térmico a 200 °C) y el **N orgánico** se determinó mediante el método de Kjeldhal (Stevenson, 1982). El **carbono orgánico del suelo** se determinó por oxidación con dicromato de potasio procedimiento Walkley-Black considerando el factor de transformación del C oxidable en C orgánico de 1,29 (Nelson y Sommers, 1982).

3.3.3 Muestreo

Se definió una parcela de 100 m² en cada sitio y la muestra fue compuesta de 20-25 sub-muestras homogéneamente mezcladas del horizonte A (0-10 cm) luego de la eliminación de la hojarasca. Se tomaron muestras en dos días consecutivos en la primavera de 2006. Una parte de las muestras fue inmediatamente tamizada (<2 mm), homogeneizada y almacenada a 4°C antes de realizar las determinaciones de C-biomasa microbiana, respiración y actividades enzimáticas (dentro de los 15 días siguientes a la toma de muestras). Para la determinación del resto de parámetros las muestras fueron secadas al aire durante una semana, tamizadas (<2 mm) y almacenadas a temperatura ambiente hasta el momento de realizar los análisis. Para los ensayos analíticos, se utilizó el valor medio de tres o cuatro repeticiones por muestra y los datos se expresaron sobre la base de suelo seco.

3.3.4 Metodología analítica

La **humedad de las muestras** se determinó gravimétricamente (secado a estufa 105°C, 24 h), excepto la muestra de suelo Balaguer en la que por su contenido en yeso el secado se realizó a 60°C hasta peso constante.

El análisis de *textura* se determinó con hidrómetro de Bouyoucos (Gee y Bauder, 1986). La proporción de cada fracción textural se determinó mediante el análisis granulométrico, previa separación de la fracción superior a 2 mm y la eliminación de la materia orgánica con H_2O_2 (en el caso de los suelos con bajo contenido de materia orgánica y utilizando el método densimétrico este paso no fue imprescindible). La dispersión de los agregados se realizó colocando 50 g de tierra fina en una ampolla de agitación y se agregaron 40 ml de dispersante (hexametáfosfato sódico más bicarbonato sódico) y 250 ml de agua destilada. Las ampollas fueron agitadas en agitador durante 8 h. Luego de la dispersión, la suspensión se pasó íntegramente a una probeta de un litro y se completó con agua destilada previa separación de las partículas más gruesas de 0,05 mm por tamizado; las partículas inferiores se determinaron por el método de sedimentación basado en la ley de Stokes. Las lecturas con el densímetro se realizaron a los 40 segundos (están en suspensión las partículas inferiores a 50 micras) y a los 120 minutos (sólo están en suspensión las partículas menores a 2 micras). Se corrige cada lectura restándole un blanco (agua y dispersante en la misma concentración que las muestras). Los porcentajes de cada fracción se expresaron en $g\ Kg^{-1}$ de muestra seca. La clase textural se determinó mediante el triángulo de texturas (USDA).

La determinación de *carbohidratos totales (CHT)* se realizó de acuerdo a Cheshire y Mundi (1966), se usaron 2 g de muestra para cada uno de los tratamientos en frascos de 150 ml de capacidad y se agregó 7,5 ml de H_2SO_4 4 M, se dejó reposar 16 h para la solubilización de carbohidratos. Luego se diluyó hasta 0,5 M de H_2SO_4 añadiendo 52,5 ml de agua destilada y se calentó a $100^\circ C$ durante 5 h para que los polímeros de los carbohidratos solubilizados pudieran ser hidrolizados a sus respectivos monosacáridos. Se filtró y se neutralizó a pH 7 añadiendo NaOH 2 M. La cuantificación de los carbohidratos en los extractos se basa en la determinación colorimétrica del complejo entre los azúcares y el reactivo antrona (9, 10-dihidro-9-oxoantraceno). La reacción es positiva para pentosas, metilpentosas y hexosas. La reacción de la antrona en medio sulfúrico produce un derivado del furano que tiene su máximo de absorción entre 520-630 nm.

La determinación de carbohidratos extraíbles (CHE) se realizó de acuerdo a Badalucco *et al.* (1992). Se usaron 5 g de muestra para cada uno de los tratamientos en frascos de 50 ml de capacidad, se agregaron 20 ml de K_2SO_4 0,5 M y se agitó durante una hora. Las muestras fueron filtradas y cuantificadas mediante la reacción de antrona.

El C-biomasa microbiana (CBM) se determinó usando el método de fumigación-extracción (Vance *et al.*, 1987) en muestras que habían sido pre-incubadas 7 días en oscuridad a $28^\circ C$ después de ser ajustadas al 60% de capacidad de campo (CC). Del peso total de la muestra, la mitad (25 g de suelo seco) se fumigó con $CHCl_3$ durante 24 h a una temperatura de $25^\circ C$, la otra mitad (25 g restantes) se dejó sin fumigar. Después de extraer el vapor de $CHCl_3$, el C fue extraído desde las muestras fumigadas y no fumigadas con K_2SO_4 0,5M durante 30 minutos en agitador (relación suelo: extractante 1:4). El C en los extractos filtrados fue determinado por el método de oxidación con dicromato y medio ácido. La

diferencia entre el C extractado en las muestras fumigadas ($C_{e \text{ (fum)}}$) y en las no fumigadas ($C_{e \text{ (no fum)}}$) fue convertido en C de la biomasa microbiana usando la fórmula:

$$\mu\text{g C Biomasa g}^{-1} \text{ suelo seco} = 2.64 * 1.12 * (C_{e \text{ (fum)}} \mu\text{g C g}^{-1}) - C_{e \text{ (no fum)}} \mu\text{g C g}^{-1}$$

Se ha comprobado experimentalmente que: i) el incremento de materia orgánica que se consigue extraer es 2,64 veces más pequeño que la biomasa realmente existente en el suelo, ii) el C orgánico total que contiene una muestra es 1,12 veces más elevado que el que se determina por oxidación calentando a 150°C con la mezcla dicromato/sulfúrico (Vance *et al.*, 1987).

El carbono orgánico extraíble (COE), una medida de la materia orgánica disponible fácilmente en el suelo (Joergensen y Brookes, 1990), se obtuvo por extracción con 0,5 M K_2SO_4 en la proporción de 1:4 (peso / v) y fue determinado en analizador TOC SHIMADZU V-CSN.

La evolución del proceso de respiración (EPR) y la respiración basal (RB) se determinaron según el método descrito por Hernández y García (2003). Se utilizaron 100 g de suelo, previamente ajustado al 60% capacidad de campo (CC) e incubado 7 días en oscuridad a 28°C, en frascos herméticos de 1 L de capacidad que contenían un vial con 10 mL de NaOH 0,5 N para absorber el CO_2 liberado. Las trampas de NaOH fueron renovadas diariamente y el CO_2 -C liberado fue cuantificado por titulación del NaOH con HCl 0,5 N después de precipitar el carbonato de bario formado por la adición de una solución acuosa de $BaCl_2$ a la solución de NaOH, utilizando fenofaleína como indicador. El valor del CO_2 contenido en el frasco sin suelo (controles) fue sustraído del valor de CO_2 liberado desde la muestra de suelo. La **respiración basal (RB)** fue determinada calculando el CO_2 liberado entre el 6° y 7° día de incubación en el método de EPR.

A partir de estos parámetros se ha calculado: El cociente metabólico y la relación entre el carbono microbiano y el carbono orgánico.

El cociente metabólico (qCO_2) definido como la relación entre la respiración y la biomasa microbiana, propuesto por Anderson y Domsch, (1985) como un buen indicador de la fracción metabólicamente activa de los microorganismos del suelo. El qCO_2 fue calculado dividiendo el CO_2 -C liberado desde la muestra en una hora por el contenido de C-Biomasa.

La relación entre el carbono microbiano y el carbono orgánico (C-mic/C-org) nos indica que parte del carbono orgánico corresponde al C que forma parte de la biomasa microbiana.

Las actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa fueron determinadas de acuerdo a Tabatabai (1982) y Eivazi y Tabatabai (1988) con las siguientes modificaciones: i) no se utilizó tolueno debido al corto tiempo de incubación (1 hora). Según Burns (1982) la incubación de una suspensión de suelo con el sustrato durante menos de cuatro horas, elimina la actividad debido al crecimiento microbiano. ii) De acuerdo a Vourinen (1993), los suelos tienen capacidad de adsorber p-nitrofenol, que es el producto de la reacción enzimática. Esto implica que la lectura colorimétrica que se hace al final de ensayo enzimático corresponde no a la totalidad del p-nitrofenol producido sino al total menos el adsorbido. Se realizaron curvas de calibración del p-nitrofenol en las que se incluyó el suelo en la solución estándar para tener en cuenta la adsorción relativa del p-nitrofenol por cada uno de los suelos. iii) Ajustes de pH de la suspensión: es conveniente asegurarse que la suspensión suelo-tampón-sustrato mantiene el pH del tampón añadido. Según las experiencias descritas por Trasar-Cepeda *et al.* (1985) en suelos ricos en materia orgánica, con fuerte poder amortiguador, la disolución tampón utilizada no consigue llevar el sistema al pH al cual debe realizarse la reacción enzimática. En estos casos es conveniente realizar un ensayo previo para comprobar si la muestra de suelo mantiene o desplaza el pH del tampón. En caso de que haya desplazamiento del valor de pH se incorpora una pequeña modificación al procedimiento general y que incluye un ajuste de pH. El grado de ajuste se deduce a partir de la elaboración de una curva de neutralización de la muestra de suelo. La curva de neutralización tiene por objeto determinar el volumen de HCl 0,5 M que se ha de añadir a la suspensión suelo-tampón-sustrato para conseguir el pH de 6 al cual se realiza la reacción enzimática, utilizando en este caso tampón MUB-HCl. La curva de neutralización se realiza para cada muestra de suelo analizar.

Las actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa fueron determinadas como la cantidad de p-nitrofenol (pNP) liberada de 1,5 g de suelo después de la incubación a 37° C durante 1 h con el sustrato p-nitrofenil- β -glucopiranosido o p-nitrofenil- β -galactopiranosido en tampón MUB (pH 6). La reacción se detuvo por enfriamiento a 2° C durante 15 minutos y añadiendo a continuación 1 ml de 2 CaCl₂ M y 4 ml de 0,1 M THAM-NaOH 0,1 M de pH 12, la mezcla se agitó y filtro. El p-nitrofenol liberado se determinó por espectrofotometría a 400 nm. Los controles fueron realizados en la misma forma, pero el sustrato fue añadido antes que el CaCl₂ y el THAM (Tabatabai, 1982). Los resultados se expresan sobre la base de suelo seco a 105°C.

3.3.5 Pre-tratamiento de las muestras

Pretratamiento 1) suelo seco al aire

Para ensayar el efecto del secado al aire sobre carbono de la biomasa microbiana (CBM), respiración basal (RB), evolución del proceso de respiración (EPR) y actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa, los valores de esos parámetros se determinaron después de secar al aire, durante una semana a temperatura ambiente, las muestras de suelos a humedad de campo y los resultados fueron comparados

con los valores obtenidos en las muestras a humedad de campo. Deberíamos enfatizar que, como se especificará en la próxima sub-sección, las determinaciones CBM, RB y EPR sobre muestras a humedad de campo y sobre muestras secas al aire fueron realizadas luego de ajustar la humedad del suelo al 60% de su capacidad de campo (CC) e incubarlas durante 7 d en la oscuridad a 28°C.

Pretratamiento 2) secado al aire y rehumedecimiento

Para ensayar el efecto del secado al aire y rehumedecimiento sobre las actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa, las muestras de suelo secas al aire fueron rehumedecidas al 60% CC e incubadas durante 7 días en oscuridad a 28 °C. Los valores obtenidos fueron comparados con aquellos obtenidos en las muestras a humedad de campo.

3.3.6 Análisis estadísticos

El análisis de ANOVA unidireccional se llevó a cabo con todas las propiedades para evaluar las diferencias entre los suelos. La comparación de medias se realizó según procedimiento SNK (Student-Newman-Keuls a nivel de $\alpha=0,05$). Los datos fueron analizados usando el software del sistema de análisis estadístico y el procedimiento GLM fue realizada mediante las pruebas de la varianza (SAS, 1990). Se calcularon los coeficientes de correlación entre las medias de los diferentes parámetros bioquímicos. En el estudio de correlación, la muestra PN fue omitida debido a que sus valores extremos desvirtuaban el análisis de los resultados. Los valores normalizados de las variables fueron trazados en un diagrama estrella con diez ejes que representan los diez suelos.

Además se realizó un análisis de ANOVA para considerar la influencia de dos factores fijos (pre-tratamiento y tipo de suelo) sobre los parámetros estudiados. La comparación de medias se realizó según procedimiento SNK (a nivel de $\alpha=0,05$). Teniendo en cuenta el procedimiento propuesto por Zornoza *et al.* (2006) evaluamos la pendiente obtenida de regresiones lineales simples entre los valores de las actividades enzimáticas y biomasa microbiana de las muestras de suelo a humedad de campo y las muestras de suelos secos al aire o suelos secos al aire y rehumedecidos. Nuestro objetivo fue cuantificar su desviación de la relación 1:1 y averiguar cuál era el pre-tratamiento que presentaba menos cambios respecto a los valores iniciales de suelo a humedad de campo.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Caracterización físico- química de los suelos

Los valores de las características físico- química de los suelos que se presentan en la Tabla 3.2 muestran que en general, la mayoría de los suelos analizados se caracterizan por pH básicos, excepto los suelos CR, MN y LT. En lugares donde la precipitación es intensa, se produce un lavado de bases en el suelo y el suelo tiende a la acidez. En las zonas áridas, no se produce el lavado de bases y por lo tanto los suelos tienden a la alcalinidad (Douchafour, 1982).

La conductividad eléctrica fue alta en las muestras de los suelos BL (suelo de yeso), y LG. La salinidad de los suelos además de afectar el crecimiento de algunas plantas, puede ejercer un proceso adverso sobre la biota y sobre los procesos biológicos esenciales que mantienen la calidad de un suelo (Pankhurst et al., 2001). Sin embargo, la actividad microbiana no solo puede estar afectada por la concentración de sales sino por el tipo de sales dominantes en los suelos. En el caso del suelo BL la conductividad eléctrica es debida a la presencia de yeso (sulfato de calcio di-hidratado); esta sal por su baja solubilidad, no es perjudicial para la microbiota ni para las plantas. Sindhu y Cornfield (1967), atribuyeron la baja toxicidad de los sulfatos, en relación a los cloruros, a una mejor utilización de este anión en las células microbianas para la síntesis de aminoácidos, vitaminas, sulfolípidos y otros aminoácidos esenciales, mientras que las sales de cloro probablemente no son incorporadas en rutas metabólicas y se acumulan a niveles tóxicos. El suelo LG proviene de una roca madre compuesta principalmente de carbonato cálcico y minerales arcillosos, a veces con algo de yeso e incluso otros tipos de sales.

Tabla 3.2 Características físico-químicas de los suelos seleccionados para estudio

Suelo	Clase Textural (USDA)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	pH H ₂ O (1:2,5)	CE (1:5)	CaCO ₃ (%)	N Total (%)	C Orgánico (%)	C/N	Humedad campo %
LT	AF	85,8	5,7	8,5	6,95	0,064	-	0,16	3,07	19,2	3,1
CR	F	37,7	38,9	23,3	6,45	0,129	-	0,37	6,20	16,8	8,2
MN	FA	63,9	21,7	14,4	6,45	0,092	-	0,54	7,23	13,4	6,0
VC	F	48,5	28,1	23,4	8,50	0,163	37	0,32	4,15	13,0	6,2
OR	aF	3,7	34,0	62,3	8,00	0,191	-	0,35	7,81	22,3	8,6
IG	Fa	28,6	33,6	37,8	8,50	0,159	64	0,17	2,31	13,6	2,5
PN	FaA	45,2	19,9	34,9	7,80	0,243	-	0,94	10,74	11,4	16,2
BL	FA	60,1	33,2	6,6	8,15	2,000	12	0,11	1,21	11,0	0,7
LG	Fa	36,4	29,9	33,7	8,40	1,377	35	0,08	0,85	10,6	1,4
SG	FA	72,2	15,5	12,4	8,65	0,121	33	0,11	1,82	16,5	1,0

A: arena; F: franco; a:arcilla; CE: conductividad eléctrica a 25 °C en dS m⁻¹

Los valores de C variaron entre 0,85 y 10,7%, los de N entre 0,08 y 0,94% y la relación C/N entre 10,6 y 22,3. Existió correlación positiva (datos no expuestos) entre precipitación y C ($r = 0,7539$; $P < 0,05$); precipitación y N ($r = 0,8299$; $P < 0,01$).

En los ecosistemas naturales, el clima es el factor más importante que regula el contenido de C de los suelos (Álvarez y Lavado, 1998), ya que determina el tipo de vegetación y la cantidad y la calidad de la materia orgánica que se incorpora en el suelo. Altas precipitaciones puede mejorar la productividad neta del ecosistema (Vallejo et al., 2005) y las bajas temperaturas pueden ralentizar la descomposición de la materia orgánica de suelo lo que provoca su acumulación con el tiempo. Insam et al. (1989) y Álvarez y Lavado (1998), encontraron correlaciones significativas entre C y los factores climáticos, y observaron que C aumentaba con el aumento de las precipitaciones o la disminución de la temperatura.

Los suelos BL y LG con yeso o suelos salinos y y el suelo SG, un fluvisol expuesto a inundaciones anuales, presentan los menores valores de C y N orgánico. Los bajos contenidos de materia orgánica en estos suelos podría ser consecuencia de las bajas precipitaciones que se producen en dichas zonas (Tabla 3.1); la aridez o deficiencia en el aprovisionamiento del agua para la vida vegetal y animal reduce la normal provisión de materia orgánica. La disponibilidad y el flujo de agua regulan la velocidad de desarrollo de la mayoría de los procesos edáficos. Se debe recordar que el nivel de materia orgánica, en cualquier suelo, está influenciado tanto por la temperatura como por la humedad y también por otros factores. Donde la temperatura media anual es alta y la precipitación es baja, es donde se encuentran los niveles naturales más bajos de materia orgánica y las mayores dificultades para mantenerlos.

Los suelos VC, IG y LG desarrollados sobre margas, bajo diferentes regímenes de precipitación, presentan diferencias significativas en sus contenidos de C.

Los suelos OR y PN se desarrollan sobre material calcáreo. Analizando la relación C/N (relación que determina el grado de mineralización de la materia orgánica que existe en el suelo), en el caso del suelo PN podemos observar un elevado contenido de C orgánico (10,7%) y una baja relación C/N (11,4). En contraposición, el suelo OR, tiene un contenido de C orgánico alto (7,8%) y una alta relación C/N (22). Estas diferencias podrían ser atribuidas a la calidad de los restos orgánicos aportados por la vegetación. En el caso del suelo OR el menor grado de mineralización estaría dado porque la vegetación de pinos (*Pinus halepensis*) aporta materia orgánica que contiene compuestos hidrofóbicos e inhibidores químicos, que provoca la ausencia de edafofauna necesaria para la descomposición (Virzo de Santo et al., 1993).

Los suelos desarrollados sobre material no calcáreo (MN y CR) con valores de pH inferiores a 6,5 y (LT) con pH 6,9 presentan una vegetación de bosque mediterráneo. En el suelo LT la vegetación está compuesta por encinas (*Quercus ilex*), en cambio en MN y CR el bosque esclerófilo está formado mayoritariamente por alcornoques (*Quercus suber*), con mayor exigencia en cuanto a profundidad del

suelo y humedad y presentan prácticamente el doble de C y valores inferiores en la relación C/N que el suelo LT, tal como hemos comentado en la descripción.

3.4.2 Caracterización microbiológica y bioquímica de los suelos

Los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los parámetros bioquímicos se presentan en la Tabla 3.3

Tabla 3.3 Parámetros biológicos generales y valores de C (valores medios, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) en los suelos seleccionados

Parámetros	Media	DS	CV
β-galactosidasa	0,35	±0,34	97%
Carbohidratos extraíbles	0,44	±0,42	95%
Carbohidratos totales	7,31	±6,79	93%
Carbono orgánico	4,54	±3,31	73%
C Biomasa Microbiana	813	±569,1	70%
β-glucosidasa	1,71	±1,06	62%
Respiración (acumulada durante 7 días)	1,52	±17,92	49%

*Unidades: C orgánico en %, Carbohidratos Extraíbles y Totales en mg glucosa g⁻¹ suelo seco, C-Biomasa en mg kg⁻¹ suelo seco, Respiración en mg C-CO₂ kg⁻¹ suelo seco h⁻¹ y β-D-glucosidasa y β-D-galactosidasa en μmol pNP g⁻¹ suelo seco h⁻¹

Los carbohidratos totales (CHT), los carbohidratos extraíbles (CHE) y la actividad β-galactosidasa (GAL), presentaron coeficientes de variación superiores al 90%, CBM y la actividad β-glucosidasa (GLU) entre el 60% y 70%, mientras que la respiración basal (RB) fue el parámetro con menor CV (49%) (Tabla 3.3).

El intervalo de valores de las variables estudiadas fue similar a los citados por Bastida *et al.*, (2006), Zornoza *et al.*, (2007) y Miralles *et al.*, (2007) en suelos nativos bajo condiciones mediterráneas de Murcia, Alicante y Almería respectivamente. Dentro de todo el conjunto de propiedades biológicas, destacan los valores bajos de la respiración del suelo comparados con los obtenidos por García *et al.* (1997), quienes determinaron valores medios de 3,38 mg C-CO₂ kg⁻¹ suelo seco h⁻¹ en suelos no alterados dominados por vegetación de *Quercus rotundifolia* en la región del sureste español mediterráneo. La baja tasa de respiración encontrada en los suelos estudiados podrían estar relacionadas con la baja capacidad de la materia orgánica para ser mineralizada; García *et al.* (1994), muestran este hecho como la causa principal de la baja actividad microbiológica de los suelos de regiones áridas.

Los valores medios de los parámetros bioquímicos de cada suelo se muestran en la Tabla 3.4

Tabla 3.4 Resultados de ANOVA de un-factor (localización de suelo) para los parámetros estudiados en los suelos seleccionados.

Parámetros‡	Valor F	LT	CR	MN	VC	OR	IG	PN	BL	LG	SG
C	3835***	3,07f	6,20d	7,3c	4,15e	7,81b	2,31g	10,74a	1,21i	0,85j	1,82h
COE	211***	283,4e	517,7c	871,4b	519,7c	423,6cd	432,9cd	1423,1a	250,6ef	188,8f	360,7d
CHE	2685***	0,22f	0,57c	0,69b	0,25e	0,48d	0,27e	1,50a	0,17g	0,11h	0,16g
CHT	1688***	4,13e	8,60c	11,87b	5,19d	11,64b	3,33f	23,00a	1,81h	0,99i	2,51g
GLU	717***	1,34f	2,37c	2,84b	1,89d	1,73e	1,15g	3,83a	0,53h	0,39i	1,06g
GAL	473***	0,33d	0,89b	0,98a	0,24e	0,16f	0,16f	0,56c	0,05g	0,03g	0,12f
CBM	78***	439e	946c	1344b	802cd	592de	741cd	2170a	415e	338e	343e
RB	136***	0,25e	0,67a	0,56b	0,33d	0,31d	0,59b	0,61b	0,28de	0,15f	0,40c

‡Unidades: C Orgánico (C) en %, Carbono orgánico extraíble (COE) en mg kg⁻¹, Carbohidratos Extraíbles (CHE) y Totales (CHT) en mg glucosa g⁻¹ suelo seco, β-glucosidasa (GLU) en μmol pNP g⁻¹ suelo seco h⁻¹, β-galactosidasa (GAL) en μmol pNP g⁻¹ suelo seco h⁻¹, C-Biomasa (CBM) en mg kg⁻¹ suelo seco y Respiración Basal (RB) en mg C-CO₂ kg⁻¹ suelo seco h⁻¹. *** Significativa en p<0.001. Medias dentro de una fila, seguido por la misma letra no son significativamente diferentes p = 0.05 SNK.

Mediante el análisis de ANOVA (Tabla 3.4) podemos observar que los parámetros biológicos y bioquímicos estudiados fueron significativamente influenciados por la localización de los suelos. Si comparamos la variabilidad entre los suelos con la variabilidad intrínseca dentro de cada suelo (valores calculados de F), podemos observar que los parámetros C, CHT y CHE presentaron la mayor variabilidad, mientras que la respiración basal y el C-biomasa microbiana presentaron la menor variabilidad y las actividades β-glucosidasa y β-galactosidasa tenían un valor medio de variabilidad.

El C orgánico del suelo (C) fue la única variable que presentaba valores significativamente diferentes en cada suelo respecto a los demás suelos.

En general, la jerarquización de los valores del coeficiente de variación obtenidos en los suelos estudiados coincide con la de los valores F obtenidos mediante el análisis de ANOVA. Sin embargo el parámetro C presenta el mayor valor F y, en cambio, un CV cuyo valor es intermedio; así pues la aparentemente discreta variabilidad de C en los suelos estudiados, es en realidad una alta variabilidad. Por otro lado la actividad β-galactosidasa es en realidad poco variable (valor de F bajo) aunque presenta el CV más elevado. Los resultados ponen de manifiesto la importancia de comparar, mediante un ANOVA, la variabilidad entre suelos con la inherente a la técnica analítica utilizada (valores de F).

Los parámetros C, CHT y GLU fueron los que mejor permitieron diferenciar los diez suelos.

En general, los parámetros estudiados (Tabla 3.4) presentaron valores más altos en los sitios con clima Mediterráneo litoral (LT, CR, MN y OR), comparados con los sitios de clima mediterráneo continental (VC, IG, PN, BL, LG y SG). El suelo LT presentó valores bajos a pesar de encontrarse en una zona húmeda pero tiene un contenido de arena muy elevado (86%) y en el suelo PN presentó valores altos pero está localizado en una zona seca, pero con un microclima húmedo. El suelo PN mostró los valores más altos de la mayoría de los parámetros estudiados (excepto para β -galactosidasa) (Tabla 3.4).

En general, los mayores valores de CBM se obtuvieron en los suelos donde las emisiones de CO₂, también eran altas. También es de destacar que el suelo LG, a pesar de presentar un valor de CBM similar a los de los suelos LT, BL y SG, presentó emisiones de CO₂ significativamente menores que dichos suelos (Tabla 3.4).

Los valores de C total por sí solos no pueden considerarse índices sensibles de los cambios que sufre la materia orgánica en los suelos (Sparling, 1992). En cambio, la respiración del suelo ha sido ampliamente utilizada como una medida de la actividad microbiana (Nannipieri *et al.*, 1990). El suelo PN (con el contenido más alto de C) mostró un valor de respiración basal, similar a los valores de CO₂ del suelo IG con un contenido de C cinco veces inferior. Los productos que actúan como fuente inmediata de energía para los microorganismos son los que reperentan la materia orgánica más lábil y por lo tanto susceptible de mineralización (Cook y Allan, 1992). Por lo tanto el suelo PN puede contener, en relación al suelo IG, una menor proporción de sustratos lábiles capaces de actuar como fuente de energía para los microorganismos; este hecho se confirma con la relación COE/C que en el suelo PN es de 1,32% mientras que en el suelo IG es de 1,87% , valores significativamente diferentes (Tabla 3.5).

En el suelo OR, con un contenido de C similar al del suelo MN, la emisión de CO₂ fue prácticamente la mitad. En este caso, no podemos atribuir las diferencias observadas en RB al contenido MO lábil, ya que presentan relaciones de COE/C similares (Tabla 3.5) sin embargo podemos sugerir que la actividad respiratoria de los microorganismos podría ser inhibida por la presencia de compuestos hidrofóbicos e inhibidores químicos aportados por la vegetación como hemos mencionado en párrafos anteriores.

Excepto los suelos IG y SG, el resto de los suelos han podido ser diferenciados por sus valores de actividad β -glucosidasa. Los valores de β -galactosidasa permiten una menor diferenciación entre los distintos tipos de suelos.

Los valores de los parámetros específicos (valores de los parámetros bioquímicos divididos por el contenido de carbono orgánico para cada suelo) se presentan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Parámetros específicos de los suelos analizados

Parámetros‡	LT	CR	MN	VC	OR	IG	PN	BL	LG	SG
COE/C	0,92d	0,83d	1,20c	1,25c	0,54e	1,87b	1,32c	2,08ab	2,23a	1,98ab
CBM/C	14,3c	15,2c	18,5bc	19,2bc	7,6c	32,0ab	20,2bc	34,1ab	38,9a	19,1bc
GLU/C	43,6c	38,2d	39,2d	45,2c	22,1f	49,8b	35,7e	43,76c	45,3c	59,1 ^a
GAL/C	10,9b	14,4a	13,5a	5,8de	2,1g	7,0c	5,2e	4,3f	3,6f	6,5cd
GLU/CBM	3,05a	2,51ab	2,11ab	2,35ab	2,92a	1,56bc	1,76bc	1,28bc	1,16c	3,10 ^a
GAL/CBM	0,76b	0,94a	0,73b	0,30cd	0,28cd	0,22cd	0,26cd	0,13d	0,09d	0,34c
qCO ₂	0,7c	2,5a	1,4bc	1,2bc	2,7a	2,6a	0,6c	1,9ab	2,6a	2,7a

‡ Unidades: Carbono orgánico extraíble/Carbono (COE/C) en %; Carbono biomasa/Carbono (CBM/C) en mg g⁻¹ C, β-glucosidasa específica (GLU/C) y β-galactosidasa específica (GAL/C) en μmol pNP g⁻¹ C h⁻¹, β-glucosidasa/C-biomasa microbiana (GLU/CBM) y β-galactosidasa/C-biomasa microbiana (GAL/CBM) en μmol pNP mg⁻¹ CBM h⁻¹; Cociente metabólico (qCO₂) en μg C-CO₂ mg⁻¹ CBM h⁻¹ * En cada fila, valores seguidos por la misma letra no muestran diferencias significativas entre suelos.

Los valores de la relación CBM/C en los distintos suelos varió entre 7,6 (suelo OR) y 38,9 mg g⁻¹ C (suelo LG) y en general fueron similares a los obtenidos por otros autores ya mencionados (Leirós *et al.* 2000, Trasar-Cepeda *et al.* 2000b, Miralles *et al.* 2007), sin embargo en los suelos IG, BL y LG, suelos que, de acuerdo a su uso, corresponden a un suelo agrícola abandonado, un suelo de prado y un suelo de estepa respectivamente, los valores de CBM/C fueron superiores a los obtenidos por dichos autores.

García *et al.* (1994), consideran que los suelos que muestran los valores más bajos para este índice debe contener una proporción sustancial de C residual, que está presumiblemente muy humificada y por lo tanto no es utilizable como C-biomasa, o como en el caso del suelo OR que presenta un menor grado de mineralización debido a que en el sistema de pinares existe un alto contenido de lignina, bajo contenido de N y por ende una baja calidad de la materia orgánica.

Los valores qCO₂ que encontramos en los suelos estudiados (Tabla 3.5) variaron entre 0,6 y 2,7 μg CO₂-C mg⁻¹ h⁻¹, pero no fueron en general significativamente diferentes entre sí, excepto entre los suelos CR, OR, IG, LG, SG, BL (con valores altos) y los suelos LT y PN (con valores bajos). Wardle y Ghani (1995) cuestionan la utilización del qCO₂ como indicador de perturbación y desarrollo del ecosistema y consideran que el qCO₂ puede ser incrementado por hojarasca resistente a la descomposición (como en el caso del suelo OR con el valor mas alto de qCO₂ donde la hojarasca de pino puede ser un recurso de inferior calidad para microfauna y microflora del suelo) o puede disminuir con el aumento del contenido de biomasa microbiana (como en el caso del suelo PN). El suelo PN además presenta una materia orgánica con una baja proporción de COE lo que puede también explicar su bajo qCO₂. El valor bajo de qCO₂ del suelo LT bajo clima cálido (temperatura media año 2006: 15,5°C) y elevado contenido de arena

podría explicarse parcialmente por una mayor eficiencia de la biomasa microbiana del suelo en la utilización del carbono en la síntesis celular en sitios con mayor temperatura. En un estudio realizado por Mogollón y Martínez (2009), en el cual estudiaban la variación de la actividad biológica del suelo en un transecto altitudinal en el Estado Falcón (Venezuela), encontraron una correlación positiva y significativa entre la temperatura y el qCO_2 , ($r=0,85$; $P<0,005$).

Los valores de actividad β -glucosidasa por unidad de C fueron similares a los obtenidos por Miralles et al. (2007), en suelos de clima mediterráneo provenientes de rocas calcáreas, en cambio fueron superiores a los valores obtenidos por Leirós *et al.* (2000) y Trasar-Cepeda *et al.* 2000b en suelos ácidos con alto contenido de aluminio activo de climas fríos y húmedos con poco o ningún déficit hídrico.

Los resultados mostraron que el suelo OR presentaba los valores más bajos de actividad específica de ambas enzimas, en cambio, el suelo SG presentaba la mayor actividad β -glucosidasa específica. De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 3.5, podemos apreciar que el suelo OR presenta las menores relaciones CBM/C, GLU/C y GAL/C, lo que sugiere una MO biológicamente poco activa, presumiblemente debido a inhibidores químicos presentes en los restos vegetales que disminuirían la velocidad de mineralización. Por el contrario, los suelos LT, CR y MN, suelos ácidos, muestran la mayor actividad β -galactosidasa por unidad de C y por unidad de CBM.

3.4.3 Correlación entre los distintos parámetros biológicos

En los estudios de correlación, la muestra PN fue omitida porque sus valores extremos habría sesgado los resultados.

Los resultados de la correlación entre los distintos parámetros se muestran en la Tabla 3.6.

Todas las variables informadas se correlacionaron significativa y positivamente entre sí (Tabla 3.6) con excepción de la respiración basal, que no mostró correlaciones significativas, ya sea con C o CHT. Cualquier correlación entre CHT y el resto de variables podrían explicarse por su dependencia del contenido de C. Las correlaciones entre los parámetros bioquímicos encontradas en nuestro estudio coinciden con las observadas por otros autores (García *et al.*, 1994; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000b; Bastida *et al.*, 2006, 2008; Zornoza *et al.*, 2007b). CBM, actividad β -glucosidasa y actividad β -galactosidasa muestran una correlación positiva con C, COE, CHT y CHE. La elevada correlación positiva ($p<0,001$) entre el COE y el CBM indica que esta fracción de C lábil podría sustentar el nivel de biomasa microbiana en el suelo, como observaron García *et al.* (2002).

La actividad β -glucosidasa está significativamente correlacionada ($p<0,001$) con el contenido de CHE lo que indica una dependencia de sustratos fácilmente degradables. El Carbono de la biomasa microbiana está significativa y positivamente correlacionado con las actividades enzimáticas medidas como β -glucosidasa y β -galactosidasa (Tabla 3.6). La RB, no presentó correlación significativa con el C

orgánico total o con los CHT, pero sí se correlacionó positivamente con CHE. Este resultado sugiere que una gran parte de estos compuestos está dedicada a mantener la respiración microbiana y que en climas semiáridos parte del C orgánico no tiene probablemente ninguna relación directa con la actividad microbiana. Estos resultados están en concordancia con los encontrados por García *et al.* (2005).

Tabla 3.6 Coeficientes de correlación (coeficiente de Pearson) entre los diferentes parámetros biológicos de los suelos (n=9, se omitió muestra Panadella).

Parámetros‡	COE	CHE	CHT	CBM	RB	GLU	GAL
C	0,737*	0.919***	0.991***	0.717*	ns	0.878**	0.685*
COE		0,851***	0,771*	0,955***	0,673*	0,911***	0,808**
CHE			0.940***	0.873**	0.810**	0.910***	0.868**
CHT				0.741*	ns	0.870**	0.700*
CBM					0.837**	0.898**	0.863**
RB						0.770*	0.837**
GLU							0.884**

‡ C: Carbono orgánico del suelo, COE: Carbono orgánico Extraíble, CHE: Carbohidratos Extraíbles, CHT: Carbohidratos Totales, C Biomasa Microbiana, RB: Respiración Basal, CBM: GLU: β -glucosidasa, GAL: β -galactosidasa. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05; ns: no significativo

La humedad del suelo, se correlacionó positivamente con C orgánico, la materia orgánica lábil (C extraíble, CHT y CHE), el CBM y a la actividad β -glucosidasa (datos no expuestos). Por el contrario, la temperatura se correlacionó significativa y negativamente con CBM y RB ($r = -0,66$ $P < 0,05$ y $r = -0,66$ $P < 0,05$ respectivamente). Esto está de acuerdo con datos de Zaman y Chang (2004), quienes observaron que el C de la biomasa microbiana fue más afectado por la temperatura, pero no tanto por el contenido de humedad del suelo. El pH del suelo sólo mostró una correlación significativa y negativa con la actividad β -galactosidasa ($r = -0,84$ $P < 0,01$).

3.4.4 Variaciones entre de los parámetros en las distintas localidades

Una comparación rápida entre las actividades bioquímicas de los diferentes suelos se puede obtener por los llamados diagramas estrella descritos por Dilly y Blume (1998).

La Figura 3.3 proporciona una comparación gráfica del comportamiento de las variables al describir las diferencias entre los diez suelos estudiados. Las variables C, CHT, CHE, CBM y actividad β -glucosidasa describen los suelos de la misma manera. En cambio, la actividad β -galactosidasa y la respiración se comportan de manera diferente respecto al primer grupo de parámetros y entre sí.

El comportamiento singular de la enzima β -galactosidasa, poco correlacionada con C y CHT, y negativa y significativamente correlacionada con el pH, parece indicar que esta enzima está asociada a un determinado tipo de MO más relacionada con los suelos ácidos (suelos CR y MN). En los últimos años se ha descrito una glicoproteína insoluble de elevado peso molecular denominada glomalina, importante en

la retención de carbono por su alta recalcitrancia y capacidad para formar agregados estables (Rillig *et al.* 2001). Es producida en cantidades variables y de manera específica por hongos micorrizicos arbusculares (HMA), por lo cual puede ser un importante contribuyente del total de proteínas del suelo y de la materia orgánica; ha sido encontrada abundantemente en un amplio rango de ecosistemas colonizados por HMA (Wright y Upadhyaya, 1996). Estudios realizados por Nichols (2003) caracterizan a la glomalina como un componente distinto a la materia orgánica del suelo y que puede llegar a representar hasta un 30% del C del suelo. En las glicoproteínas, la fracción de carbohidratos suelen ser cadenas lineales de azúcares en las que se alternan la hexosaminas, ácidos urónicos y galactosa. La mayor actividad β -galactosidasa en estos suelos podría deberse a la hidrólisis de los enlaces β -glucosídicos exclusivamente a nivel de la galactosa de este tipo de compuestos, posiblemente más abundantes en estos suelos.

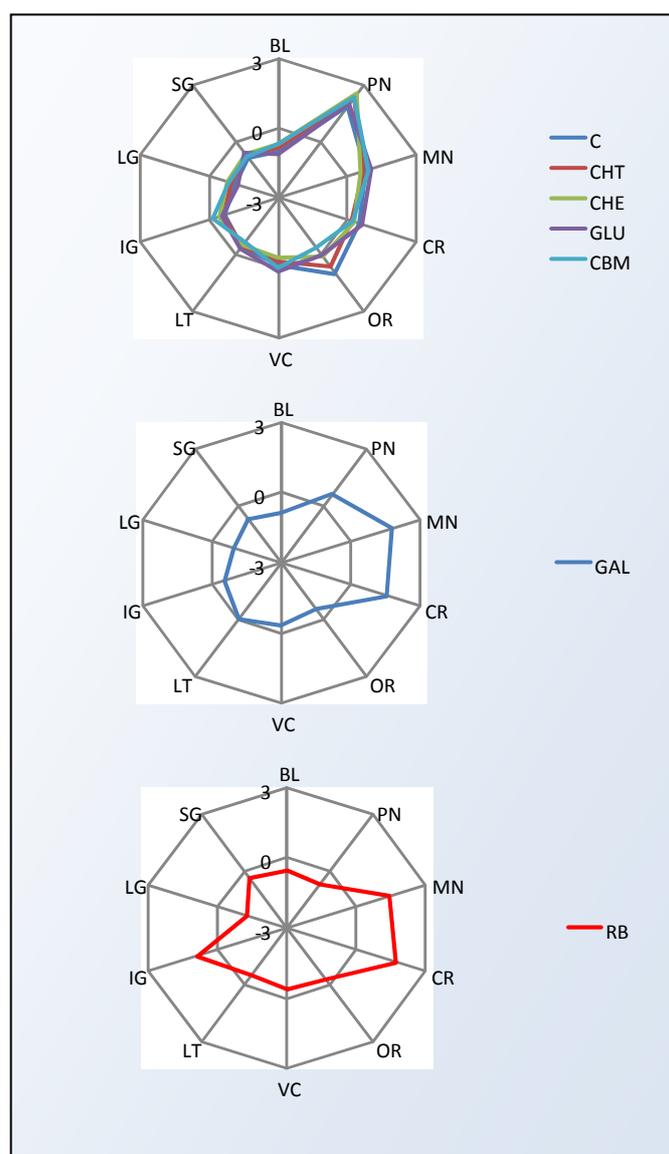


Figura 3.3. Diagramas estrella de los parámetros estandarizados con la localización de los diez suelos. C: Carbono orgánico del suelo, CHE: Carbohidratos extraíbles, CHT: Carbohidratos totales, GLU: β -glucosidasa, CBM: C-Biomasa. GAL: β -galactosidasa. RB: Respiración Basal.

3.4.5 Efectos del secado al aire y del secado al aire más rehumedecimiento sobre el C- biomasa microbiana, la respiración basal, la evolución del proceso respiratorio y las actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa

3.4.5.1 Resultados del ANOVA

Los resultados obtenidos del análisis de ANOVA con los factores pre-tratamiento y tipo de suelo (Tabla 3.7) mostraron que ambos factores tenían efectos significativos sobre todas las propiedades estudiadas. La interacción entre los dos factores fue también estadísticamente significativa para todas las propiedades excepto para el CBM.

Tabla 3.7. Tabla de ANOVA con los valores F en el análisis de los factores pre-tratamiento y tipo de suelo de los parámetros estudiados en los 10 suelos seleccionados.

	COE	CBM	RB	qCO ₂	β -glucosidasa	β -galactosidasa
Pre-tratamiento (PT)	774,77 ^{***}	24,07 ^{**}	776,75 ^{***}	138,43 ^{***}	169,60 ^{***}	281,47 ^{***}
Suelos (S)	603,66 ^{***}	160,52 ^{***}	205,44 ^{***}	20,16 ^{***}	859,37 ^{***}	1560,28 ^{***}
PT x S	44,46 ^{***}	1,46 ^{ns}	103,47 ^{***}	7,43 ^{***}	21,42 ^{***}	84,50 ^{***}

^{*}, ^{**} y ^{***} indican diferencias significativas al $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ y $P \leq 0.001$, respectivamente. ns, no-significativo.

3.4.5.2 Efecto del secado al aire sobre los parámetros CBM, RB, ERP y qCO₂

Los valores de CBM en las muestras de suelos secos al aire (media de los 10 suelos: 675,40 $\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo) fueron significativamente menores que aquellos de los suelos a humedad de campo (media de los 10 suelos: 813,19 $\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo). Gordon *et al.*, 2008, indican que la disminución en la difusión de sustratos provocados por el secado del suelo da lugar a cambios en el metabolismo provocando la muerte de parte de la población microbiana. Las diferencias relativas en los valores de CBM dentro de las muestras de suelo secas al aire fueron los mismos que las existentes en las muestras a humedad de campo (Figura 3.4).

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Van Gestel *et al.*, 1993; Magid *et al.*, 1999, Zornoza *et al.*, 2007a y Gordon *et al.*, 2008, e indican que la proporción de biomasa microbiana que sobrevivió al proceso de secado fue demasiado baja para alcanzar los valores de los suelos a humedad de campo, cuando tanto muestras de suelo secas al aire como muestras de suelo a humedad de campo, fueron incubadas al 60 % de la capacidad de campo. El rehumedecimiento de un suelo seco es un evento que crea un estrés extremo, aumenta el contenido de agua del suelo de forma muy rápida, y requiere que las células microbianas incrementen su potencial agua, por medio de una rápida liberación de solutos que les permite alcanzar de nuevo un estado de equilibrio. En casos extremos, el resultado inmediato es una

liberación de todos los solutos celulares, incluyendo osmoprotectores orgánicos tales como aminoácidos, compuestos de amonio cuaternario, glicerol, etc.; puesto que los suelos son típicamente pobres en C, esos compuestos orgánicos fácilmente degradables pueden ser rápidamente utilizados por los microorganismos que sobreviven, causando su proliferación y, una vez que el sustrato comienza a ser consumido completamente, su disminución (Gordon *et al.*, 2008). Así, el rehumedecimiento de un suelo seco altera la localización de los microorganismos en relación con su sustrato y puede causar fluctuaciones anómalas en el C de la biomasa microbiana. MN, OR, e IG fueron los suelos en los cuales el CBM disminuyó significativamente por el secado al aire. Los suelos de este estudio experimentan ciclos típicos de secado y rápido rehumedecimiento y un alto déficit de humedad la mayor parte del año, por lo tanto las comunidades microbianas estarían pre-adaptadas al estrés de la falta de agua (Sparling *et al.* 1987), pero la combinación de sequía y calor drásticos sufrida en el año 2006 en las regiones geográficas a las cuales pertenecen los 3 suelos mencionados (Tabla 3.1), causaría una fragilidad más alta a su población microbiana; se sabe que la duración de sequía y la cantidad de agua añadida para el rehumedecimiento tienen efectos sobre la comunidad microbiana del suelo (Clein y Schimel, 1994).

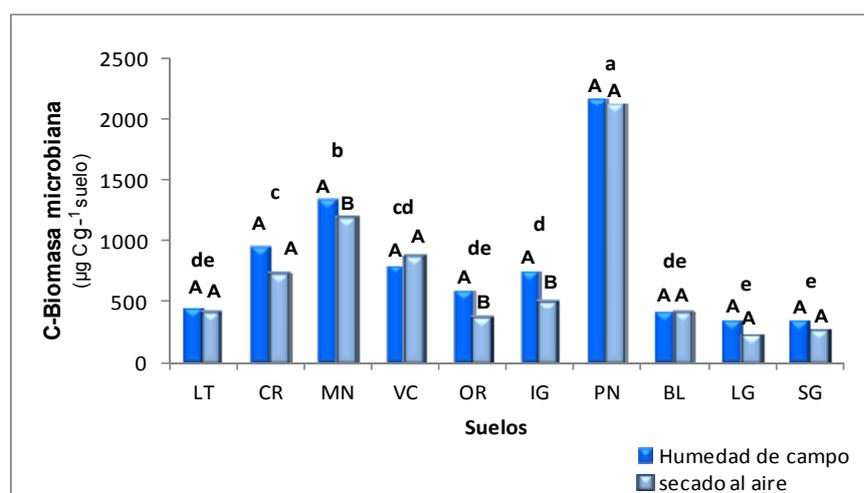


Figura 3.4. Valores de C-biomasa microbiana en suelos a humedad de campo y secos al aire. Para cada pre-tratamiento medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los suelos ($P \leq 0,05$). Para cada suelo medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre pre-tratamientos ($P \leq 0,05$).

El secado al aire de las muestras de suelo causó un aumento importante de la respiración basal (RB) respecto de los obtenidos en las muestras de suelo a humedad de campo (Figura 3.5). Los valores de RB ($\mu\text{g CO}_2\text{-C suelo seco de g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en las muestras secas al aire fueron generalmente entre 2 y 3 veces mayores que en las muestras a humedad de campo. Los aumentos más significativos en la RB provocados por el pre-tratamiento fueron aquellos observados en los suelos CR y MN. En los suelos LG y OR los

valores de RB en muestras secas fueron 3,8 y 5 veces superiores respectivamente que los obtenidos en muestras a humedad de campo. En estos suelos el secado al aire provocó la pérdida más importante en el contenido de biomasa microbiana, por lo que podríamos suponer que una gran parte del CO₂ liberado proviene principalmente de mineralización de la materia orgánica de los microorganismos muertos por el pre-tratamiento y no recuperados durante el proceso de incubación a capacidad de campo.

La mineralización de la materia orgánica protegida que fue liberada por el proceso de secado y rehumedecimiento también puede haber contribuido al aumento de la RB (Fierer y Schimel, 2003). Wu y Brookes (2005) también encontraron que, después del secado al aire, la mineralización de la materia orgánica experimentada por un suelo de prado una vez rehumedecido, era proporcional a la pérdida de su biomasa microbiana debido al pre-tratamiento.

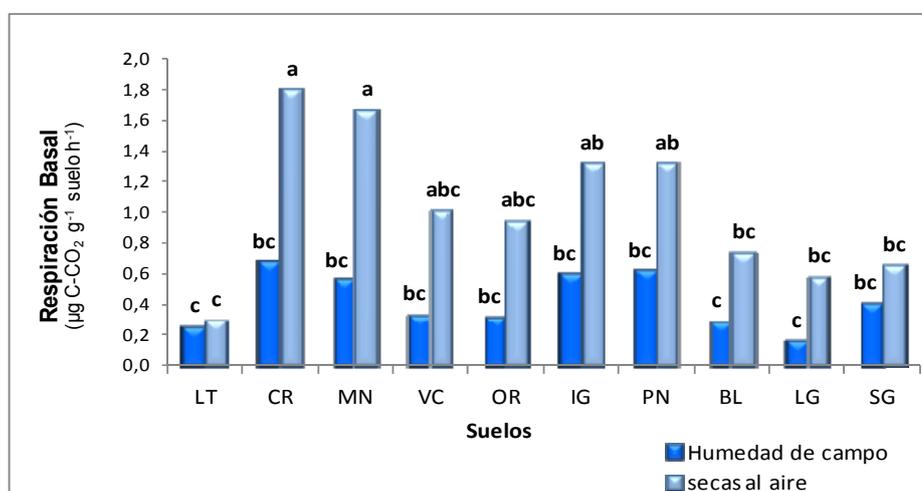


Figura 3.5. Efecto del secado al aire sobre la Respiración Basal del suelo. Letra o letras diferentes indican diferencias significativas entre suelos y entre pre-tratamientos (P ≤ 0,05).

En todas las muestras de suelo secadas al aire se observó un aumento en el cociente metabólico. Sin embargo este aumento sólo fue estadísticamente significativo ($P < 0,05$) en los suelos LT, CR, OR, IG y SG (Figura 3.6). Los incrementos en estos suelos variaron entre 89 y 222%. Un entorno cambiante (p. ej., sequía, congelación) crea condiciones que pueden ser estresantes para los microorganismos y sus efectos principales son cambios fisiológicos; los microorganismos deben aclimatarse al estrés inmediato alterando su asignación de recursos de crecimiento a vías de supervivencia (Schimel et al., 2007). De hecho, el estrés osmótico puede reducir aproximadamente en un 90% los rendimientos de crecimiento (la cantidad de biomasa producida por gramo de C metabolizado) (Killham y Firestone, 1984); un estrés demasiado extremo les obligará a entrar en latencia o podría matarlos. Anderson y Domsch (1978) demostraron que el qCO₂ cambia según la fase de crecimiento de los microorganismos, y encontraban

mayores valores ($21 \mu\text{g CO-C h}^{-1} \text{mg}^{-1}$) en la fase exponencial, valores de $8,7 \mu\text{g CO-C h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ durante la fase estacionaria y valores de $0,16-1,7 \mu\text{g CO-C h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para la biomasa microbiana en estado de latencia.

El $q\text{CO}_2$ puede ser un indicador sensible de estrés y reflejaría en nuestro caso como el impacto del secado al aire fue diferente según el suelo analizado, lo que nos hace suponer que la reducción en el rendimiento del crecimiento depende de la estrategia de vida que adopten los microorganismos en cada tipo de suelo para adaptarse a las condiciones cambiantes.

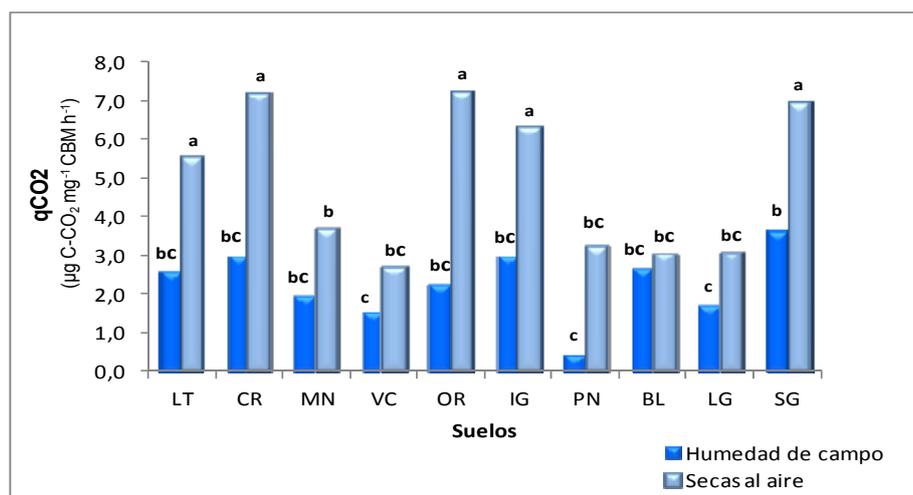


Figura 3.6. Efecto del secado al aire sobre el cociente metabólico ($q\text{CO}_2$). Letra o letras diferentes indican diferencias significativas entre suelos y entre pre-tratamientos ($P \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos en la evolución del proceso de respiración (EPR) (Tabla 3.8) mostraron que, en general, el secado al aire aumentó significativamente la producción diaria de C-CO_2 . La producción de CO_2 en el primer día de incubación al 60 % CC (pulso de CO_2) fue entre 1,1 y 1,6 veces superior en las muestras secas al aire, excepto en el suelo de la PN, en el que fue 15 veces mayor. Este último fenómeno es citado comúnmente en la bibliografía (Bottner, 1985; Kieft *et al.*, 1987; Franzluebbers *et al.*, 2000, Wu y Brookes 2005; Fierer y Schimel, 2003), y se atribuye a la mineralización rápida de los compuestos intracelulares sumamente enriquecidos que fueron liberados por la biomasa microbiana como una respuesta al aumento rápido del potencial agua del suelo (Fierer y Schimel, 2003). En nuestro caso probablemente la mineralización de la materia orgánica de la biomasa microbiana muerta por el secado al aire también contribuyó a este pulso. El valor claramente más alto del pulso de respiración experimentado por el suelo PN, comparado con otros suelos, sugiere que la mineralización de la materia orgánica protegida que fue liberada por el proceso de secado al aire también afectó el pulso de CO_2 . El suelo PN es el suelo con el contenido de C orgánico más alto y, teniendo en cuenta sus características, también el que tiene la proporción más alta de materia orgánica susceptible de ser liberada por el proceso anteriormente mencionado. Esta interpretación se ve reforzada por la pequeña diferencia en el contenido de CBM del

suelo PN después del secado al aire con respecto al suelo a humedad de campo. Nuestros resultados, conforme a la hipótesis de Scheu y Parkinson (1994), sugieren que tanto el C de la biomasa microbiana como la materia orgánica no biomásica contribuye al pulso de CO₂.

El secado al aire del suelo, modificó el ranking tanto de RB como del pulso de CO₂ de las muestras a humedad de campo.

Tabla 3.8. Efectos del secado al aire sobre la evolución de la respiración CO₂-C (µg g⁻¹ suelo h⁻¹) durante los 7 días de incubación.

Suelos	Días de incubación														CO ₂ acumulado	
	1		2		3		5		7		7		SA	HC		
	HC	SA	HC	SA	HC	SA	HC	SA	HC	SA	HC	SA	SA	SA		
LT	3,53aB	5,61aA	1,51bB	3,61bA	1,11cB	2,32cA	0,97cB	1,18dA	0,25dB	0,29eA	7,9	15,4				
CR	8,87aB	9,79aA	3,18bB	9,53aA	3,26bB	5,51bA	2,45bB	3,25cA	0,67cB	1,79cA	19,8	36,4				
MN	7,64aB	10,49aA	3,68bB	7,25bA	2,86cA	3,35cA	2,39cA	2,47dA	0,56dB	1,14eA	18,2	23,2				
VC	3,31aB	5,07aA	1,51bB	3,27bA	1,47bB	1,91cA	1,37cA	1,64cA	0,33dB	0,67dA	8,7	16,2				
OR	3,82aB	5,28aA	1,72bB	3,36bA	1,51cA	2,50bcA	1,28dA	1,81cA	0,31eB	1,56dA	9,3	17,3				
IG	6,06aB	7,57aA	2,76bB	3,52bA	2,52bB	3,15bA	2,34bA	2,18cB	0,59cB	1,31dA	15,4	21,9				
PN	1,33bB	20,00aA	0,64cB	8,75bA	1,86aB	7,08cA	1,19bB	3,33dA	0,61cB	1,25eA	6,8	47,3				
BL	1,97aB	2,41aA	1,97aA	1,64bB	1,62bA	1,05cB	1,33cA	0,83cB	0,28dB	0,73cA	7,7	5,8				
LG	1,55aB	2,50aA	0,47dB	0,85bA	0,62cB	0,75bA	0,95bA	0,57bA	0,15eA	0,57cA	4,1	6,3				
SG	3,06aB	4,91aA	1,51bB	2,14bA	1,40cA	1,76cA	1,65cA	1,40dA	0,40dB	0,65eA	8,8	14,4				

HC: Suelo a humedad de campo, SA: suelo secado al aire. Medias dentro de una fila del mismo pre-tratamiento, seguidas por la misma letra minúscula no son significativamente diferentes con el tiempo según la prueba de SNK (P = 0,05). Medias dentro de una fila del mismo día de incubación, seguidas por la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes entre pre-tratamientos según la prueba de SNK (P = 0,05).

3.4.5.3 Efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento sobre las actividades enzimáticas

Los valores de las actividades de las enzimas β -glucosidasa y β -galactosidasa en muestras de suelo a humedad de campo, secas al aire y secas al aire y rehumedecidas se muestran en la Tabla 3.9.

En los suelos LT, MN, VC, IG y SG, el secado al aire aumentó significativamente la actividad β -glucosidasa del suelo (1,2 veces aproximadamente); en cambio, en el resto de los suelos este pretratamiento no modificó significativamente la actividad enzimática. El secado al aire no modificó el ranking de los valores de la actividad β -glucosidasa entre los suelos respecto de las muestras a humedad de campo, pero disminuyó la capacidad de discriminación entre los suelos (Tabla 3.9). Este resultado concuerda con la interpretación de Bandick y Dick. (1999) y Jiménez *et al.* (2007), quienes sugieren que esta enzima está principalmente asociada a coloides húmicos que protegen a la enzima de la desnaturalización. Trasar-Cepeda *et al* (2008a) plantean la hipótesis según la cual el estrés ambiental aumenta la capacidad de la materia orgánica del suelo de retener la actividad β -glucosidasa mediante enlaces físicos y químicos. El secado al aire disminuyó significativamente la actividad β -galactosidasa en los suelos VC, IG, PN y SG (1,3 veces aproximadamente) y no modificó significativamente la actividad en el resto de los suelos, lo que significa que probablemente esta enzima estaba menos protegida por la materia orgánica humificada que la enzima β -glucosidasa. Efectivamente, los suelos VC, IG, PN y SG en los cuales el secado al aire causó una disminución significativa en la actividad β -galactosidasa, estaban también entre los que sufrieron el pulso más alto de CO₂ y, por lo tanto, entre los que tenían el contenido más alto de materia orgánica degradable. Los valores de la actividad β -galactosidasa de muestras secas al aire muestran consistentemente la misma capacidad de discriminación entre suelos que las muestras a humedad de campo (Tabla 3.9). Estos resultados podrían explicar el comportamiento singular de esta enzima comentado en 3.4.4 que estaría predominantemente asociada a un determinado tipo de MO.

El secado más rehumedecimiento de los suelos causó en general un aumento significativo de los valores de las actividades enzimáticas de las muestras a humedad de campo; excepto en los suelos LT y OR en los cuales el tratamiento disminuyó significativamente la actividad β -glucosidasa (1,3 y 1,2 veces respectivamente) y no modificó la actividad β -galactosidasa. Además, el secado y rehumedecimiento del suelo modificó el rango de los valores de ambas actividades enzimáticas existentes en muestras a humedad de campo (Tabla 3.9). Tal como se cita en Lee *et al* (2007), este aumento en la actividad enzimática durante el ciclo de rehumedecimiento probablemente se deba a la disrupción del suelo que expone el sustrato a las enzimas (Tabatabai y Bremner, 1970b) o a la inducción de las enzimas debido a la liberación de sustratos de las células lisadas (Kuprevich y Scherbajova, 1971; Pesaro *et al.*, 2004). Estos aumentos en la actividad enzimática coinciden con los obtenidos en otros estudios sobre actividad microbiana y porcentajes de mineralización en suelos secos y en suelos secos rehumedecidos (Fierer y Schimel, 2002). Sin embargo otros autores no observaron aumentos en la actividad β -glucosidasa luego del rehumedecimiento de suelos secos (Hinojosa *et al.*, 2004; Zornoza *et al.*, 2006; Lee *et al.* 2007).

Tabla 3.9. Actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa en muestras de suelo a humedad de campo (HC), secas al aire (SA) y secas al aire y rehumedecidas (RH).

Suelos	β -glucosidasa ($\mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$)			β -galactosidasa ($\mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$)		
	HC	SA	RH	HC	SA	RH
LT	1,34fB	1,59dA	0,92gC	0,33dA	0,29dA	0,29dA
CR	2,37cB	2,26cB	2,71cA	0,89bB	0,76bB	1,83aA
MN	2,84bB	3,55bA	3,54bA	0,98aB	1,05aB	1,21bA
VC	1,88dC	2,20cB	3,04cA	0,24eB	0,20eC	0,31dA
OR	1,73eA	1,60dA	1,34fB	0,16fA	0,18eA	0,20efA
IG	1,15gC	1,55dB	2,10dA	0,16fB	0,10fC	0,24deA
PN	3,83aB	3,83aB	4,71aA	0,56cB	0,33cC	0,75cA
BL	0,53hB	0,55fB	0,72gA	0,05gB	0,05gB	0,13fgA
LG	0,39 iB	0,46fB	0,68gA	0,03gB	0,03gB	0,10gA
SG	1,06gC	1,25eB	1,69eA	0,11fB	0,10fC	0,14fgA

Para cada parámetro, medias dentro de una fila, seguido por la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes entre pre-tratamientos según la prueba de SNK ($P \leq 0,05$). Para cada parámetro, medias dentro de una columna seguidas por la misma letra minúscula no son significativamente diferentes entre suelos según la prueba de SNK.

Regresión lineal simple de los valores de las actividades enzimáticas entre muestras de suelo secas al aire o secas al aire y rehumedecidas y muestras de suelo a humedad de campo.

Siguiendo el procedimiento propuesto por Zornoza *et al* (2006), se evaluó la pendiente obtenida de regresiones lineales simples de los valores de las actividades enzimáticas entre muestras de suelo secas al aire o secas al aire y rehumedecidas y muestras de suelo a humedad de campo. Nuestro objetivo fue cuantificar las desviaciones de una relación 1: 1 y averiguar qué pre-tratamiento presentó los menores cambios de los valores iniciales del suelo a humedad de campo.

Los valores de la actividad β -glucosidasa en las muestras secas al aire fueron representativos de los valores obtenidos en condiciones de campo (pendiente 1,02; R^2 0,947, $P < 0,001$) (Figura 3.7), por el contrario, el secado al aire subestima los valores de β -galactosidasa existente en muestras a humedad de campo (pendiente 0,94, R^2 0,932; $P < 0,001$). Se encontraron sobreestimaciones de los valores de campo por el secado al aire y rehumedecimiento de los suelos para las actividades β -glucosidasa (pendiente 1,15; R^2 0,88; $P < 0,001$) y la actividad de β -galactosidasa (pendiente 1,49; R^2 0,865, $P < 0,001$).

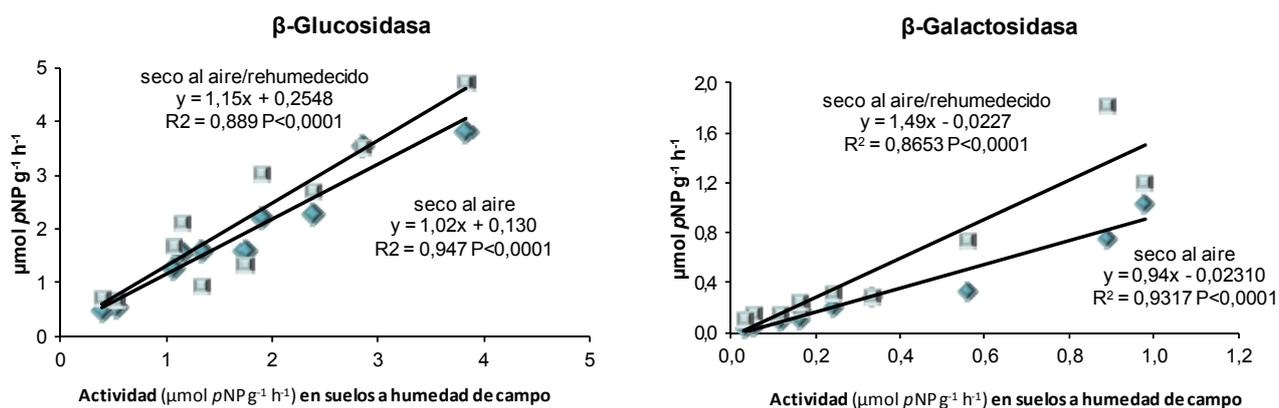


Figura 3.7. Actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa determinadas en muestras de suelo bajo condiciones de campo, secas al aire y secas al aire y rehumedecidas.

3.4.5.4 Comparación de los efectos del secado al aire con los efectos del secado al aire y rehumedecimiento sobre los valores COE de los suelos

En el caso del COE, debido a un error de identificación, los valores de las muestras secas al aire sólo pueden compararse con los valores de las muestras secas al aire y rehumedecidas (60% CC, 7 días de incubación a 28 °C). Los valores de COE ($\mu\text{g C g}^{-1}$) de las muestras secas al aire fueron muy superiores a las de muestras secas al aire y rehumedecidas (Figura 3.8), excepto en suelo OR, en el que los valores de COE en las muestras secas al aire fueron superiores pero no significativamente diferentes de las muestras secas al aire y rehumedecidas. El contenido de COE de los suelos secos al aire corresponde a la materia orgánica extraíble que ya existía en las muestras a humedad de campo y también a la de la biomasa microbiana muerta por el secado al aire. Sin embargo, el contenido COE de muestras secadas al aire y rehumedecidas corresponde: (i) al contenido de materia orgánica extraíble en las muestras a humedad de campo; (ii) a la biomasa muerta por el secado al aire y que no se recuperó durante el proceso de incubación a capacidad de campo; y (iii) a la parte de la materia orgánica que fue solubilizada por secado y rehumedecimiento como resultado de la liberación de la que estaba protegida, liberación causada por la disrupción de los microagregados durante el rehumedecimiento (nivel estructural del suelo) y/o por el aumento de la solubilidad de las sustancias húmicas (nivel molecular) (Magid *et al.*, 1999; Denef *et al.*, 2001; Wu y Brookes, 2005). El mayor contenido de COE en las muestras de suelo secas al aire en comparación con las muestras secas al aire y rehumedecidas, indica que el valor de la materia orgánica correspondiente a la porción de biomasa microbiana muerta durante el secado era superior a la de la materia orgánica liberada por secado y rehumedecimiento. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de

que OR fue el único suelo seco al aire cuyo valor de COE no disminuyó por rehumedecimiento. Además, fue el suelo que sufrió la mayor reducción del CBM y el mayor aumento en la RB debido al secado al aire. En consecuencia, fue el suelo con menor recuperación del CBM luego del rehumedecimiento.

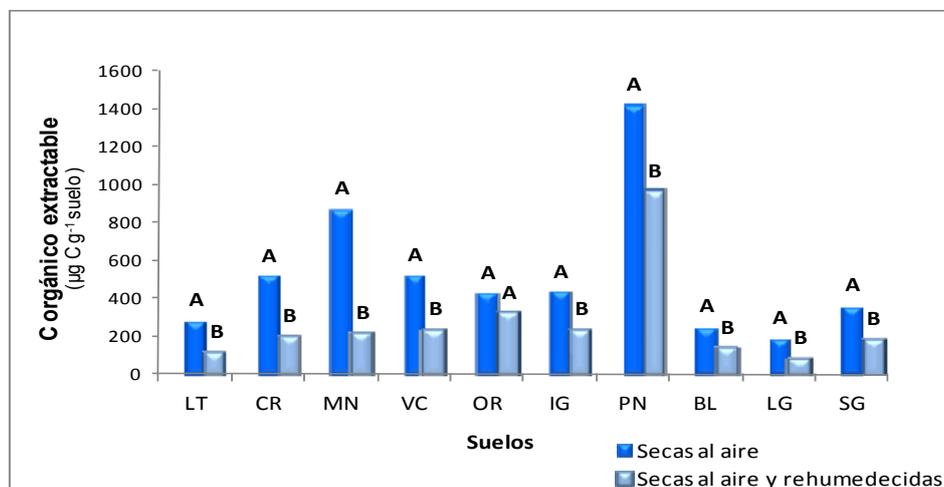


Figura 3.8. Valores de C orgánico extraíble en suelos secados al aire y secados al aire y rehumedecidos. Para cada suelo, medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre pre-tratamientos ($P \leq 0,05$).

4

PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE SUELOS RESIDUALES DE CANTERAS DE PIEDRA CALIZA RESTAURADOS CON LODOS DE DEPURADORAS. EFECTOS DE LOS SISTEMAS DE POST-TRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS SOBRE ESTAS PROPIEDADES

4

Propiedades biológicas de suelos residuales de canteras de piedra caliza restaurados con lodos de depuradoras. Efectos de los sistemas de post-tratamiento y conservación de las muestras sobre estas propiedades**4.1 Introducción****4.1.1 Los lodos de depuradora y su utilización en la restauración de suelos degradados. Parámetros indicadores de la evolución del proceso restaurador.**

La restauración de espacios degradados por actividades extractivas a cielo abierto debe comenzar por el diseño de una morfología del territorio afectado y la posterior reinstalación de un medio edáfico capaz de restablecer las condiciones adecuadas para la posterior restitución de la cubierta vegetal. Existen algunas experiencias en las que se utiliza el material de rechazo del proceso productivo (los estériles o residuos de la extracción) para la propia recuperación de los emplazamientos degradados (Álvarez, *et al.* 1997, Paradelo, *et al.*, 2006), sin embargo, la carencia de materia orgánica, nitrógeno y fósforo de estos limita su utilización. La aplicación de lodos de depuradora facilita el establecimiento de una cobertura vegetal. Las zonas abonadas con lodos muestran un mayor desarrollo de las plantas, con importantes incrementos del grado de recubrimiento del suelo, de la biomasa y del crecimiento en altura, ya sean especies herbáceas o arbóreas. (Navas *et al.* 1999; Düring y Gäth, 2002; Smith y Tibet, 2004), que además de proteger al suelo de la erosión puede estimular los ciclos del C y N y por lo tanto reducir la contaminación por lavado o escorrentía (Albaladejo *et al.*, 2000). Esta importante cantidad de materia orgánica generada por las plantas sustituye progresivamente la que se pierde en el suelo por la rápida descomposición de los lodos (Alcañiz *et al.*, 2009).

Como resultado, la adición de lodos de depuradora a los materiales residuales se está convirtiendo en una solución técnica cada vez más popular para la restauración de suelos degradados y el restablecimiento de la cubierta vegetal.

Cuando los lodos son aplicados al suelo, pueden causar alteraciones en el ecosistema y los parámetros biológicos del suelo pueden ser indicadores potenciales y sensibles del estrés ecológico del suelo o de su restauración (Bentham *et al.*, 1992). Los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos se han determinado comúnmente en estudios de restauración de suelo desde la década de los 90 (Sopper, 1993; Sort y Alcañiz, 1999; Bonmatí *et al.*, 2000 y Jiménez *et al.*, 2007).

Uno de los parámetros más sensibles a la evolución del proceso de restauración es la comunidad microbiana, la cual puede ser utilizada como un primer indicador de los cambios que se producen en la

calidad del suelo (Dick, 1994; Giller *et al.*, 1998). Además las mediciones de varias actividades enzimáticas han sido utilizadas para establecer los índices de fertilidad biológicos (Dick y Tabatabai, 1992). El carbono orgánico extraíble (soluble K_2SO_4 0,5 M) es una medida de la materia orgánica fácilmente disponible en el suelo (Joergensen y Brookes, 1990) y los carbohidratos totales, que tienen fundamentalmente un origen microbiano (Urbain *et al.*, 1993), constituyen un factor importante en la estabilización de agregados del suelo (Tisdall, 1991; Robert y Chenu, 1992; Safarik y Santrucková, 1992). Los carbohidratos extraíbles (solubles K_2SO_4 0,5 M) están relacionados con el carbono disponible en el suelo (DeLuca y Keeny, 1993) y pueden relacionarse con los carbohidratos microbianos después de la lisis celular por fumigación de $CHCl_3$ (Badalucco *et al.*, 1990, 1992). Los microorganismos contenidos en los lodos afectan las partículas del suelo modificando su disposición debido al impacto indirecto sobre la estabilidad de los agregados a través de los exudados extracelulares (Chenu y Stotzky, 2002, García-Orenes *et al.*, 2005; Ojeda *et al.*, 2008). La actividad de la enzima β -glucosidasa se ha sugerido como una medida de integración de las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo (Turner *et al.*, 2002), y la actividad de la enzima β -galactosidasa se ha propuesto como un indicador biológico útil para el seguimiento del proceso de recuperación del suelo (Martínez-Iñigo *et al.*, 2009).

4.1.2 Efecto de los lodos de depuradora sobre las propiedades bioquímicas de los suelos

El efecto sobre la actividad biológica del suelo, promovido por la aplicación de residuos orgánicos, compost, lodos o estiércol ha sido ampliamente estudiado (Dick, 1994; Albiach *et al.*, 2000; Bonmatí *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 1999; García y Hernández, 2000; Gigliotti *et al.*, 2001; Sastre-Conde *et al.*, 2003).

La biomasa microbiana del suelo y la respiración de suelo se han utilizado para determinar el efecto de la enmienda de lodos sobre propiedades microbiológicas del suelo. Diversos autores han demostrado que la aplicación de lodos, debido a un incremento en la disponibilidad de carbono y nutrientes, estimula la actividad microbiana y el contenido de biomasa microbiana (Giusquiani *et al.*, 1989; García *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1999; Emmerling *et al.*, 2000; Garcia-Gil *et al.*, 2000; Saviozzi *et al.*, 2002; Speir *et al.*, 2003; Sánchez-Monedero *et al.*, 2004; Usman *et al.*, 2004; Jimenez *et al.*, 2007), aumenta el contenido de carbohidratos del suelo (Giusquiani *et al.*, 1989; García *et al.*, 1993; Pascual *et al.*, 1999; Saviozzi *et al.*, 1999; Albiach *et al.*, 2000, 2001; Speir *et al.*, 2003; García-Orenes *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2007) y la actividad β -glucosidasa (Eivazi y Zakaria, 1993; Kizilkaya y Bayraklı, 2005; Jiménez *et al.*, 2007), y el incremento es mayor cuanto mayor es la dosis aplicada.

El efecto y la evolución de las distintas enmiendas orgánicas sobre las propiedades microbiológicas y bioquímicas del suelo dependen del grado de madurez de la materia orgánica (MO) del material aplicado. Los suelos enmendados con lodos deshidratados mostraron niveles superiores de respiración microbiana (Emmerling *et al.*, 2000, Selivanovskaya *et al.*, 2001; Speir *et al.*, 2004, Jiménez

et al., 2007), de C biomasa microbiana (Selivanovskaya *et al.* 2001, Speir *et al.* 2004, Jiménez *et al.* 2007), de carbohidratos totales (CHT) y extraíbles (CHE) (Jiménez *et al.* 2007, Fernández *et al.*, 2009), y de actividad β -glucosidasa (Jiménez *et al.*, 2007), en comparación con los suelos enmendados con lodos compostados. Estas diferencias se atribuyen a la variación de la composición química estructural de los materiales de desecho de diferente grado de madurez y a la potencial inmovilización microbiana debido al compostaje y a la mayor actividad enzimática de la materia orgánica de los lodos no compostados. Se demostró que el efecto estimulante de los lodos compostados sobre la actividad biológica de suelos degradados es más bajo, pero más persistente que el de algunos lodos deshidratados (Moreno *et al.*, 1999; Emmerling *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2002).

Estudios realizados sobre propiedades bioquímicas mostraron que los lodos compostados proporcionan una materia orgánica más madura y estable que los lodos de secado térmico, cuando ambos lodos se añaden a los suelos y que el incremento en el C orgánico total, el C extraíble total, los ácidos húmicos y fúlvicos (Fernández *et al.*, 2007), el carbono de la biomasa microbiana, la respiración basal y la actividad β -glucosidasa (Jimenez *et al.*, 2007) con respecto al suelo control fueron más evidentes en los suelos enmendados con lodos compostados que en los modificados con lodos de secado térmico.

El efecto que pueda provocar sobre la biomasa microbiana el agregado al suelo de lodos de depuradora contaminados con metales pesados, dependerá si la respuesta se mide en el corto plazo (cuando una gran cantidad de C orgánico lábil está presente) o si se mide a largo plazo (cuando este sustrato fácilmente disponible se agota). Una hipótesis es que, como la materia orgánica agregada se mineraliza, los metales quelados por ésta pueden ser liberados y hacerse más biológicamente disponibles y, en consecuencia más tóxicos. Otra hipótesis es que después que los metales son liberados de los lodos, reaccionan químicamente con el suelo, de modo tal que el metal disminuye su toxicidad con el tiempo (Chander *et al.*, 1995). La biomasa microbiana disminuye y la respiración del suelo y especialmente la respiración por unidad de biomasa (qCO_2) aumenta en suelos tratados con lodos contaminados con metales pesados en altas concentraciones (Chander y Brookes, 1991; Fließbach *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 1999; Khan y Scullion, 2000; Griffiths *et al.*, 2005). Sin embargo, Moreno *et al.*, (1999) observaron en un experimento de 120 días, que cuando se agregan al suelo altas dosis de lodos con bajo contenido de metales, el C-biomasa microbiana del suelo aumenta en respuesta a la incorporación de materia orgánica fácilmente biodegradable y al final del período de incubación los valores del suelo tratado siguen siendo superiores a los del control. La actividad β -glucosidasa fue inhibida en suelos enmendados en altas dosis de lodos ricos en metales como Hg, Mo y Ni-Cd (Eivazi y Tabatabai, 1990; Renella *et al.*, 2005), en cambio no se vio afectada en suelos enmendados con lodos ricos en Mn-Zn (Renella *et al.*, 2005) o Cd (Moreno *et al.*, 1999, 2003). Sin embargo, la presencia de metales en combinación puede tener mayores efectos negativos sobre la biomasa microbiana del suelo y su actividad (Chander *et al.*, 1995; Khan y Scullion, 1999) y sobre las actividades hidrolasa del suelo que aquellos causados por metales únicos en altas concentraciones (Renella *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que una gran parte del N orgánico en los biosólidos es de origen proteico (Hattori y Mukai, 1986). Hattori y Mukai (1986) encontraron una correlación entre la mineralización del N orgánico de las mezclas de biosólidos-suelo y el contenido en proteínas brutas en los biosólidos. El cociente entre el valor de la actividad enzimática y el N proteico es indicador del grado de pureza o inhibición de las actividades estudiadas.

4.2 Objetivos

Los objetivos en esta etapa de nuestro estudio fueron:

1. Comparar los efectos de seis diferentes tipos de lodos (tres lodos de secado térmico y tres compostados) sobre los parámetros bioquímicos de dos suelos residuales utilizados en el proceso de recuperación de cantera de piedra caliza. Los parámetros bioquímicos investigados fueron:
 - a. Carbono orgánico extraíble (COE)
 - b. Carbohidratos totales y extraíbles (CHT y CHE)
 - c. Biomasa microbiana del suelo (CBM)
 - d. Respiración del suelo (RB)
 - e. Actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa (GLU y GAL)
 - f. Aminoácidos totales (AA)

2. Evaluar en los suelos restaurados el efecto del pre-tratamientos de las muestras:
 - i) secado al aire sobre:
 - a. C-biomasa microbiana (CBM)
 - b. Respiración basal (RB)
 - c. Evolución del proceso de respiración
 - d. Actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa

 - ii) secado al aire y rehumedecimiento sobre
 - a. Actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Área de Estudio

La experiencia se llevó a cabo en la cantera “Las Cubetas”, al oeste de Begues (comarca del Baix Llobregat), con coordenadas UTM: X = 407 297,4 y Y = 4 577 233,8 (huso 31T) y a 365 m snm (Figura 4.1), en un terraplén construido expresamente cerca de la entrada a la explotación. La cantera era explotada por la empresa Aricemex. La roca caliza y la escasez de suelo vegetal son aspectos que condicionan el paisaje del macizo del Garraf y de sus inmediaciones. Su situación, próxima a la costa, determina un clima típicamente mediterráneo (precipitación media anual: 644 mm, temperatura: 13 ° C) con lluvias en primavera y otoño, escasas pero torrenciales, temperaturas suaves, inviernos templados y veranos calurosos y secos.

Las precipitaciones acumuladas durante el período del experimento (mayo 2005–Junio 2006) fueron de 628,5 mm. Las fechas de episodios con precipitaciones superiores a 30 mm fueron 09/07/2005, 14/11/2005, 07/01/2006 y 25/05/2006.

La zona nos ofrece un paisaje mediterráneo meridional. La vegetación que caracteriza este paisaje es matorral y monte bajo, no muy denso y de escaso porte, con pinares de pino carrasco y pino blanco.

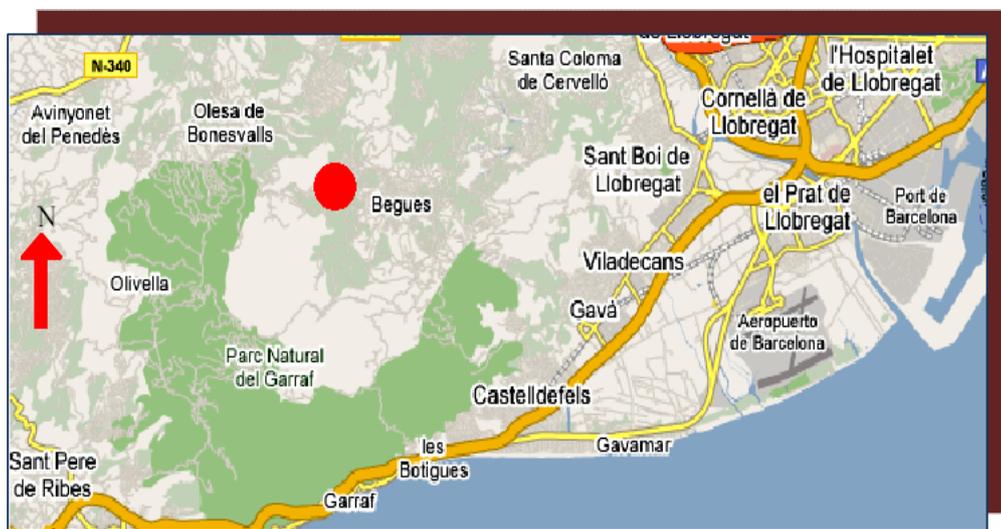


Figura 4.1 Mapa de localización de la zona de la experiencia.

4.3.2 Característica de los Suelos Residuales

Para la preparación de los substratos se utilizaron dos materiales minerales de rechazo de la propia explotación. Esta cantera produce dos tipos de suelos residuales que han sido utilizados en este estudio: un suelo proveniente del proceso de extracción (**E**) que es un suelo Mediterráneo rojo esquelético, con una textura franca, pobre en materia orgánica ($C\ 0,47 \pm 0,09\%$) pero rico en cal ($CaCO_3: 39,3 \pm 8,0\%$) y fragmentos gruesos ($62,0 \pm 6,6\%$). El otro material residual (**T**), es generado durante el proceso de trituración del material pétreo para la fabricación de áridos, con una textura franco-arenosa o franco-arcillo-arenosa, tiene un mayor porcentaje de fragmentos gruesos ($86,0 \pm 6,2\%$) y carbonatos totales ($CaCO_3: 63,6 \pm 6,8\%$) y menor contenido de materia orgánica ($C\ 0,28 \pm 0,04\%$).

4.3.3 Características de los Lodos

Los lodos procedían de seis diferentes plantas municipales de tratamientos de aguas residuales (EDAR) de Cataluña: Blanes (**BL**), Manresa (**MN**), Vilaseca (**VL**), Besós (**BE**), Mataró (**MT**) y Sabadell (**SB**). La tabla 4.1 muestra las principales características de los seis lodos. En las plantas de tratamiento, cuatro de los seis lodos (**BL**, **MN**, **MT** y **SB**) fueron sometidos a digestión anaerobia, **VL** se sometió a digestión aeróbica y **BE** no sufrió digestión. Todos los lodos fueron estabilizados y parcialmente deshidratados (ca. 20% materia seca) antes de ser sometidos a un proceso de compostaje o secado térmico. Los lodos **BL**, **MN** y **VL** fueron compostados, con una fase termofílica que duró entre 15 y 28 días y la fase de maduración en pila de 2 ó 3 meses de duración. El lodo **MN** fue compostado con corteza de pino, mientras que los lodos **BL** y **VL** fueron compostados con astillas de pino. Luego de la fase termofílica, los lodos fueron tamizados por tamiz de 10 mm donde se recuperó el 90% de las astillas y se llevaron a madurar. Los otros tres lodos (**BE**, **MT** y **SB**) se secaron térmicamente en un cilindro rotativo climatizado inyectando aire caliente ($80-90\ ^\circ C$) durante aproximadamente 20 minutos. Los lodos compostados tenían una típica estructura granular y contenían una fracción importante de agente estructurante. La apariencia de los lodos de secado térmico difiere claramente entre ellos: **MT** en forma de polvo, **BE** de aspecto fibroso y **SB** compuesto por «pellets» (alrededor de 1 cm de longitud).

Tabla 4.1. Origen, tratamiento y composición de los lodos de aguas residuales que se utilizaron como enmienda orgánica (datos expresados sobre materia seca)

Origen	Símbolo	Sistema de depuración de aguas residuales	Tipo de digestión de lodos	Post-tratamiento de lodos	CE* (dS/m ⁻¹)	pH	Materia Orgánica %	N %
Blanes	BL	Biológico	Anaeróbico	Compostado	7,6	6,5	56,6	3,20
Manresa	MN	Biológico	Anaeróbico	Compostado	3,9	7,1	55,5	2,25
Vilaseca	VL	Biológico	Aeróbico	Compostado	8,5	6,9	58,3	2,98
Sabadell	SB	Biológico	Anaeróbico	Secado Térmico	0,9	7,3	62,2	3,86
Mataró	MT	Biológico	Anaeróbico	Secado Térmico	5,9	6,2	74,0	3,52
Besos	BE	Físico-químico	No digerido	Secado Térmico	1,4	6,1	72,3	2,22

*CE: conductividad eléctrica (1:5) a 25°C

4.3.4 Diseño Experimental

La adición de lodos a los suelos residuales se calculó teniendo en cuenta la composición de los suelos residuales y de los lodos con el objetivo de aumentar el contenido de materia orgánica del suelo hasta el 2%. El volumen y la densidad aparente promedio de las mezclas fueron de 0,1 m³ y de 1650 kg m⁻³, respectivamente. El contenido promedio de materia seca de los lodos de secado térmico y compostados fue 85,0% y 66,5%, respectivamente. Las adiciones promedio de lodos al residuo mineral de extracción (**E**) fueron 107 Mg ha⁻¹ (peso fresco) para los lodos de secado térmico y de 171 Mg ha⁻¹ (peso fresco) para los lodos compostados. Para el residuo mineral de trituración (**T**), las adiciones promedio fueron 62 Mg ha⁻¹ (peso fresco) para los lodos de secado térmico y de 99 Mg ha⁻¹ (peso fresco) para los lodos compostados. Para cada tratamiento (Material de rechazo: Suelo residual; Substrato de restauración “fabricado” por mezcla de suelo residual +Lodos) se prepararon 4 réplicas, dando un total de 56 lisímetros (2 suelos residuales x 6 lodos x 4 réplicas) + (2 suelos control sin lodo x 4 réplicas). La dosificación y la mezcla de los componentes de los substratos se hicieron utilizando un pequeño tractor autotransportado, provisto de pala mecánica con capacidad de carga de 40 kg. Los lodos se dosificaron con balanza de campo, con una precisión de 0,1 kg. Se cargaron y se mezclaron entre 10 y 20 kg de lodos con 650 kg de residuo mineral con la pala mecánica hasta conseguir un grado de mezcla aceptable de ambos materiales. En las Figuras 4.2 y 4.3 se muestra el equipo utilizado para la dosificación, mezcla y carga de los substratos ensayados. Los substratos se ensayaron en lisímetros, contenedores de polipropileno tronco cilíndricos de 150 L de capacidad y un diámetro de 0,33 m aproximadamente, previamente rellenos con una capa de grava de 25 cm (Figura 4.4). En la parte inferior de cada lisímetro se colocó un grifo lateral que permitió recoger los lixiviados en un frasco de 30 L (Figura 4.5). La separación entre los lisímetros fue de 1,5 metros.



Figura 4.2 Equipo para la dosificación y mezcla de los residuos para la preparación de los sustratos ensayados

Figura 4.3 Carga de los sustratos ensayados durante la experiencia.



Figura 4.4 Gravas del fondo del contenedor para asegurar el drenaje



Figura 4.5 Colectores del agua de drenaje.

Posteriormente se depositó el sustrato sobre el material de drenaje de cada contenedor y se trasladó por medios mecánicos hasta su ubicación definitiva (Figura 4.6).



Figura 4.6 Disposición de los lisímetros

Después de la primera toma de muestras, los lisímetros fueron sembrados (30 g m^{-2}) con una mezcla de *Gramineas* y *Leguminosas*. Se realizó un riego inicial con 15 L de agua mineral y a partir de entonces sólo riego natural por lluvias. Las mezclas y los controles se dejaron en condiciones de campo

durante 13 meses. Las muestras se obtuvieron inmediatamente después de la preparación de las mezclas (01/05/05) (M1) y al final del experimento tras la recolección (01/06/2006) (M2). Una muestra compuesta por 10 sub-muestras fue tomada desde la superficie del suelo (8 cm de diámetro y 0–25 cm de longitud) de cada uno de los lisímetros.

En la Tabla 4.2 se presentan las características químicas iniciales de las mezclas y del material mineral. Los valores corresponden a la media de las 4 réplicas.

Tabla 4.2. Características físico-químicas iniciales de las mezclas lodo-suelo residual y de los controles

Lodo	Origen	pH	CE* dS m ⁻¹	MO %	N %	C/N	P mg/kg	T.F ^a %	E.G ^b %	CaCO ₃ %	Cal Activa ‰	Arena %	Limo %	Arcilla %
<i>Residuo mineral de trituración</i>														
Control		8,9	0,20	0,47	0,05	5,1	5,8	14,0	86,0	63,6	53,0	54,8	22,6	22,4
Compostado	Blanes	8,0	0,87	1,86	0,16	6,9	69,3	19,0	81,0	69,4	56,4	58,8	21,5	19,5
	Manresa	8,4	0,50	1,44	0,08	10,1	40,8	29,8	70,2	75,6	64,7	64,1	20,2	15,5
	Vilaseca	8,4	0,52	1,58	0,12	7,4	54,5	27,8	72,2	65,3	67,2	56,6	20,8	22,5
Térmico	Sabadell	8,4	0,31	1,03	0,09	6,8	19,5	17,3	82,7	72,5	59,5	57,1	21,4	21,3
	Mataró	8,4	0,29	2,71	0,16	9,9	40,0	28,4	71,6	64,8	76,6	55,3	21,3	23,3
	Besós	8,2	0,40	1,65	0,11	8,8	32,0	14,9	85,1	73,6	50,9	59,5	20,8	19,6
<i>Residuo mineral de extracción</i>														
Control		8,5	0,47	0,81	0,06	8,6	5,8	38,1	61,9	39,3	33,8	42,5	37,0	20,4
Compostado	Blanes	8,0	1,07	1,84	0,15	8,2	50,5	35,9	64,1	39,6	37,6	44,2	35,2	20,5
	Manresa	8,1	0,90	1,63	0,10	9,4	45,8	32,1	67,9	47,1	55,2	45,6	34,3	19,9
	Vilaseca	7,9	0,98	2,43	0,22	6,4	100,8	25,2	74,8	32,1	32,6	38,8	36,2	25,5
Térmico	Sabadell	8,3	0,72	1,20	0,08	9,2	10,3	43,7	56,3	44,1	37,7	51,0	31,6	17,3
	Mataró	8,1	0,54	2,93	0,16	10,6	49,3	41,3	58,7	27,0	28,6	38,5	41,3	20,1
	Besós	8,2	0,50	1,88	0,12	8,9	34,8	34,0	66,0	40,9	41,3	46,2	33,9	19,8

*CE: conductividad eléctrica (1:5) a 25°C

^a T.F: Tierra fina; ^b E.G: Elementos gruesos

4.3.5 Mediciones analíticas de los substratos de restauración

Las muestras tomadas en M1 y M2 (con excepción de las réplicas que se tomaron en M2 especialmente para evaluar el efecto del secado al aire) fueron secadas al aire, tamizadas a través de un tamiz de 2 mm y almacenadas a temperatura ambiente. Las técnicas utilizadas en la determinación de COE, CHT, CHE, CBM, RB y actividades β-glucosidasa y β-galactosidasa fueron las mismas que las descritas en el apartado 3 sección 3.3.4. Con los resultados obtenidos en cada muestreo se pudo calcular el **coeficiente**

de mineralización del carbono (CMC) ($C-CO_2/C$ orgánico) (Dommergues, 1960), parámetro que indica la fracción de la fracción de C orgánico del suelo que está siendo mineralizado en un tiempo, t , determinado; la relación **C microbiano/C orgánico (Cmic/Corg)** (Anderson y Domsch, 1989) que nos indica que parte del C orgánico corresponde al C que forma parte de la biomasa microbiana; y el **cociente metabólico microbiano (qCO₂)**, definido como la relación entre la respiración basal y la biomasa microbiana, propuesto por Anderson y Domsch (1985) como un buen indicador de la fracción metabólicamente activa de los microorganismos del suelo.

El análisis de **aminoácidos totales (AA)** en los hidrolizados de las diferentes mezclas lodo-suelo residual y en los controles se determinó por HPLC (con columnas no convencionales) con derivatización AQC (Cohen y Michaud, 1993). Los aminoácidos se encuentran en los lodos como tales o formando parte de macromoléculas más o menos complejas. En consecuencia antes del análisis cromatográfico, debe realizarse una hidrólisis que permita liberar los aminoácidos (aminoácidos constituyentes de macromoléculas y aminoácidos libres) presentes en las mezclas lodo-suelo residual. El método de hidrólisis es una metodología que ha sido puesta a punto en la sección de cromatografía del Instituto Químico de Sarriá (IQS) de Barcelona (URL) para el análisis tanto de aminoácidos libres como totales, en suelos y en lodos. 5 g de muestras, previamente secadas a 105°C, fueron hidrolizadas con HCl 6N sometidas a reflujo a 110 ° C durante 8 horas. El hidrolizado fue derivatizado con AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamato). La derivatización con AQC se basa en la reacción del grupo amino con AQC a pH 8,8. Se trata de una reacción muy rápida (aproximadamente 1 minuto), los derivados formados pueden detectarse por fluorescencia con un máximo de excitación a 250 nm y un máximo de emisión a 395 nm. El método de derivatización y de análisis cromatográfico de partida es el Método AccQ-Tag de Waters. Se ha sustituido el patrón interno α -aminobutírico por la Norleucina, debido a que se ha comprobado que aquel patrón da problemas de repetitividad en el análisis de aminoácidos de diferentes hidrolizados (Lliberia 1996, citado por Mejía 2005). Los aminoácidos derivatizados fueron separados por HPLC en Columna Nova-Pak C18 ya que de acuerdo a los resultados de Mejía (2005), los resultados son equivalentes a los que se obtienen con la columna AccQ-Tag (Waters Co., Milford, MA, USA) y se reduce el tiempo de separación a 15 minutos. Los cromatogramas se procesaron utilizando el software adecuado. Las concentraciones de aminoácidos individuales se calcularon a partir del área mediante curvas de calibrado de cada AA con una solución estándar (0,1–10,0 pmol/l).

4.3.6 Pre-tratamiento de las muestras

El efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento se estudió en las muestras finales (M2) y en sólo una de las cuatro réplicas de cada uno de los tratamientos; por este motivo los resultados promedios de los tratamientos pueden no coincidir con los resultados de una de las réplicas.

Pretratamiento 1) suelo seco al aire

Para ensayar el efecto del secado al aire sobre CBM, RB, EPR y actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa, los valores de esos parámetros se determinaron sobre muestras secadas al aire durante una semana a temperatura ambiente y los resultados fueron comparados con los valores obtenidos en las muestras a humedad de campo. Las muestras a humedad de campo fueron conservadas a 4° C hasta el momento de tamizarlas. Luego del tamizado nuevamente fueron conservadas a 4° C hasta el momento de realizar cada una de las determinaciones.

Del mismo modo que en los suelos naturales, las determinaciones del CBM y de la RB sobre muestras a humedad de campo y sobre muestras secas al aire fueron realizadas luego de ajustar la humedad del suelo al 60% de su capacidad de campo (CC) e incubarlas durante 7 días en la oscuridad a 28°C. Durante ese periodo de incubación se determinó la EPR. Los valores obtenidos fueron comparados con aquellos obtenidos en las muestras a humedad de campo.

Pretratamiento 2) secado al aire y rehumedecimiento

Para ensayar el efecto del secado al aire y rehumedecimiento sobre las actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa, las muestras de suelo secas al aire fueron rehumedecidas al 60% CC e incubadas durante 7 d en oscuridad a 28 °C. Los valores obtenidos fueron comparados con aquellos obtenidos en las muestras a humedad de campo.

4.3.7 Análisis estadístico de los datos

Los valores de cada parámetro corresponden a la media aritmética de las cuatro réplicas. Utilizamos modelos lineales generales (GLM) para evaluar la influencia de tres factores principales fijos (tipo de lodo, tipo de suelo residual y tiempo de muestreo) sobre los parámetros considerados. En el análisis estadístico sobre los efectos del pre-tratamiento también se utilizaron modelos GLM para evaluar la influencia de dos factores fijos (pre-tratamiento y tipo de suelo) sobre los parámetros estudiados (en este caso las muestras se tomaron de un solo lisímetro). Los datos fueron analizados utilizando el programa Sistema de Análisis Estadístico (SAS), y el procedimiento GLM fue llevado a cabo usando el análisis de la varianza (SAS, 1990). Cuando la interacción de los tres factores fue significativa, indicando que el efecto de un factor depende de los niveles de los otros factores, analizamos las diferencias entre los valores a través de uno de los factores para los distintos niveles de los otros. La comparación de medias se realizó según procedimiento SNK (Student-Newman-Keuls a nivel de $\alpha=0,05$). En las muestras finales se calcularon los coeficientes de correlación entre las medias de los diferentes parámetros físicos, químicos y bioquímicos.

Del mismo modo y con el mismo objetivo que fue realizado en el apartado 3 sección 3.3.6, seguimos el procedimiento propuesto por Zornoza *et al.* (2006) y evaluamos la pendiente obtenida de regresiones lineales simples entre secado al aire o secado al aire más rehumedecimiento y muestras a humedad de campo sobre las actividades enzimáticas.

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1. Efectos generales

El análisis de la varianza de los distintos parámetros estudiados (Tablas 4.3 y 4.4) muestra que el tipo de lodo, el tipo de suelo residual y el periodo de muestreo tuvieron, con algunas excepciones, efectos significativos sobre estos parámetros y que el suelo residual fue el factor que tuvo menor influencia sobre los parámetros bioquímicos. En particular, podemos observar que el **pH**, **COE**, **CHT** y **CHE** fueron los parámetros más globalmente afectados por los tres factores. El **CBM**, **RB**, **qCO₂**, **GLU** y **GAL** no fueron afectados por el tipo de suelo residual.

Con muy pocas excepciones, los parámetros que se vieron afectados significativamente por el tipo de suelo residual tenían valores más altos en las mezclas con suelo **E** que con suelo **T** (Tabla 4.5 y 4.6). En general, la adición de lodos incrementó significativamente los valores de los parámetros en ambos tipos de suelos residuales y estos efectos disminuyeron con el tiempo.

Tabla 4.3. Tabla de ANOVA muestra los valores F de pH, Conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO) y Nitrógeno total (N) en las mezclas suelo-lodo.

	pH	CE	MO	N
Suelo Residual (R)	109,42 ^{***}	38,97 ^{***}	36,34 ^{***}	28,12 ^{***}
Lodos (LD)	23,83 ^{***}	13,74 ^{***}	33,0 ^{***}	37,93 ^{***}
Muestreo (M)	92,66 ^{***}	210,76 ^{***}	11,18 ^{**}	2,94 ^{ns}
R x LD	6,93 ^{***}	2,12 ^{ns}	2,42 [*]	6,57 ^{***}
R x M	5,64 [*]	38,06 ^{***}	2,35 ^{ns}	1,50 ^{ns}
LD x M	20,50 ^{***}	11,84 ^{***}	8,50 ^{***}	6,83 ^{***}
R x LD x M	8,19 ^{***}	0,74 ^{ns}	0,14 ^{ns}	1,89 ^{ns}

^{*}, ^{**} y ^{***} indican diferencias significativas al $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente, ns: no significativo.

Tabla 4.4. Tabla de ANOVA y valores F de carbono orgánico extraíble (COE), carbohidratos totales (CHT), y carbohidratos extraíbles (CHE), carbono de la biomasa microbiana (CBM), respiración basal (RB), cociente metabólico (qCO₂), Coeficiente de mineralización del C (CMC), actividades β-glucosidasa (GLU) y β-galactosidasa (GAL) en las mezclas.

	g.l	COE	CHT	CHE	CBM	RB	qCO ₂	CMC	GLU	GAL
Suelo Residual (R)	1	23,45 ^{***}	44,86 ^{***}	11,25 ^{**}	0,71 ns	2,65 ns	1,83 ns	5,56 [*]	0,01 ns	0,15 ns
Lodos (LD)	5	22,32 ^{***}	10,23 ^{***}	17,10 ^{***}	21,20 ^{***}	117,95 ^{***}	1,80 ns	138,55 ^{***}	51,63 ^{***}	13,85 ^{***}
Muestreo (M)	1	116,83 ^{***}	8,77 ^{**}	32,08 ^{***}	6,79 [*]	225,84 ^{***}	32,06 ^{***}	156,20 ^{***}	80,03 ^{***}	64,83 ^{***}
R x LD	5	11,92 ^{***}	1,36 ns	4,40 ^{**}	1,72 ns	1,82ns	0,69 ns	6,70 ^{***}	5,77 ^{***}	3,38 ^{**}
R x M	1	9,68 ^{**}	0,55 ns	4,76 [*]	0,96 ns	6,10 [*]	0,94 ns	0,26ns	0,08 ns	4,42 [*]
LD x M	5	18,69 ^{***}	3,71 ^{**}	9,31 ^{***}	13,56 ^{***}	131,41 ^{***}	6,03 ^{***}	108,09 ^{***}	5,33 ^{***}	8,87 ^{***}
R x LD x M	5	11,35 ^{***}	1,14 ns	4,49 ^{**}	2,74 ns	4,03 ^{**}	0,21 ns	6,08 ^{***}	10,30 ^{***}	3,86 ^{**}

^{**} y ^{***} indican diferencias significativas al P<0.05, P<0.01 y P<0.001, respectivamente, ns: no-significativo, g.l: grados de libertad.

4.4.2. Efectos sobre los parámetros físico-químicos

Los suelos residuales de minería sin tratar muestran bajos contenidos de materia orgánica (Tabla 4.2) y pobres propiedades físicas como se refleja en su desfavorable tamaño de partículas. La mejora producida por el agregado de lodos en el contenido de C y N del suelo disminuyó con el tiempo, pero siguió siendo significativa 13 meses después de la adición. Las pérdidas de materia orgánica de los lodos durante el experimento fueron generalmente más altas en las mezclas que contenían los lodos MT, BE y VL (Tabla 4.5). Dado que los lodos MT y BE son de secado térmico, estos resultados apoyan la hipótesis de Jiménez *et al.* (2007) quienes postulan que el secado térmico facilita la descomposición de la materia orgánica en los lodos de depuradora. Fernández *et al.* (2007) también encontraron que la adición al suelo de lodos de secado térmico normalmente da como resultado una mineralización más rápida de materia orgánica que la adición de lodos compostados. Podríamos inferir que la MO de los lodos deshidratados sufre una descomposición térmica durante el secado térmico y que esta descomposición hace que la materia orgánica sea más fácilmente degradable y por lo tanto más susceptible al ataque microbiano (Blazsó y Jakab, 1985). En el lodo VL, el único que había sido digerido aeróbicamente, las pérdidas más elevadas fueron probablemente debidas a que la materia orgánica de los lodos aeróbicos era más fácilmente degradable que la de los lodos anaerobios. Colin (1977), definió un índice de evolución de la fracción orgánica de los lodos a partir esencialmente de parámetros bioquímicos y enzimáticos (nivel de ATP y actividades celulolítica, amilásica y proteolítica), resultando de acuerdo a este índice más evolucionados los lodos digeridos anaeróbicamente que los estabilizados aeróbicamente. Saña (1985) determinó tasas de mineralización de C más bajas en los lodos anaeróbicos respecto a los lodos aeróbicos. Mattana *et al.* 2010, demostraron las diferencias en el contenido de materia orgánica fácilmente degradable entre los lodos de tratamiento aeróbico y anaeróbico mediante el estudio del grado de estabilidad de la materia orgánica y también encontraron que el lodo aeróbico era más fácilmente degradable.

La salinidad de las mezclas que contenían los lodos compostados fue inicialmente superior a las de las que contenían lodos de secado térmico como podría esperarse, debido principalmente a la pérdida neta de peso y a la liberación de sales solubles que se produce a través del proceso de mineralización que ocurre durante el compostaje (Fang y Wong, 1999). La disminución de la conductividad eléctrica observada en **M2** resultó de la lixiviación de sales que se produjo durante el experimento, como se ha podido comprobar por los valores de conductividad eléctrica que se encontraron en los primeros lixiviados, que oscilaban entre 1,1 y 5,4 dS m⁻¹ (datos no mostrados).

El valor del pH de los suelos residuales disminuyó por la incorporación de materia orgánica con los lodos (Tabla 4.5). La alcalinidad de las mezclas fue mayor al final del experimento. Según Noble y Randall (1999) los mecanismos que explican el aumento de pH del suelo a mediano plazo debido a la adición de materia orgánica, incluyen (i) el consumo de protones durante la oxidación de aniones orgánicos, (ii) la presencia de condiciones reductoras debido a un aumento de la biomasa microbiana

durante la rápida descomposición, (iii) la adsorción de protones dentro de los sitios intercambio generados debido a la incorporación de materia orgánica, (iv) el desplazamiento del grupo hidroxilo de las superficies de los sesquióxidos por aniones orgánicos, (v) la adición de cationes básicos.

Tabla 4.5. Propiedades físico-químicas de los controles y las mezclas lodo-suelo residual (valores promedio de 4 repeticiones) en M1 y M2^(*).

Origen	Símbolo	Materia orgánica (%)		N (%)		pH		Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹)	
		M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
<i>Residuo mineral de Trituración (T)</i>									
Blanes	BL	1,9bA**	1,6aA	0,16aA	0,12aA	8,0cB	8,5abA	0,87aA	0,21bA
Manresa	MN	1,4bA	1,6aA	0,08bcB	0,12aA	8,4bB	8,5aA	0,50bA	0,20bB
Vilaseca	VL	1,6bA	1,2abB	0,12abA	0,10abA	8,4bB	8,6aA	0,92bA	0,24bB
Sabadell	SB	1,0bcA	1,0bA	0,09bcA	0,08bcA	8,4bB	8,6aA	0,31cdA	0,29aA
Mataró	MT	2,8aA	1,4abB	0,16aA	0,11aA	8,4bA	8,6aA	0,29cdA	0,23bA
Besos	BE	1,7bA	1,4abA	0,11bA	0,09abA	8,2bB	8,5aA	0,40cA	0,28aA
Control	T	0,5eA	0,5cA	0,05cA	0,05cA	8,9aA	8,4bB	0,20dA	0,23bA
<i>Residuo mineral de Extracción (E)</i>									
Blanes	BL	1,7bcA	1,7aA	0,15bA	0,14aA	8,0cdB	8,3cA	1,07aA	0,24bA
Manresa	MN	1,6cA	1,8aA	0,10cdB	0,12aA	8,1bcdB	8,4cA	0,90abA	0,26bB
Vilaseca	VL	2,4abA	2,1aA	0,22aA	0,16aB	7,9dB	8,3cA	0,98abA	0,37aB
Sabadell	SB	1,2cdA	1,6aA	0,08deA	0,08bA	8,3bA	8,2cA	0,72abA	0,22bB
Mataró	MT	2,9aA	1,9aB	0,16bA	0,12aA	8,1bcdA	8,3cA	0,54bA	0,18bB
Besos	BE	1,9bcA	1,7aA	0,12bcA	0,13aA	8,2bcB	8,6aA	0,50bA	0,21bB
Control	E	0,8dA	1,0bA	0,06eA	0,07bA	8,5aA	8,5bA	0,47bA	0,22bB

* M1: muestras obtenidas después de que se prepararon las mezclas; M2: muestras obtenidas al final del experimento después de la cosecha.

** Para cada parámetro, valores seguidos por la misma letra mayúscula no muestran diferencias significativas entre las fechas de muestreo según la prueba de SNK ($p < 0,05$). Para cada parámetro, valores seguidos por la misma letra minúscula en una misma columna no muestran diferencias significativas entre las mezclas según la prueba de SNK ($p < 0,05$).

4.4.3. Efectos generales sobre los parámetros biológicos

Tal como hemos comentado en 4.4.1, los parámetros que caracterizan la composición de la materia orgánica del suelo (COE, CHT y CHE, ver Tabla 4.4) fueron muy afectados por los tres factores estudiados. Jiménez *et al.* (2007), en un experimento de laboratorio de recuperación de suelos (100 a 200 Mg ha⁻¹ de lodos deshidratados, compostados o secados térmicamente, nueve meses de incubación a 25 ° C), también encontraron que CHT y CHE fueron los parámetros más afectados por el tipo de lodos agregados al suelo.

Nuestros resultados (Tablas 4.6 y 4.7) corroboran los incrementos de C orgánico extraíble, biomasa microbiana, contenido de carbohidratos y actividad biológica del suelo luego de la enmienda con lodos de depuradora, que habían sido observados por Eivazi y Zakaria, 1993; Moreno *et al.*, 1999; Debosz *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2002; Ros *et al.*, 2003; Usman *et al.*, 2004; García-Orenes *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2007. En **M2**, los valores de todos los parámetros biológicos, excepto **COE**, fueron mayores en las mezclas que contenían el suelo **T** que en los controles, sin embargo, en las mezclas que contenían el suelo **E** (excepto **RB**), no fueron por lo general significativamente diferentes de los controles (Tablas 4.7 y 4.8). Estas diferencias probablemente podrían ser atribuidas a la diferencia granulométrica de ambos residuos. El suelo **T** tiene una gran cantidad de elementos gruesos que le proporciona, un diámetro equivalente de poro grande y menor contenido de tierra fina que el suelo **E**, lo cual le confiere una capacidad de retención de agua por lo menos de 1,5 veces menor (R. Josa, comunicación personal), un crecimiento vegetal 50% menor (datos no mostrados); consecuentemente, podemos esperar menores cambios en la actividad biológica en las mezclas con el suelo **T**.

A excepción de los **CHT**, los valores de los parámetros biológicos de los suelos control fueron significativamente mayores en **M2** que en **M1** (Tabla 4.6). Por esta razón para estudiar la evolución de los distintos parámetros se consideró el efecto intensificador de los lodos sobre el suelo, es decir los valores de los parámetros de las mezclas divididos por los de los suelos control. Este aumento en los valores de los parámetros biológicos de los suelos control con el tiempo podemos atribuirlo probablemente a un evento de lluvia que se produjo poco antes del segundo muestreo. Este rehumedecimiento del suelo seco, en condiciones naturales, pudo haber promovido el aumento de la actividad enzimática, la biomasa microbiana y los componentes orgánicos del suelo solubles en agua (Pesaro *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007; Williams y Xia, 2009).

4.4.4 Cambios en el Carbono orgánico extraíble y en los Carbohidratos Extraíbles

Todos los tipos de interacciones (Tabla 4.4) fueron significativas para **COE** y **CHE**. Los incrementos respecto al control fueron de entre 3 y 36 veces para el **COE** y entre 2,5 y 26 veces para los **CHE** (mayores en las mezclas que contenían los lodos **MT**, **BE**, y **VL**). En general, el efecto intensificador observado después de la adición de lodos a los suelos residuales disminuyó entre 4 y 18 veces al final del experimento (Tabla 4.6). Estos resultados son similares a los expuestos por Ros *et al.*, (2003), quienes, en un experimento de campo de dos años (un año más de duración respecto a nuestra experiencia), en el cual agregaron 250 Mg ha⁻¹ (peso húmedo) de lodos deshidratados (50% humedad) a suelos degradados, encontraron que el efecto de los lodos sobre el contenido de C soluble en agua disminuyó 3,5 veces un año después de la aplicación.

Tabla 4.6. Valores de carbono orgánico extraíble (COE) y carbohidratos extraíbles (CHE) en los controles y en las mezclas lodos-suelo residual

Origen	Símbolo	COE (mg C kg ⁻¹)		CHE (mg glucosa kg ⁻¹)	
		M1	M2	M1	M2
<i>Residuo mineral de Trituración</i>					
Blanes	BL	176,3bcA**	167,5abA	111,8bcA	111,3aA
Manresa	MN	143,0bcA	143,3abA	76,5cdA	115,8aA
Vilaseca	VL	314,8bA	140,3bB	120,0bcA	95,3aA
Sabadell	SB	105,0bcA	155,5abA	54,0cdA	29,3cA
Mataró	MT	309,7bA	177,3abA	105,8bcA	107,7aA
Besos	BE	716,7aA	122,0bB	228,7aA	82,0abB
Control	T	19,8dB	66,3bA	8,8eB	35,0cA
<i>Residuo mineral de Extracción</i>					
Blanes	BL	264,5bcA	181,7abB	113,8bcA	94,5aA
Manresa	MN	211,3bcA	182,7abA	88,7cdA	92,5abA
Vilaseca	VL	780,0aA	214,3aB	219,4aA	92,8abB
Sabadell	SB	148,7bcA	148,3abA	78,5cdA	83,0abA
Mataró	MT	669,5aA	208,8abB	201,3aA	129,8aB
Besos	BE	369,8bA	187,5abA	181,3abA	109,3aA
Control	E	44,3dB	162,3abA	30,0eB	84,0abA

*M1: muestras obtenidas después de que se prepararon las mezclas; M2: Las muestras obtenidas al final del experimento después de la cosecha. **nd: no detectado. *** Para cada parámetro, valores no seguidos por la misma letra mayúscula muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las fechas de muestreo. Para cada parámetro, valores no seguidos por la misma letra minúscula muestran diferencias significativas entre las mezclas según la prueba de SNK ($p < 0,05$).

En **M1**, los valores de **COE** y **CHE** fueron en general menores en las mezclas que contenían los lodos MN y SB, independientemente del tipo de suelo residual utilizado en la mezcla. Dado que el COE y los CHE están claramente asociados a la materia orgánica lábil, los bajos valores iniciales de estos parámetros en las mezclas con el lodo SB, diferente al resto de lodos térmicos y único lodo suministrado en forma de «pellets», podría ser atribuido a la resistencia física de los pellets a la descomposición, que hace que una gran parte del material no esté disponible para ser incorporado a la fase acuosa del suelo (Fernández *et al.*, 2007). Los menores valores encontrados en las mezclas con el lodo MN podría ser debidos a que este lodo fue, probablemente, de entre los tres lodos compostados, aquel en el cual el proceso de compostaje fue más eficaz en la estabilización de materia orgánica: de hecho es el lodo con el contenido de materia orgánica más bajo (Tabla 4.2). También se observó en ambos suelos residuales, que las mezclas con los lodos MT, BE y VL presentaron los mayores valores iniciales de COE y CHE; en los lodos MT y BE este hecho puede explicarse por el tratamiento térmico, que podría hacer los compuestos orgánicos más fácilmente degradables; en el lodo compostado de VL, los altos valores de estos

parámetros fueron probablemente debidos, como comentamos anteriormente, a la inestabilidad (que implicaría una mayor solubilidad) de la materia orgánica de los lodos aeróbicos.

Los valores de COE y CHE de las mezclas en general no cambiaron significativamente con el tiempo (Tabla 4.6), las excepciones más destacables fueron la de las mezclas con los lodos MT y VL en el suelo E cuyos valores fueron menores en **M2** que en **M1**. Estos resultados sostienen nuestra interpretación de los altos valores iniciales de COE y CHE encontrados en esas mezclas; que fueron, por otra parte, las que tuvieron la mayor pérdida relativa de materia orgánica (Tabla 4.5). Además, los valores de ambos parámetros en las mezclas BE-T fueron también significativamente menores en M2 que en M1. El COE y los CHE disminuyeron con el tiempo en las mezcla BE-E y aunque la disminución no fue estadísticamente significativa, fue claramente mayor que en las mezclas que contenían los lodos BL o MN. Recordemos que el lodo BE no había sido estabilizado por digestión.

Al final del experimento, con la única excepción de los valores de CHE en la mezcla de SB-T, no observamos diferencias significativas en los valores de COE y CHE entre los suelos tratados con los diferentes tipos de lodos, lo cual es compatible con la progresiva desaparición de la materia orgánica fácilmente degradable en las mezclas lodo-suelo residual.

4.4.5 Cambios en los Carbohidratos totales y en el C-Biomasa microbiana

El ANOVA para CHT y CBM (Tabla 4.4), muestra interacción significativa sólo entre el tipo de lodos y el período de muestreo y no entre tipo de lodo y tipo de suelo residual. En **M1**, los valores de los CHT en los suelos tratados con lodos fueron entre 1,5 y 4,5 veces mayores que sus respectivos controles. En contraste con lo observado en COE y CHE, el efecto intensificador del lodo en general disminuye solo ligeramente con el tiempo. El contenido de CHT en las mezclas que contienen los lodos BE o BL disminuye significativamente entre M1 y M2; el contenido de CHT en el resto de las mezclas no cambia con el tiempo (Tabla 4.7). Estos resultados confirman la estabilidad de los carbohidratos con el tiempo que hallaron Pascual *et al.* (1999) y Jiménez *et al.* (2007) en sus experimentos con mezclas de lodos y suelo. Pascual *et al.* (1999) plantean la hipótesis del origen microbiano de los CHT para explicar su estabilidad. Los carbohidratos son una fuente de carbono y energía para la población microbiana y también están estrechamente relacionados con la estabilidad estructural de los suelos. La participación de los carbohidratos en una función o en otra depende de su origen. Los carbohidratos de origen vegetal son predominantemente utilizados como fuentes de carbono y energía, mientras que los carbohidratos de origen microbiano predominantemente cumplen una función estructural y son más difíciles de mineralizar (Martens y Frankenberger, 1991).

En **M1**, los valores de **CBM** en las mezclas con los lodos BE y MT fueron 14,5 y 15,5 veces respectivamente superiores a los controles; en el resto de las mezclas estos valores fueron entre 2,5 y 5 veces superiores a sus respectivos controles (Tabla 4.7). En **M2** el efecto de los lodos sobre el CBM fue

claramente inferior que en M1 en todas las mezclas: sus valores fueron sólo de 1 a 2 veces más altos que los de sus controles. Estos resultados difieren ligeramente de aquellos obtenidos por Ros *et al.* (2003), quienes encontraron que, después de un año, el efecto de los lodos deshidratados sobre el contenido de CBM de los suelos control había disminuido cuatro veces; sin embargo, el contenido CBM inicial de sus suelos no tratados fue unas 15 veces más alto que el de nuestro experimento.

Las mezclas que contenían los lodos de secado térmico (con la excepción del lodo SB) tenían los valores iniciales más altos de CBM y los valores disminuyeron significativamente con el tiempo. Por el contrario, las mezclas que contenían los lodos compostados no cambiaron significativamente o aumentaron sus bajos valores iniciales de CBM. Las mezclas que contenían el lodo SB presentaron los menores contenidos iniciales de CBM, pero al final del período experimental, los valores de CBM en estas mezclas se incrementaron significativamente. Estos resultados muestran que CBM depende claramente del grado de madurez de la materia orgánica. El aumento inicial de CBM, luego de la aplicación de materia orgánica, está relacionado tanto con la entrada de carbono fácilmente disponible para el CBM original del suelo como a la incorporación de nuevo CBM desarrollada en los lodos que se agregaron al suelo (Perucci, 1992). Jiménez *et al.* (2007) también encontraron valores más altos de CBM después de agregar lodos de secado térmico a los suelos que después de agregar el mismo lodo, pero que había sido compostado en lugar de secado térmicamente. El comportamiento diferente de las mezclas que contenían el lodo SB, un lodo de secado térmico, se puede explicar (como ya hemos comentado anteriormente) teniendo en cuenta su presentación en forma de gránulos esféricos (pellets).

Tabla 4.7. Valores de C-Biomasa microbiana y Carbohidratos totales en los controles y en las mezclas lodos-suelo residual

Tipo de Lodo	C-Biomasa microbiana ($\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo)		Carbohidratos Totales (mg glucosa kg^{-1})	
	M1	M2	M1	M2
BL	194,04 bA	230,21 bcA	1515 bA	1142 aB
MN	138,13 bB	195,9 cdA	938 cdA	1117 aA
VL	192,77 bB	250,9 bA	1260 bcA	1153 aA
SB	106,54 bB	198,54 cdA	694 deA	748 bcA
MT	617,40 aA	300,4 aB	1212 bcA	961 abA
BE	565,31 aA	237,5 bcB	1880 aA	1310 aB
Control	39,54 bB	166,08 dA	441 eA	498 cA

M1: Muestreo inicial, M2: muestreo final. Para cada parámetro valores en una misma columna con letras minúsculas iguales no son significativamente diferentes según la prueba de SNK ($p < 0,05$). Para cada parámetro, valores en una misma fila con letras mayúsculas iguales no son significativamente diferentes según la prueba de SNK ($p < 0,05$).

4.4.6 Cambios en la respiración basal, en el coeficiente de mineralización y en el Cociente Metabólico

Todas las interacciones fueron significativas para la **RB** (Tabla 4.4). En **M1**, en el suelo **T** no se detectó **RB** (Tabla 4.8). En el suelo **E**, el aumento en la **RB** provocado por el agregado de lodos, que presentó los valores más altos en las mezclas que contenían los lodos **MT**, **BE** y **VL**, disminuyó claramente al final del período experimental.

Estos resultados probablemente pueden ser atribuidos a las fuentes de **C** lábil proporcionados con los lodos (especialmente **MT**, **BE** y **VL**) que son utilizados como sustratos fácilmente degradables por los microorganismos heterótrofos del suelo, como fuentes de carbono y energía. La utilización de esta forma de carbono depende principalmente del tamaño de la población microbiana (Carpenter-Boggs *et al.*, 2000) y la respiración se considera un indicador útil de la actividad microbiana del suelo (Anderson y Domsch, 1990). Por otra parte, algunos autores consideran que la respiración del suelo puede utilizarse como un índice de la estabilidad del **C** orgánico aplicado en la enmienda y por lo tanto de la cantidad de lodo que es posible aplicar a un suelo sin que este sufra alteraciones importantes en sus funciones (Ortiz y Alcañiz, 1994). La aplicación de lodos al suelo tiene un efecto doble sobre la respiración, por una parte la aumenta debido a que incrementa la disponibilidad de **C** orgánico y nutrientes, pero por otra parte puede disminuirla si contiene altos contenidos de metales pesados debido a su efecto tóxico sobre los microorganismos del suelo (Fliebbach *et al.*, 1994).

Al final del período experimental, la **RB** fue el único parámetro que presentó valores mayores en todas las mezclas (excepto en los suelos **T** tratados con los lodos **MT**, **BE** y **VL**), que en sus respectivos controles (Tabla 4.8). Es importante recordar que los lodos **MT**, **BE** y **VL** tienen probablemente el mayor contenido de materia orgánica fácilmente degradable. Considerando que las mezclas que contienen esos tres lodos tuvieron las mayores pérdidas relativas de materia orgánica (Tabla 4.5) y que la respiración del suelo esencialmente depende del contenido de materia orgánica fácilmente degradable, podríamos hipotetizar que después de un año, aunque la mayoría de la materia orgánica de los lodos ya había sido mineralizada, las mezclas aun contenían una fracción moderadamente lábil de materia orgánica. Ros *et al.* (2006), en un experimento de campo a largo plazo, no encontraron, al final del periodo controlado, diferencias significativas entre los valores de **RB** de los suelos fertilizados con lodos compostados y el suelo control, sin embargo, la dosis de aplicación de lodos en este experimento fue 10 veces menor que en nuestro experimento.

En **M1**, las mezclas que contenían los lodos **BL** o **MN** presentaron bajos valores de **RB** y esos valores no disminuyeron en **M2**. Fernández *et al.*, (2007) y Jiménez *et al.*, (2007) también encontraron que la disminución en la **RB** de suelos tratados con lodos compostados fue menor que la producida en suelos tratados con lodos térmicos.

En las mezclas que contenían el lodo SB, los valores de RB habían aumentado al final del experimento, lo que confirma una vez más que la materia orgánica en el lodo SB era inicialmente muy resistente a la descomposición. Muchos estudios muestran que en los primeros meses luego de la adición al suelo de lodos de depuradora, que presentaban un bajo contenido de metales pesados, se produce un aumento de la respiración del suelo (Ajwa y Tabatai, 1994), sin embargo, el efecto a largo plazo sobre la respiración del suelo no está claro. Boyle y Paul (1989), observaron que la emisión de CO₂ en suelos tratados con lodos era superior a la de suelos no tratados, incluso tres años después de la última aplicación de lodos. Sin embargo, otros estudios (Brendecke *et al.*, 1993; Ortiz y Alcañiz, 1994) concluyeron que no se podían observar diferencias entre la respiración de suelos tratados con lodos y suelos no tratados un año después de la última aplicación. Parte de este aparente desacuerdo puede ser explicado por la diferencia en la cinética de mineralización de los distintos materiales orgánicos contenidos en el lodo y por las distintas condiciones edafológicas y ambientales durante el proceso de descomposición (Brendecke *et al.*, 1993).

Tabla 4.8. Valores de Respiración basal (RB) y Coeficiente de mineralización del C (CMC) en los controles y en las mezclas lodos-suelo residual

Origen	Símbolo	RB ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}\text{suelo h}^{-1}$)		CMC ($\text{C-CO}_2 / \text{C org h}^{-1}$)* 10^{-1}	
		M1*	M2*	M1*	M2*
<i>Residuo mineral de trituración</i>					
Blanes	BL	0,799deA**	0,860abA	1,50 bA	1,94 bcA
Manresa	MN	0,821deA	0,809abA	1,37 bA	1,67 cdA
Vilaseca	VL	1,177deA	0,713bcB	1,96 bA	2,01 bA
Sabadell	SB	0,641efB	0,979abA	0,73 bB	2,00 bA
Mataró	MT	6,362bA	0,633bcB	5,50 aA	2,41 aB
Besos	BE	3,787cA	0,716bcB	5,42 aA	1,56 cdB
Control	T	nd***	0,406c	1,28 bA	0,22 fA
<i>Residuo mineral de Extracción</i>					
Blanes	BL	0,871deA	0,870abA	1,24bA	1,39 dA
Manresa	MN	0,602deB	0,909abA	1,21bA	1,96 bcA
Vilaseca	VL	1,565dA	0,847abB	1,76bA	1,09 eB
Sabadell	SB	0,343fB	0,608bcA	1,19bB	1,68 cA
Mataró	MT	8,219aA	0,695bcB	5,20aA	1,64 cdB
Besos	BE	1,744dA	1,159aA	4,60aA	1,61 cdB
Control	E	0,182gB	0,383dA	1,24bA	1,60 cdA

* M1: muestras obtenidas luego de la preparación de las mezclas; M2: muestras obtenidas al final del experimento después de la cosecha.

Para cada parámetro, valores en una misma columna seguidos por la misma letra minúscula no muestran diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de SNK ($p < 0.05$). Valores en una fila seguidos por la misma letra mayúscula no muestran diferencias significativas entre períodos de muestreo según la prueba de SNK ($p < 0.05$). *** nd: no detectado

En el análisis de ANOVA presentado en la Tabla 4.4 podemos observar que todos los tipos de interacciones fueron significativos para el CMC.

El Coeficiente de mineralización del C (CMC) que relaciona el CO₂, producto de la respiración, con el contenido de carbono orgánico, nos puede dar una idea de la naturaleza de la materia orgánica. La mineralización de la materia orgánica del suelo está gobernada por varios procesos simultáneos: (1) desestabilización vía oxidación/hidrólisis, desorción y difusión y (2) tamaño, composición de la comunidad y actividad metabólica de la biomasa microbiana (Ekschmitt *et al.*, 2005; Fontaine y Barot, 2005). La materia orgánica disuelta es una fracción sobre todo importante en el pool de la materia orgánica del suelo. Se piensa que los sustratos deben pasar por la fase disuelta para alcanzar y pasar por membranas microbianas (Marschner y Kalbitz, 2003).

En **M1** (Tabla 4.8), el tipo de residuo no tuvo efectos significativos sobre el CMC, y en ambos suelos residuales, las mezclas que contenían los lodos BE y MT presentaron los mayores valores de CMC, y fueron inferiores y similares entre ellos los valores registrados para el control y para las mezclas con los lodos compostados (BL, MN y VL).

En **M2** los mayores valores de CMC se obtuvieron en la mezcla con el lodo MT y el residuo T y los valores de CMC en las mezclas con los lodos MT, SB y VL obtenidos sobre residuo de trituración fueron significativamente superiores a los obtenidos sobre residuo de extracción.

Los materiales de trituración son los que tienen proporciones significativamente superiores de elementos gruesos (> 2 mm Ø), carbonatos totales, cal activa y arena. Los suelos ricos en caliza activa facilitan la mineralización de los materiales orgánicos (Saña *et al.*, 1996). En el caso de los residuos de extracción, las tasas de mineralización de C pueden estar afectadas por la protección que ocurre cuando la MO es adsorbida sobre la superficie de las partículas de arcilla y limo, o cuando es "incrustada" o recubierta por los minerales de arcilla (Tisdall y Oades, 1982; Golchin *et al.*, 1994) o cuando se localiza dentro de los microagregados, fuera del alcance de los microorganismos (Elliott y Coleman, 1988).

En M1 las mezclas de los lodos térmicos BE y MT con ambos suelos residuales y la mezcla del lodo compostado VL (el único que había sido digerido aeróbicamente) con el residuo E presentaron valores de CMC significativamente mayores que en M2. Estos resultados responden a la naturaleza de la materia orgánica fácilmente degradable, que provoca un aumento de la actividad respiratoria de la biomasa microbiana. El post-tratamiento de los lodos origina en el caso de los lodos de secado térmico y del lodo aeróbico, el aumento de compuestos orgánicos lábiles debido a la transformación de moléculas orgánicas complejas en moléculas más simples, por el contrario, durante el compostaje estos compuestos disminuyen. En los tratamientos con lodos compostados los efectos son menos intensos pero más perdurables en el tiempo de estudio. Fernández *et al.* (2007), encontraron que más del 25% del C orgánico proveniente de los lodos térmicos se mineraliza después de 60 días, mientras que en el caso de

los lodos compostados este porcentaje no supera el 3%. Enmerling *et al.*, (2000) y Pascual *et al.*, (2002), hallaron que el efecto estimulador del lodo compostado sobre la actividad microbiana de suelos degradados era menor pero más persistente que el de los lodos deshidratados. La población de microorganismos autóctonos metaboliza la fracción recalcitrante de materia orgánica, reproduciéndose lentamente, mientras que una población zimógena metaboliza la materia orgánica lábil y sólo se activa cuando el sustrato fresco está disponible y se inactiva una vez que el sustrato fresco se ha agotado (Winogradsky, 1949).

El análisis de ANOVA (Tabla 4.4) muestra que el tipo de suelo residual no tuvo efectos significativos sobre el **cociente metabólico (qCO_2)**, pero existió interacción significativa entre el tipo de lodo y el período de muestreo. Los valores de qCO_2 en general aumentaron con el agregado de lodos en ambos suelos (Figura 4.7), sin embargo el aumento solo fue significativo en el caso del lodo MT.

Pascual *et al* (1997), en un experimento de incubación de 360 días, observaron un fuerte aumento en qCO_2 en un suelo árido modificado con una cantidad de residuos sólidos municipales suficiente para elevar su materia orgánica en 1,5%. Estos mismos autores informaron de los valores más bajos de qCO_2 en un suelo tratado con compost estabilizado que en suelo modificado con material fresco.

Si consideramos que el qCO_2 ha sido utilizado como un indicador de estrés microbiano e interpretado como una medida de la energía necesaria para mantener la actividad metabólica en relación con la energía necesaria para sintetizar biomasa (Bardgett y Saggar, 1994), los valores tan altos encontrados en las mezclas con el lodo MT podrían deberse a la presencia de alguna sustancia tóxica que afecte el crecimiento microbiano y esté provocando un mayor nivel de estrés.

En todas las mezclas se observa una tendencia decreciente con el tiempo, pero más marcada en las mezclas con los lodos MT y VL. Es importante recordar en este caso que en las mezclas anteriormente mencionadas también se observó una importante disminución en el contenido de COE con el tiempo (Tabla 4.7). Estos resultados sugieren que la nueva biomasa microbiana se desarrolló mineralizando una gran cantidad de C orgánico agregado por unidad de C de biomasa. Nicholson y Wardle (1994), indican que los sustratos que se degradan rápidamente muestran una disminución en el qCO_2 a medida que desaparece el sustrato. En este sentido, los cambios observados en qCO_2 pueden estar relacionados principalmente con la mineralización de la materia orgánica (Selivanovskaya *et al.* 2001).

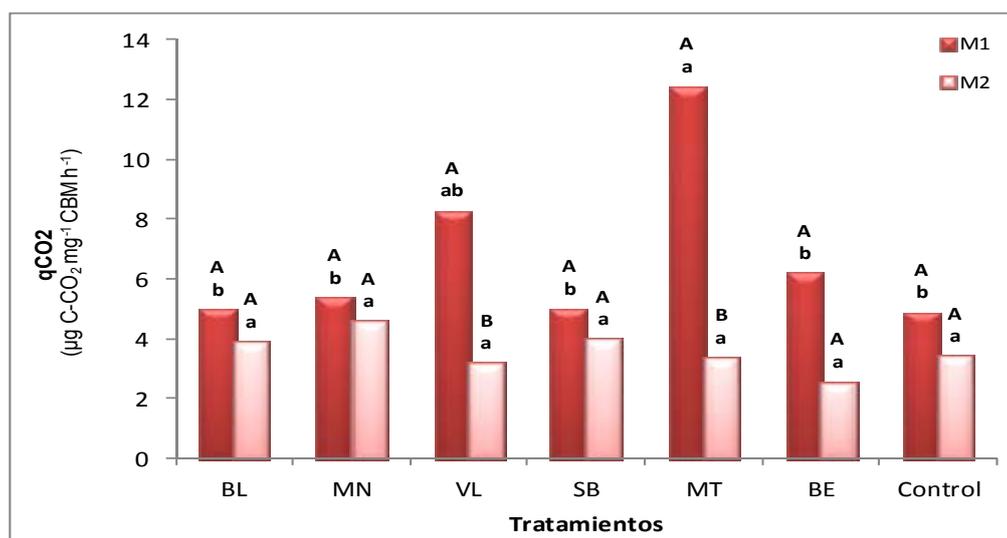


Figura 4.7. Valores de cociente metabólico en suelos control y en suelos enmendados con lodos en los dos períodos de muestreo (M1 y M2). Barras dentro de un mismo período de muestreo con la misma letra o letras minúsculas no muestran diferencias significativas entre los distintos tratamientos de acuerdo a la prueba de SNK ($P < 0.05$). Barras dentro de un mismo tratamiento con la misma letra mayúscula no muestran diferencias significativas entre períodos de muestreo de acuerdo a la prueba de SNK ($P < 0.05$).

4.4.7 Cambios en el N proteico

Un perfil cromatográfico representativo obtenido de los aminoácidos individuales utilizando el método HPLC se muestra en la Figura 4.8. El perfil corresponde a la mezcla MT-E, los perfiles obtenidos en las restantes mezclas son muy similares.

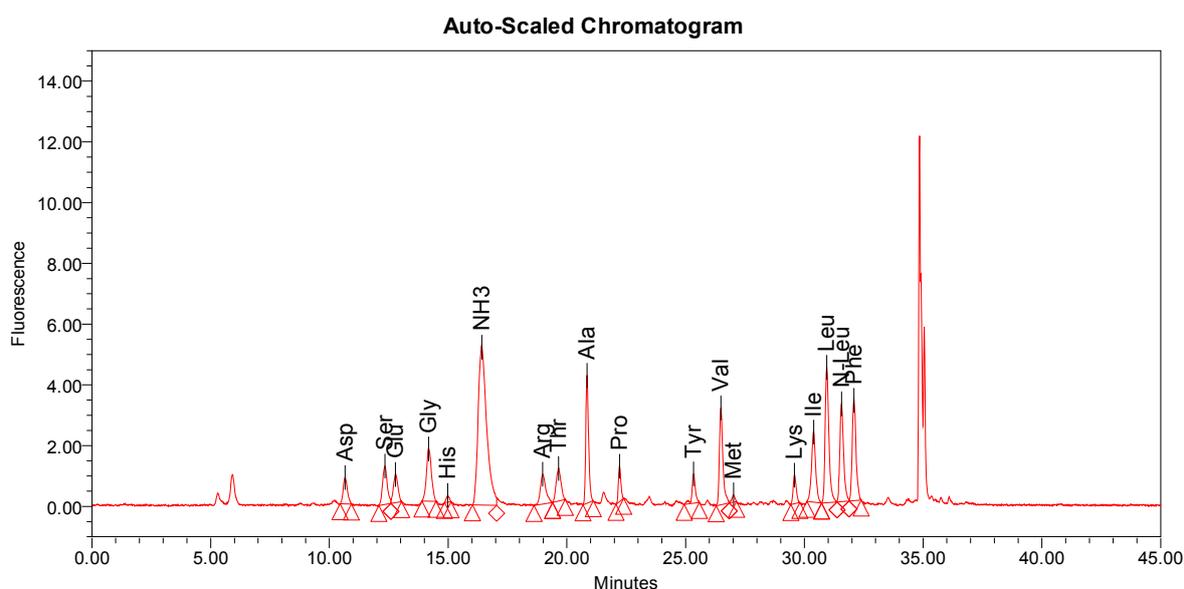


Figura 4.8. Perfil cromatográfico representativo de aminoácidos totales obtenidos de la mezcla MT-E. Asp asparagina más ácido aspártico, Ser serina, Glu glutamina más ácido glutámico, Gly glicina, His histidina, NH₃ amoniaco, Arg arginina, Thr treonina, Ala alanina, Pro prolina, Cys cisteína, Tyr tirosina, Val valina, Met metionina, Lys lisina, Ile isoleucina, Leu leucina, N-Leu norleucine, Phe fenilalanina.

En la Tabla 4.9 presentamos los valores de N-aminoácido y añadimos el resto de los parámetros para poder relacionarlos con comodidad.

El contenido total de aminoácidos de los suelos residuales fueron significativamente ($P < 0,05$) afectados por la incorporación de lodos. Los resultados obtenidos en el muestreo inicial (M1) de las mezclas lodos-suelo residual muestran que el **total de aminoácidos** varía entre 465 mg kg^{-1} suelo y 3252 mg kg^{-1} suelo, en cambio en los controles T y E los valores fueron 13 mg kg^{-1} suelo y 285 mg kg^{-1} suelo respectivamente. Estos resultados muestran que los lodos incorporados a los suelos residuales aumentan la cantidad de aminoácidos entre 67 y 450 veces respecto al control de trituración y entre 3,5 y 11,5 veces en el control de extracción. En general, los valores de los aminoácidos se incrementaron con los incrementos de C orgánico (Figura 4.9). Los mayores contenidos de aminoácidos en M1 se encontraron en las mezclas MT-T, MT-E, VL-E y BE-E, las cuales también presentaron los mayores contenidos de materia orgánica.

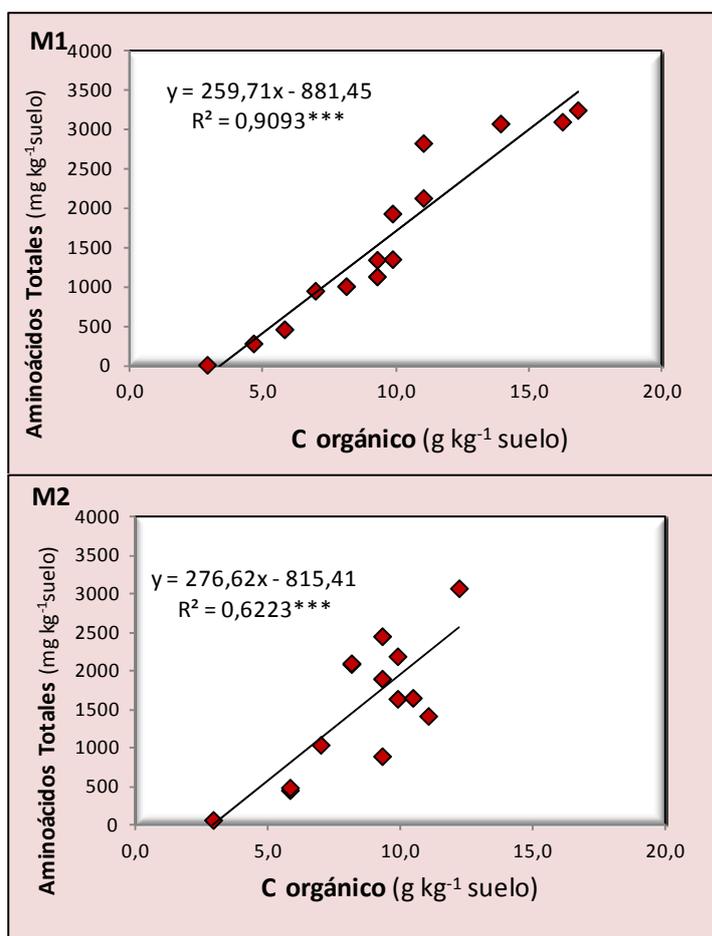


Figura 4.9. Relación entre los aminoácidos totales de la materia orgánica del suelo (muestras suelo residual-lodos y controles) y el carbono orgánico del suelo en (M1) muestreo inicial y en (M2) muestreo final. ** indica $P < 0,01$ y *** indica $P < 0,001$.

Tabla 4.9. Contenido de C orgánico, N orgánico y Aminoácidos totales, en suelos enmendados con lodos y en los controles en el muestreo inicial (M1) y al cabo de 13 meses (M2).

Suelos	C Orgánico (%)		N%		C/N		mg AA kg ⁻¹ suelo		μmol N-AA g ⁻¹ suelo		mg N-AA g ⁻¹ suelo		N-AA/N org (%)		N-AA/C org (%)	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
Residuo Trituración																
BL	1,08	0,89	0,16	0,12	6,9	7,7	2135,0bA	2454,1bA	21,4bA	25,0bA	0,299b	0,350b	18,7	29,1	2,71	3,77
MIN	0,84	0,91	0,08	0,12	10,1	7,7	1012,6cdB	1902,6cdA	9,8cB	19,6cdA	0,137cd	0,275cd	17,1	22,9	1,69	2,96
VL	0,92	0,68	0,12	0,1	7,9	7,0	1136,8cA	1044,3eA	11,2cA	10,8efA	0,146c	0,151e	12,2	15,1	1,57	2,17
SB	0,60	0,65	0,09	0,08	6,8	7,3	464,9deB	1165,0eA	4,6deB	12,2efA	0,065de	0,171e	7,2	21,3	1,12	2,94
MT	1,58	0,78	0,16	0,11	9,9	7,4	3104,7aA	2103,4cB	30,1aA	21,4cB	0,422a	0,299c	26,4	27,2	2,60	3,69
BE	0,96	0,77	0,11	0,09	8,8	9,0	1936,5bcB	2093,2cA	19,9bcB	21,5cA	0,265b	0,302c	24,1	33,5	2,69	3,71
T	0,27	0,31	0,05	0,05	5,2	5,8	13,0eB	69,3gA	0,1eB	0,6hA	0,002e	0,008g	0,4	1,7	0,06	0,29
Residuo Extracción																
BL	1,21	0,98	0,15	0,14	8,2	7,0	1356,9cB	1641,5dA	13,0cB	16,6dA	0,182c	0,233de	12,1	16,6	1,84	2,36
MIN	0,95	1,02	0,1	0,12	9,4	8,7	1348,7cB	1654,0dA	ND	16,9d	0,180c	0,237d	18,0	19,7	1,89	2,27
VL	1,42	1,22	0,22	0,16	6,4	7,6	3081,6aA	3076,4aA	29,6aA	31,3aA	0,415a	0,438a	18,9	27,4	2,98	3,59
SB	0,70	0,69	0,08	0,08	9,3	11,6	955,4dA	896,5eA	9,3cdA	8,8fA	0,130cd	0,123e	16,3	15,3	1,87	1,32
MT	1,70	0,91	0,16	0,12	10,6	9,2	3252,3aA	1419,1deB	31,9aA	13,0efB	0,447a	0,182e	27,9	15,1	2,66	1,65
BE	1,10	1,10	0,12	0,13	8,9	7,6	2832,9abA	2193,9bcB	27,1abA	22,3bcB	0,385ab	0,312bc	32,1	24,0	3,49	3,16
E	0,47	0,59	0,06	0,07	7,7	8,3	284,5deB	488,7fA	2,5eB	4,7gA	0,035e	0,066f	5,9	9,4	0,76	1,13

En cada parámetro y para cada período de muestreo, valores no seguidos por la misma letra minúscula muestran diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de SNK ($p < 0,05$).
En cada parámetro y para cada tratamiento, valores no seguidos por la misma letra mayúscula muestran diferencias significativas entre períodos de muestreo según la prueba de SNK ($p < 0,05$).

Los resultados expresados en moles en el muestreo inicial (**M1**) oscilaron entre 4,6 y 32 $\mu\text{mol N-AA g}^{-1}$ suelo en las mezclas lodo-suelo residual, los valores en los controles **T** y **E** fueron 0,1 y 2,5 $\mu\text{mol N-AA g}^{-1}$ suelo respectivamente (Tabla 4.9). En el muestreo final (**M2**), la cantidad de N-aminoácido osciló entre 8,8 y 31,3 $\mu\text{mol N-AA g}^{-1}$ suelo en las mezclas suelo residual-lodo, los valores en los controles **T** y **E** fueron 0,6 y 4,7 $\mu\text{mol N-AA g}^{-1}$ suelo respectivamente (Tabla 4.9). Los valores más altos fueron obtenidos en la mezcla VL-E y significativamente superiores al resto de las mezclas. El contenido total de N-aminoácido en las mezclas lodo-suelo residual se correlacionó significativamente ($P < 0,001$) con el contenido de C orgánico ($r = 0,86$) y con el contenido de N orgánico ($r = 0,82$) (Figuras 4.9 y 4.10 respectivamente). Aunque en ambos períodos de muestreo se observa una relación positiva y significativa del N-aminoácido con el contenido de C orgánico, podemos apreciar que la relación disminuye al final del período experimental (Fig. 4.9). Este hecho podría ser explicado por diferencias en el porcentaje de mineralización del N ocurridas en el período de estudio en las distintas mezclas lodo-suelo residual. Hattori y Mukay (1986), sugieren que las diferencias en la tasa de mineralización de N en distintos suelos enmendados con lodos estuvieron más relacionadas con el contenido de proteína cruda sobre la base de la materia orgánica total que el contenido de N orgánico.

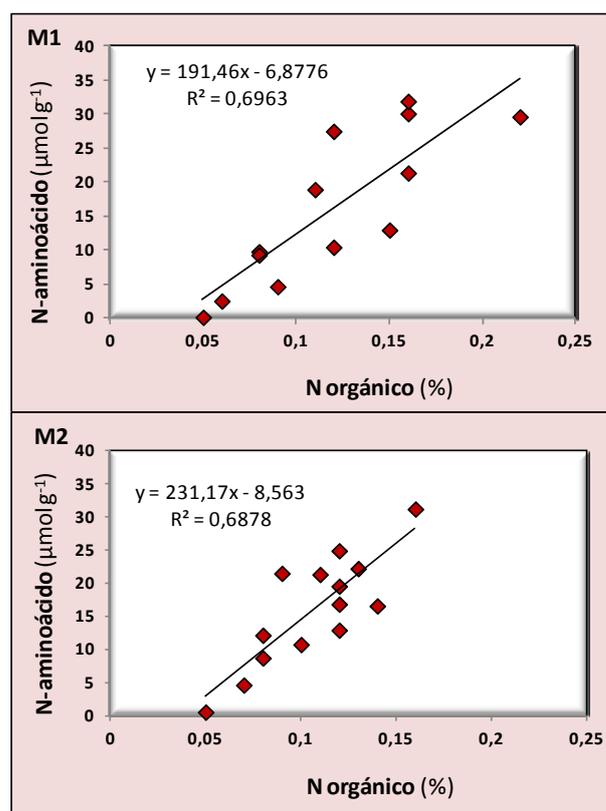


Figura 4.10. Relación entre el N aminoácido y el nitrógeno orgánico total (N) en las mezclas lodo-suelo residual y en los controles en (**M1**) muestreo inicial y en (**M2**) muestreo final. ** indica $P < 0,01$ y *** indica $P < 0,001$.

Los valores de **N-aminoácido, expresado como porcentaje del N orgánico total** en las mezclas osciló entre 7,2% en la mezcla SB-T y 32% en la mezcla BE-E en el muestreo inicial y entre 15,1 % en la mezcla VL-T y MT-E y 33,5% en la mezcla BE-T en el muestreo final. En los controles estos valores fueron 0,36% en el control **T** y 5,9% en el control **E** en el muestreo inicial y entre 1,7% en el control **T** y 9,4% en el control **E** en el muestreo final (Tabla 4.9).

Los niveles de N orgánico y de proteína parecen estar vinculados al proceso de tratamiento de aguas residuales que genera cada tipo de lodo (Hattori y Mukai, 1986). En el muestreo inicial, las mezclas realizadas con lodos de secado térmico (excepto el lodo térmico Sabadell) presentaron mayores valores de N-aminoácido (expresado como porcentaje del N orgánico total) que los lodos compostados. Las mezclas con lodos compostados (BL, MN y VL) presentan un menor % de N-AA como % del N orgánico total.

Estos resultados son coherentes con los resultados obtenidos por Mejía (2005), quien observó que en los lodos de secado térmico el contenido de aminoácidos totales es prácticamente el mismo que en el lodo deshidratado, lo que implica que no hay pérdida de aminoácidos durante el tratamiento térmico. En cambio, el compostaje del lodo reduce aproximadamente un 50% el contenido de aminoácidos totales respecto al lodo deshidratado, como consecuencia de la degradación de aminoácidos y proteínas durante el proceso. Durante el proceso de compostaje del lodo tiene lugar una mayor degradación peptídica /proteica hacia un material inorgánico (nitritos, nitratos amonio) como consecuencia de la acción de los microorganismos involucrados en dichos procesos.

El análisis estadístico muestra que el contenido de N-aminoácido en las mezclas MT-T, MT-E y BE-E disminuyó significativamente al cabo de 13 meses (Tabla 4.9). De acuerdo con Hall (1984), la mineralización del N está controlada por el grado de estabilidad de la materia orgánica. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos deducir que la mayor mineralización del N-aminoacídico que se produce en las mezclas MT-T, MT-E y BE-E se debe a sus mayores contenidos de materia orgánica fácilmente degradable. En la mezcla VL-E, el contenido de N-aminoácido no varió con el tiempo, quizás porque la materia orgánica es menos lábil que en el lodo MT. Tarrasón *et al.* (2007), observaron que el lodo secado térmicamente genera mayores concentraciones de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ en el suelo que los lodos compostados, lo que indica una mineralización inicial más intensa y una abundancia de sustancias orgánicas de nitrógeno lábiles.

En ambos controles y en mezclas MN-T, SB-T, BE-T, BL-E y MN-E el contenido de N-proteico aumentó al cabo de un año. Este aumento puede atribuirse a la liberación de diversas proteínas, péptidos y aminoácidos al suelo por parte de las plantas y los microorganismos a través de la exudación activa o a la muerte de las células (Rillig *et al.*, 2007), que en este caso superó la disminución debido a la mineralización

Distribución relativa de 17 aminoácidos hidrolizables en el suelo

La composición de aminoácidos (Tabla 4.10) fue bastante similar en todas las mezclas lodos-suelo residual, en ambos períodos de muestreo. Las diferencias más marcadas en el tiempo se observaron en las mezclas SB-T y MN-T en las cuales la proporción del aminoácido serina se duplicó. En los suelos control (muy diferentes entre sí en la composición de aminoácidos), se observa al final del período experimental un enriquecimiento en la composición de los aminoácidos. En el suelo **T**, en el muestreo final se observa la presencia de los aminoácidos Pro, Ile y Phe, y en el suelo **E**, los aminoácidos Arg, Thr y Tyr, que no fueron detectados en el muestreo inicial.

En **M1** (Tabla 4.10) los aminoácidos glicina y alanina en las mezclas lodo-suelo residual, estaban presentes en mayor proporción y los valores de glicina oscilaron entre 11,1% en la mezcla BE-E y 17,5% en la mezcla SB-T y los de alanina entre 9,2% en la mezcla VL-T y 16,8% en la mezcla VL-E respectivamente. La leucina osciló entre 5% y 10% de los aminoácidos totales, seguido de lisina (1,6-10%) glutamina (0-10%), treonina (4-9%), serina (3,6-9%) y asparragina (5-8,5%). Los aminoácidos fenilalanina, isoleucina, valina y prolina oscilaron entre 4,4% y 7,3%. El porcentaje de los aminoácidos tirosina, arginina e histidina fue menor del 5% de los aminoácidos totales encontrados (Tabla 4.10). La mayor proporción de los aminoácidos glicina y alanina en los suelos residuales podría explicarse por diferencias en la estructura de comunidad microbiana del suelo, por ejemplo, la proporción de las bacterias a hongos, puede cambiar el patrón de aminoácidos microbianos. El ácido aspártico y asparragina y serina se encuentran en mayores concentraciones en las paredes celulares fúngicas, en cambio alanina y glicina son los principales componentes de las paredes celulares de las bacterias (Friedel y Scheller, 2002).

Tabla 4.10. Relación molar de cada aminoácido respecto al total de aminoácidos en los suelos enmendados y en los controles

Suelos	Asp*	Ser	Glu	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Cys	Tyr	Val	Met	Lys	Ile	Leu	Phe
Muestreo Inicial (M1)																	
<i>Residuo Trituración</i>																	
BL	6,4	7,4	8,2	14,0	0,8	3,7	7,2	11,7	5,7	nd	4,8	4,1	nd	10,3	5,7	4,9	5,0
MN	7,1	3,6	6,6	13,5	0,1	4,5	8,2	14,3	7,0	nd	2,4	7,3	0,1	2,8	6,3	9,8	6,5
VL	5,6	8,8	9,7	14,1	1,4	3,5	3,8	16,8	4,9	nd	1,9	7,2	nd	2,5	4,7	9,7	5,6
SB	7,1	4,1	0,0	17,5	nd	5,0	9,2	14,3	6,8	nd	3,1	7,3	nd	2,2	6,5	9,9	7,0
MT	6,6	7,4	8,8	13,5	1,2	4,4	7,9	11,4	6,2	nd	3,8	6,1	1,3	3,1	5,0	8,3	5,3
BE	6,9	7,8	10,8	12,2	1,2	4,4	7,2	11,3	7,1	nd	2,9	6,0	0,6	4,2	4,9	8,2	4,6
T	nd**	nd	nd	nd	nd	nd	nd	60,4	nd	nd	nd	30,8	nd	nd	nd	8,7	nd
<i>Residuo Extracción</i>																	
BL	6,8	9,1	9,0	13,7	0,7	3,2	5,8	13,8	6,1	nd	1,7	7,0	0,0	2,9	5,7	9,0	5,7
MN	ND***	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VL	7,4	6,9	10,1	14,9	0,8	3,2	6,9	14,9	6,0	nd	2,4	6,4	0,5	2,9	4,5	7,6	4,4
SB	5,3	7,6	4,9	16,6	0,0	4,8	6,8	14,3	6,5	nd	2,3	7,2	0,0	1,6	5,2	9,8	7,2
MT	8,3	8,1	9,5	11,9	0,7	4,8	5,8	12,2	6,1	nd	2,8	6,6	0,8	4,3	4,7	8,4	4,9
BE	7,2	8,0	9,3	11,1	0,9	4,3	5,8	11,7	6,4	3,9	2,4	6,4	1,2	4,2	4,5	8,3	4,6
E	13,1	14,1	10,5	11,1	nd	nd	nd	17,3	8,2	nd	nd	7,6	nd	2,1	3,3	8,6	4,1
Muestreo Final (M2)																	
<i>Residuo Trituración</i>																	
BL	7,3	9,1	8,9	13,1	0,2	6,4	6,9	12,5	6,0	nd	2,6	6,6	nd	3,6	4,4	7,9	4,4
MN	6,4	9,2	8,3	16,0	nd	6,5	6,8	12,2	6,1	nd	2,2	6,3	nd	3,5	4,4	7,7	4,4
VL	4,1	9,8	7,3	16,9	nd	6,5	5,6	13,3	6,0	nd	3,3	6,6	0,2	3,2	4,5	8,1	4,6
SB	5,4	9,1	8,3	14,5	nd	7,7	7,2	10,5	6,7	nd	2,6	6,7	nd	4,1	4,7	8,2	4,4
MT	4,9	8,6	7,2	13,3	0,8	6,3	8,4	10,0	8,1	nd	3,2	6,9	0,7	3,6	4,8	8,3	5,0
BE	6,7	9,1	9,0	14,8	0,3	6,6	6,5	11,1	6,3	nd	2,6	6,3	nd	3,9	4,6	7,8	4,3
T	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	34,5	12,9	nd	nd	14,2	nd	nd	7,3	17,4	13,7
<i>Residuo Extracción</i>																	
BL	6,3	10,1	8,2	16,9	nd	5,4	5,9	12,3	6,4	nd	2,5	6,5	nd	3,5	4,3	7,6	4,1
MN	6,2	9,3	8,2	16,6	nd	6,0	6,4	12,2	6,4	nd	2,7	6,4	nd	3,5	3,9	7,8	4,4
VL	5,5	7,9	7,9	15,4	0,8	5,5	7,6	13,0	7,5	nd	2,3	6,7	0,4	3,0	4,4	7,4	4,6
SB	6,1	9,4	7,1	15,9	nd	3,8	6,2	14,3	7,1	nd	2,4	6,3	nd	3,3	4,0	8,6	5,4
MT	10,7	7,0	11,4	14,2	0,3	2,2	4,2	10,3	4,9	nd	2,6	7,0	nd	4,0	5,2	10,2	5,9
BE	6,9	9,4	8,6	16,1	1,0	5,4	6,2	10,8	6,8	nd	3,0	6,0	nd	3,7	4,1	7,6	4,3
E	7,6	8,7	4,7	18,2	nd	2,7	5,9	14,0	7,6	nd	3,3	6,6	nd	3,1	3,9	8,4	5,5

* Asp asparagina más ácido aspártico, Ser serina, Glu glutamina más ácido glutámico, Gly glicina, His histidina, NH₃ amoniaco, Arg arginina, Thr treonina, Ala alanina, Pro prolina, Cys cisteína, Tyr tirosina, Val valina, Met metionina, Lys lisina, Ile isoleucina, Leu leucina, N-Leu norleucina, Phe fenilalanina.

** nd: no detectado. *** ND: no determinado

4.4.8 Cambios en las actividades enzimáticas β -glucosidasa y β -galactosidasa

Se encontraron interacciones significativas entre los tres factores estudiados para ambas actividades enzimáticas (Tabla 4.4). En **M1**, los valores de la actividad β -glucosidasa en las mezclas que contenían el lodo BE fueron 8 y 29 veces mayores que las de sus correspondientes controles **E** y **T** respectivamente (Tabla 4.11); la actividad en el resto de las combinaciones lodo-suelo residual fue entre 1 y 6 veces más alta que en sus respectivos controles. En **M2** la actividad β -glucosidasa en las mezclas que contenían el suelo **E** disminuyó de una a tres veces con respecto al control; sin embargo el efecto de los lodo sobre la actividad β -glucosidasa en las mezclas lodos-suelo **T** fue incrementado entre 1,6 y 10 veces respecto al control, excepto en la mezcla BE-T, en la cual dicha actividad enzimática disminuyó con el tiempo (Tabla 4.11). En **M1**, no se detectó actividad β -galactosidasa en los suelos residuales.

Dado que al inicio del experimento, los valores de las actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa en los suelos residuales fueron bajos o nulos, la actividad enzimática inicial medida en los diferentes tratamientos estaría dada, en su mayor parte, por la contribución directa de enzimas en los diferentes lodos.

Excepto en la mezcla BE-T, todos los suelos **T** y **E** tratados tenían mayor actividad β -glucosidasa y β -galactosidasa en **M2** que en **M1** (Tabla 4.11). Dado que en nuestra experiencia, realizada en condiciones de campo y con siembra inicial donde se estimulan el desarrollo de una cubierta vegetal, estos aumentos probablemente indican que estas actividades enzimáticas estaban parcialmente asociadas a exudados radiculares generados por la vegetación y a los residuos de plantas, tal como refieren otros autores (Hayano y Tubaki, 1985; Bandick y Dick, 1999, García *et al.*, 2005, Hernández *et al.*, 2007; Martínez-Iñigo *et al.*, 2009). Sin embargo, Jiménez *et al.* (2007) encontraron en incubaciones de laboratorio a corto plazo sin vegetación que la actividad β -glucosidasa de sus suelos enmendados con lodos disminuyó con el tiempo.

Los aumentos en la actividad enzimática registrados en el segundo muestreo en los suelos **E** tratados fueron menores que en los suelos **T** tratados; paradójicamente, el crecimiento vegetal fue mucho mayor en las mezclas que contienen el suelo **E**. Estos resultados sugieren que para la interpretación debe tenerse en cuenta otro factor como el régimen hídrico. Probablemente, la lluvia que se produjo poco antes del segundo muestreo podría haber sido la causa del mayor aumento de la actividad enzimática en el suelo **T**. Ya que el efecto del secado y rehumedecimiento fue mucho mayor en el suelo **T**, el cual debido a su textura más gruesa sufrió más intensamente los efectos previos de la sequía, y dado que la gran mayoría de reacciones químicas biológicas se producen en disolución, éstas podrían haber estado inhibidas por la falta de agua.

Las mezclas que contenían el lodo BE tuvieron generalmente las mayores actividades enzimáticas y fueron las únicas mezclas, en ambos suelos residuales, en las que las actividades de ambas enzimas disminuyeron con el tiempo (Tabla 4.11). Estos resultados indican que una parte de la actividad

enzimática se perdió junto con la materia orgánica que se mineralizó durante el experimento. Dado que el lodo BE era el único lodo que no había sido estabilizado por digestión y que por lo tanto presenta un mayor % de proteínas respecto a los sólidos totales, se puede inferir que las actividades de las enzimas β -glucosidasa y β -galactosidasa presentes en las mezclas en gran parte correspondían a las enzimas libres contenidas en la materia orgánica fácilmente degradable de los lodos (Burns, 1982; Bonmatí *et al.*, 2003). Sin embargo, también podemos asociar la actividad β -glucosidasa con la materia orgánica estabilizada, porque este parámetro fue (junto con los CHT) aquel en el cual el efecto potenciador de los lodos tuvo una menor disminución con el tiempo (de 29 a 14 en el suelo residual T y de 8 a 3,3 en el suelo residual E). Esta parte de la actividad enzimática correspondería a enzimas inmovilizadas en los coloides del suelo. Otros autores también han asociado la actividad β -glucosidasa a material húmico: Miller y Dick (1995) encontraron que la actividad β -glucosidasa fue altamente resistente a la temperatura; Moreno *et al.* (1999) y Jiménez *et al.* (2007) encontraron que cuanto más estable era el contenido de materia orgánica de los lodos, más duradera era la actividad β -glucosidasa de las mezclas.

Tabla 4.11. Valores de actividades β -glucosidasa (GLU) y β -galactosidasa (GAL) en los controles y en las mezclas lodos-suelo residual y su relación con el N-aminoácido (N-AA).

Suelos	GLU ($\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$)		GAL ($\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$)		GLU/N-AA ($\mu\text{mol pNF h}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{N-AA}$)		GAL/N-AA ($\mu\text{mol pNF h}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{N-AA}$)	
	M1*	M2*	M1	M2	M1	M2	M1	M2
<i>Residuo mineral de Trituración</i>								
BL	0,239cdB**	0,481cA	0,044bB	0,101aA	799	1376	147	289
MN	0,127cdB	0,565bcA	0,014bcB	0,102aA	927	2058	102	371
VL	0,165cdB	0,490cA	0,023bB	0,067abA	1129	3241	157	443
SB	0,073dB	0,496cA	0,026bB	0,099aA	1126	2906	401	580
MT	0,038dB	0,647bcA	0,008cB	0,095aA	90	2162	19	317
BE	1,451aA	0,906abB	0,137aA	0,057bB	5474	3004	517	189
T	0,050dA	0,063dA	nd	0,013c	2803	7599	nd	1568
<i>Residuo mineral de Extracción</i>								
BL	0,248bcB	0,460cA	0,046bB	0,066abA	1366	1976	253	284
MN	0,176bcB	0,650bcA	0,021bcB	0,087aA	ND	2748	ND	368
VL	0,497bcA	0,610bcA	0,062bA	0,080aA	1198	1394	149	183
SB	0,276cB	0,386cdA	0,016cA	0,046bA	2121	3146	123	375
MT	0,155cdB	0,393cdA	0,021bcB	0,063abA	347	2164	47	347
BE	0,679bA	1,075aA	0,118aA	0,124aA	1763	3448	306	398
E	0,086dB	0,320cdA	nd***	0,060ab	2436	4882	nd	915

* M1: muestras obtenidas luego de la preparación de las mezclas; M2: muestras obtenidas al final del experimento después de la cosecha. ** Valores en una misma columna seguidos por la misma letra minúscula no muestran diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de SNK ($p < 0.05$). Valores en una fila seguidos por la misma letra mayúscula no muestran diferencias significativas entre periodos de muestreo según la prueba de SNK ($p < 0.05$).

*** nd: no detectado. **** ND: no determinado

Actividades enzimáticas por unidad de N-aminoácido

El cociente entre el valor de la actividad enzimática y el N proteico es indicador del grado de pureza o inhibición de las actividades estudiadas.

Los valores de las actividades enzimáticas β -glucosidasa (**GLU**) y β -galactosidasa (**GAL**) se expresaron en relación con el N-aminoácido para cada mezcla de lodos-suelo residual (Tabla 4.11). Los valores de la relación **GLU/N-AA** fueron mayores en los suelos control que en las mezclas (excepto en la mezcla BE-T en M1). La misma tendencia se observó en la relación **GAL/N-AA** en **M2**.

En **M1** el valor más alto de ambas relaciones se obtuvo en la mezcla BE-T y los más bajos en las mezclas de los suelos residuales con el lodo MT. En la mezcla con el lodo MT los resultados obtenidos podrían indicar que las enzimas en dichas mezclas se encuentran inhibidas por algún tipo de sustancia del medio. La inactivación de las enzimas pueden deberse a la presencia de alguna sustancia inhibidora en el lodo. Tal como hemos inferido en el apartado 4.4.6 cuando hemos comentado los resultados de los coeficiente de mineralización y el cociente metabólico, las mezclas realizadas con el lodo MT fueron las que presentaron los mayores contenidos de MO, el mayor coeficiente de mineralización y un cociente metabólico también muy alto lo que nos sugiere la presencia de algun sustrato fácilmente disponible que actuaría inhibiendo la actividad enzimática. Este tipo de inhibición es reversible, hecho que se demuestra en los resultados obtenidos en **M2**, donde la relación **GLU ó GAL/N-AA** se ve incrementada, ya sea por eliminación del inhibidor o por un cambio conformacional.

Las mezclas con lodos compostados presentaron una menor relación actividad enzimática/N-AA respecto a los lodos térmicos. Teniendo en cuenta que no se observan en M2 diferencias significativas en los valores de actividades enzimáticas y en el contenido de aminoácidos entre lodos térmicos y compostados, estos resultados podrían deberse a que los lodos compostados presentan materia orgánica más madura y las enzimas pueden estar protegidas por los coloides húmicos, y de esta manera disminuir la relación actividad enzimática/ N-AA. Ortega *et al.* (1997), observaron que la concentración de humatos en una mezcla de 4 ml de una solución de glutaraldehído al 2,5%, con 3 ml de extracto húmico y 3 ml de solución de enzima β -glucosidasa afectaba también a la actividad enzimática del complejo formado. De forma general, cuando se incrementaba la concentración de humatos desde 0,3 hasta 1,2 mg ml⁻¹, se producía una inactivación del complejo enzimático.

Relación de las actividades enzimáticas β -glucosidasa y β -galactosidasa con el C-biomasa microbiana

Se encontraron interacciones significativas entre los tres factores estudiados para la relación **β -glucosidasa/C biomasa microbiana (GLU/CBM)** (Tabla 4.12).

Tabla 4.12 Tabla de ANOVA y valores F de las relaciones β -glucosidasa/C-biomasa microbiana (GLU/CBM) y β -galactosidasa/C-biomasa microbiana (GAL/CBM) en las mezclas lodo-suelo residual.

	g.l	GLU/CBM	GAL/CBM
Suelo Residual (R)	1	6,21*	0,0ns
Lodos (LD)	5	12,90***	7,18***
Muestreo (M)	1	52,46***	72,50***
R x LD	5	3,29**	4,07**
R x M	1	8,37**	4,23*
LD x M	5	5,89***	3,61**
R x LD x M	5	3,35**	1,99ns

*, ** y *** indican diferencias significativas al $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente, ns: no significativo.

En **M1** y en el caso de la relación GLU/CBM sobre residuo de trituración, solo la mezcla BE-T fue significativamente superior a su respectivo control y a la mezcla MT-T. En cambio, sobre residuo de extracción, la mayoría de las mezclas no se diferenciaron del control, excepto aquella que contenía el lodo MT que presentó un valor significativamente inferior (Tabla 4.13). En la relación GAL/CBM también las mezclas con el lodo MT presentaron los valores más bajos. Estos resultados indican que la actividad enzimática por unidad de biomasa microbiana ha disminuido con la aplicación del lodo MT, lo que sugiere que en el lodo puede estar presente alguna sustancia tóxica que inhibe la actividad de estas enzimas, tal como parecía deducirse en el caso de la relación GLU/N-AA y el qCO_2 . En cambio sobre residuo de extracción, los valores de la mezcla con el lodo SB fueron significativamente superiores a los valores hallados en la mezcla con el lodo BL, MN, MT y BE. Los valores de **GLU/CBM** en la mezcla con el lodo SB sobre residuo de extracción fueron significativamente superiores a los hallados sobre residuo de trituración. En los suelos residuales E, de textura más fina, el mayor contenido de humedad puede haber favorecido la disgregación de los pellets y haber aumentado la actividad microbiana.

Las relaciones de ambas actividades enzimáticas con el C-biomasa microbiana se incrementaron en la mayoría de las mezclas durante el período de muestreo analizado aunque solo en las mezclas MN, MT, BE-E y VL-T, y en el caso particular de la relación **GAL/CBM** debemos añadir la mezcla SB-T estos aumentos fueron significativos. Landi *et al.*, (2000) consideran que un incremento en la actividad enzimática por unidad de CBM puede ser debido: i) al aumento en la producción de la enzima por parte de los microorganismos, ii) a la liberación de enzimas inmovilizadas en arcillas o coloides húmicos y/o iii) a un incremento en la concentración de sustratos disponibles para la actividad enzimática. También puede suceder que la enzima se haya encontrado inactivada por diversos mecanismos como: i) que la adsorción involucre el sitio activo; ii) que alguna propiedad del suelo como pH o concentración salina cambie la relación de sinergismo entre las enzimas ó iii) que se produzca un efecto estérico debido a las arcillas o materia orgánica (Ladd y Butler, 1975).

Tabla 4.13 Variables específicas (β -glucosidasa/C biomasa microbiana y β -galactosidasa/C biomasa microbiana) en los controles y en las mezclas lodo-suelo residual

Origen	Símbolo	GLU/CBM ($\mu\text{g pNf } \mu\text{mols C}_{\text{mic}}^{-1} \text{h}^{-1}$)		GAL/CBM ($\mu\text{g pNf } \mu\text{mols C}_{\text{mic}}^{-1} \text{h}^{-1}$)	
		M1*	M2*	M1*	M2*
<i>Residuo mineral de trituración</i>					
Blanes	BL	14,74bcA**	23,1bcA	2,73aA	4,71abA
Manresa	MN	10,51bcB	31,5bA	1,21abB	6,0aA
Vilaseca	VL	12,50bcB	25,4bcA	1,71aB	3,22abA
Sabadell	SB	6,41bcA	24,7bcA	2,09aB	4,87abA
Mataró	MT	0,82cB	20,3cdA	0,09bB	2,85bcA
Besos	BE	23,13abA	39,9aA	2,11aA	2,52bcA
Control	T	1,49cA	7,36dA	nd	1,46c
<i>Residuo mineral de Extracción</i>					
Blanes	BL	13,61bcA	19,9bcA	2,47aA	2,87bcA
Manresa	MN	11,54bcB	30,2bA	1,39abB	4,06abcA
Vilaseca	VL	22,92abA	20,5bcA	2,83aA	2,57bcA
Sabadell	SB	35,30aA	22,2bcA	1,99aA	2,64bcA
Mataró	MT	1,93cB	15,7cdA	0,29bB	2,51bcA
Besos	BE	15,29bcB	45,0aA	2,59aB	5,21abA
Control	E	23,37abA	14,5dA	1,45abA	2,73bcA

* M1: muestras obtenidas después de que se prepararon las mezclas; M2: muestras obtenidas al final del experimento después de la cosecha.

** En cada parámetro y para cada período de muestreo, valores no seguidos por la misma letra minúscula muestran diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de SNK ($p < 0.05$). En cada parámetro y para cada tratamiento, valores no seguidos por la misma letra mayúscula muestran diferencias significativas entre períodos de muestreo según la prueba de SNK ($p < 0.05$).

4.4.9. Correlaciones entre parámetros

Los resultados de los estudios de correlación realizados con los valores obtenidos en M2 entre los distintos parámetros se muestran en la Tabla 4.14. Las correlaciones entre las propiedades bioquímicas y las principales propiedades físico-químicas de los suelos restaurados no fueron significativas en su mayoría. Además, las propiedades bioquímicas, a excepción de los carbohidratos totales y extraíbles, tuvieron una pobre correlación con el C orgánico total y con el contenido de N total. La falta de correlación entre las actividades enzimáticas estudiadas y el contenido total de C sugiere que la materia orgánica presente en ese momento no llega a estabilizar las enzimas exocelulares.

No se observó correlación significativa entre RB y COE. Estos resultados difieren con las observaciones realizadas por Nannipieri *et al.* (1990), quienes sugieren que la respiración basal no está relacionada con el tamaño de la biomasa microbiana de los suelos, sino con la cantidad de carbono disponible. Sin embargo se observaron correlaciones significativas entre la RB y las actividades enzimáticas estudiadas. Estas correlaciones nos permitirían afirmar que la actividad microbiana en

los suelos estudiados está íntimamente relacionada con las actividades enzimáticas. En general, las actividades enzimáticas no se correlacionan con la respiración o el número total de microorganismos del suelo, ya que son específicas a un sustrato y relativas a reacciones específicas; además en el ensayo se determina la actividad enzimática potencial del suelo y no la real en el momento de la toma de muestra.

La baja correlación entre C orgánico total o N y la mayoría de las propiedades bioquímicas en los suelos restaurados, probablemente está relacionado con el hecho de que como es la materia orgánica más lábil la que se pierde y la materia orgánica más humificada la que permanece, esto afecta a las relaciones típicas entre la materia orgánica y aquellas propiedades más directamente relacionadas con la actividad de los microorganismos y la presencia de sustratos fácilmente mineralizables (Trasar-Cepeda *et al.*, 2008a). La falta de correlación entre la materia orgánica (tanto el carbono orgánico total y el N total) o la actividad de las enzimas hidrolíticas con el C-biomasa microbiana, nos sugiere que las enzimas no están en este caso básicamente asociadas con microorganismos activos.

Podemos pues decir que la presencia de MO lábil procedente del lodo añadido desvirtúa las correlaciones entre parámetros normalmente existentes en los suelos.

Tabla 4.14 Coeficientes de correlación entre las propiedades físico-químicas y bioquímicas evaluadas en el muestreo final (M2) en las mezclas lodo-suelo residual

	N*	C	pH	CE	COE	CHT	CHE	RB	CBM	GLU
CHT	0,85***	0,888***	-0,32ns	0,13ns	0,89***	-	-	-	-	-
CHE	0,64*	0,729**	-0,004ns	-0,29ns	0,61*	0,63*	-	-	-	-
RB	0,45ns	0,495ns	-0,305ns	-0,07ns	0,47ns	0,62*	0,49ns	-	-	-
CBM	0,48ns	0,603*	0,04ns	0,43ns	0,75**	0,50ns	0,51ns	0,28ns	-	-
GLU	0,48ns	0,474ns	-0,02ns	-0,03ns	0,38ns	0,52ns	0,37ns	0,67**	0,47ns	-
GAL	0,55ns	0,484ns	0,08ns	0,002ns	0,57*	0,59*	0,42ns	0,68**	0,47ns	0,68**

*Nitrógeno (N), Carbono (C), conductividad eléctrica dS m^{-1} a 25°C (CE), carbono orgánico extraíble (COE), carbohidratos totales (CHT), carbohidratos extraíbles (CHE), respiración basal (RB), carbono de la biomasa microbiana (CBM), actividad β -glucosidasa (GLU), actividad β -galactosidasa (GAL)

Significativo a $P < 0.01$; * Significativo at $P \leq 0.001$; n.s: no significativo.

4.4.10 Efecto del pre-tratamiento (secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento) de las muestras de suelo sobre los parámetros analizados

4.4.10.1 Resultados ANOVA

Los resultados del ANOVA (Tabla 4.15) muestran que el tipo de mezcla y el tipo de pre-tratamiento aplicado tienen efectos significativos sobre la mayoría de las propiedades estudiadas en el muestreo final (M2), excepto el tipo de pre-tratamiento para **CBM**. La interacción entre los dos factores fue también estadísticamente significativa para todas las propiedades excepto para el **CBM**.

4.4.10.2 Efecto del secado al aire sobre CBM, RB y qCO_2

Tabla 4.15. Tabla de ANOVA (factores pre-tratamiento y mezcla suelo-lodo) con los valores F del carbono de la biomasa microbiana (CBM), respiración basal del suelo (RB), actividades β -glucosidasa (GLU), β -galactosidasa (GAL) y Carbono orgánico extraíble (COE) en las mezclas lodo-suelo residual correspondientes al muestreo final (M2).

	COE	CBM	RB	qCO_2	GLU	GAL
Pre-tratamiento (PT)	41.76***	1.27ns	33.50***	56.26***	21.92 ***	72.59***
Mezclas Suelos-lodos (SL)	28.87***	14.80***	27.13***	7.74***	185.94***	46.47***
PT x SL	10.98***	1.69ns	14.80***	6.47***	19.29***	10.06***

*, ** y *** indican diferencias significativas al $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ and $P \leq 0.001$, respectivamente. ns, no-significativo.

Los valores de **CBM** en las muestras secas al aire (valor medio 228,2 $\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo) no fueron significativamente diferentes de aquellos obtenidos en muestras de suelos a humedad de campo (valor medio 217,85 $\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo). Las diferencias relativas de los valores de CBM dentro de las muestras secas al aire fueron similares a las encontradas en las muestras a humedad de campo en las mezclas con el suelo E y se conservaron totalmente en el caso de las mezclas con el suelo T (Tabla 4.16). Se observó una disminución de las diferencias entre las muestras como consecuencia del secado.

El secado al aire incrementó significativamente los valores de **RB** de los suelos respecto a los obtenidos en las muestras a humedad de campo, excepto en los suelos control y en las mezclas SB-E, y BL-T en los cuales los valores de RB de ambos pre-tratamientos no fueron significativamente diferentes, y en las mezcla BE-T y MT-T en los que el secado al aire provocó una disminución significativa del CO_2 liberado (Tabla 4.16). El secado al aire del suelo modifica la clasificación de RB de las muestras a humedad de campo.

Un aumento significativo en el **cociente metabólico** (qCO_2) se observó en la mitad de las muestras secas al aire (Tabla 4.16) comparadas con las muestras a humedad de campo. Las muestras secas al aire mostraron aumentos del 40%, 45%, 70%, 78%, 100% y 171% en relación con las mediciones de las muestras a humedad de campo para MT-T, BL-T, BE-E, MN-E, VL-T y MN-T respectivamente. Sólo en la muestra BE-T se observó una disminución significativa del qCO_2 luego del secado al aire.

Anderson y Domsch (1985) propusieron el cociente entre RB y CBM (qCO_2) como un índice sencillo de la actividad biológica del suelo, que relaciona la actividad a través de la respiración microbiana ($\mu\text{g C-}$

CO₂) y la cantidad de biomasa microbiana (mg C-biomasa) por unidad de tiempo (hora). Una de las perturbaciones que se sabe que causan una elevación del qCO₂ es el rehumedecimiento de un suelo previamente secado al aire (West *et al.*, 1989). El incremento del valor qCO₂ en alguno de los suelos secos al aire puede indicar un mayor nivel de estrés, o un sustrato más fácilmente mineralizable (Sparling 1997). Las mezclas de suelos secos correspondientes al residuo de trituración (excepto MT-T y BE-T) presentaron valores de qCO₂ superiores a los presentados por las mezclas con residuo de extracción. Como ya hemos comentado en párrafos anteriores, los residuos de trituración tienen menor porcentaje de tierra fina que los residuos de extracción. Esta característica, de acuerdo a lo sugerido por Hattori (1988), hace que los microorganismos ubicados en o sobre la parte externa de los agregados del suelo (es decir, en los poros más grandes y en superficies de agregados), sean más susceptibles a los efectos del secado y rehumedecimiento que los microorganismos que se encuentran en pequeños poros.

Tabla 4.16. Efecto del secado al aire sobre el C-biomasa microbiana (CBM), la Respiración Basal del Suelo (RB) y el cociente metabólico (qCO₂) en las mezclas lodo suelo residual correspondientes al muestreo final (M2).

Suelos	CBM ($\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo)		RB ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}\text{soil h}^{-1}$)		qCO ₂ ($\text{C-CO}_2 \mu\text{g} \cdot \text{CBM} \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	
	Humedad campo	Secas al aire	Humedad campo	Secas al aire	Humedad campo	Secas al aire
Residuo Trituración						
BL	263,0abc	263,9abcd	0,73dA	0,95bcdA	29,0bcB	42,2bcA
MN	187,1c	139,3de	0,45fgB	0,91bcdA	23,0cB	62,4abA
VL	260,0abc	238,4abcde	0,51efB	0,99bcA	21,8cB	45,0bcA
SB	220,6bc	217,5abcde	1,07bB	1,72aA	44,9aA	72,6aA
MT	341,6a	338,5a	1,22aA	0,47efB	27,2cB	38,1bcA
BE	221,5bc	236,0abcde	1,12bA	0,55defB	44,5aA	27,8cB
T	83,7d	119,1e	0,34gA	0,26fA	38,4abA	29,1cA
Residuo Extracción						
BL	209,7bc	233,2abcde	0,50fB	0,74bcdeA	24,0cA	30,6cA
MN	203,6bc	212,7abcde	0,64eB	1,08bA	29,1bB	51,8bcA
VL	293,3ab	317,7ab	0,91cA	1,00bcA	25,8cA	38,6bcA
SB	97,4d	183,6cde	0,36gA	0,61cdefA	44,8aA	39,6bcA
MT	326,3a	270,6abc	0,52efB	0,68bcdefA	22,0cA	42,8bcA
BE	223,0bc	200,5bcde	0,58efB	1,09bA	24,5cB	42,2bcA
E	119,3d	223,5abcde	0,37gA	0,46efA	21,7cA	25,9cA

En cada parámetro y para cada pre-tratamiento, medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las mezclas lodo-suelo residual y/o controles ($P \leq 0,05$). En cada parámetro y para cada mezclas lodo-suelo residual y/o controles, medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los pre-tratamiento ($P \leq 0,05$).

4.4.10.3 Efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento sobre las actividades enzimáticas

Los valores de las actividades de la β -glucosidasa y β -galactosidasa ($\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en muestras de suelo a humedad de campo, secadas al aire y secadas al aire y rehumedecidas se muestran en la Tabla 4.17.

En las mezclas MN-E, VL-E, SB-E, MN-T, VL-T y en el control E, el secado al aire aumentó significativamente la actividad **β -glucosidasa** del suelo (entre 1,2 y 1,7 veces aproximadamente), por el contrario en la mezcla MT-E el secado al aire disminuyó significativamente la actividad de dicha enzima (0,7 veces). En cambio, en el resto de los suelos este pre-tratamiento no modificó significativamente la actividad enzimática.

En la mayoría de las mezclas lodo-suelo residual, el secado al aire no modificó significativamente los valores de actividad **β -galactosidasa** respecto a las muestras a humedad de campo, las excepciones fueron BE-E, MT-E, SB-E, MN-T, VL-T en las que el secado al aire aumentó significativamente la actividad.

Los resultados muestran que aproximadamente en la mitad de las muestras estudiadas, las actividades de las enzimas β -glucosidasa y β -galactosidasa aumentaron significativamente luego del secado al aire, lo que refleja que algunas hidrolasas del suelo parecen ser resistente al secado (Bandick y Dick, 1999; Li y Sarah, 2003). Está generalmente aceptado que una parte de la actividad enzimática del suelo es extracelular e independiente de la influencia microbiana (Sparling *et al.*, 1986). El secado al aire de muestras de suelo a humedad de campo, puede acelerar la adsorción de las enzimas libres a los coloides del suelo y estabilizar esas enzimas para conservar la actividad metabólica del suelo (Burns, 1982). En cambio, en la mezcla MT-E, la fracción de actividad enzimática perdida por el secado al aire puede ser el componente que no estaba estabilizado por sorción al complejo órgano-mineral del suelo. Además, podemos inferir que la reducción de la actividad enzimática provocada por el secado al aire ralentiza la mineralización de la materia orgánica, y nos permite explicar la baja liberación de CO₂, producto final de la oxidación de la materia orgánica que se observa en esta mezcla.

El secado y rehumedecimiento de los suelos causó mayoritariamente un aumento significativo de los valores de las actividades enzimáticas presentes en las muestras a humedad de campo. En la mezcla BE-T el pre-tratamiento disminuyó significativamente ambas actividades enzimáticas y en la mezcla BL-E disminuyó la actividad β -glucosidasa. El pre-tratamiento no modificó significativamente la actividad β -glucosidasa en las mezclas BE-E, MT-E, MT-T y SB-T ni la actividad β -galactosidasa en las mezclas BL-E, MT-T y SB-T.

Ambos pre-tratamientos modificaron el rango de los valores de las actividades enzimáticas entre los suelos respecto de las muestras a humedad de campo, y disminuyeron la capacidad de discriminación entre los suelos. (Tabla 4.17).

Tal como comentamos para el estudio de los suelos naturales, el aumento que se produce en la actividad enzimática durante el ciclo de secado y rehumedecimiento probablemente se deba a la disrupción del suelo que expone el sustrato a las enzimas estabilizadas o a la inducción de las enzimas debido a la liberación de sustratos de las células lisadas (Lee *et al.*, 2007). Los valores de la actividad β -glucosidasa de las muestras secadas y rehumedecidas fueron menores en las mezclas BE-T y BL-E respecto de las muestras a humedad de campo. En el suelo BE-T, como veremos más adelante, se

observó un aumento en los niveles de carbono orgánico extraíble (COE) (Figura 4.12) luego del rehumedecimiento del suelo. En este caso, probablemente la MO muy poco estabilizada del lodo era mineralizada a un ritmo mayor que el proceso de aumento de accesibilidad del sustrato. Diversos estudios demuestran que las comunidades microbianas asignan recursos a la producción de enzimas en relación con la disponibilidad de sustratos y requerimientos para el crecimiento (Allison y Vitousek, 2005; Sinsabaugh *et al.*, 1993). En un entorno competitivo y recursos limitados, estos factores determinan que los microorganismos regulen la producción de la enzima extracelular para limitar los costos y maximizar el retorno de recursos. Dentro de este contexto, es difícil de explicar la disminución en la actividad β -glucosidasa en la mezcla BL-E, en la cual los valores de COE entre ambos pre-tratamientos no fueron significativamente diferentes (Figura 4.12).

Tabla 4.17. Actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa en muestras de suelo a humedad de campo (HC), secas al aire (SA) y secas al aire y rehumedecidas (RH).

Suelos	β -glucosidasa ($\mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$)			β -galactosidasa ($\mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$)		
	HC	SA	RH	HC	SA	RH
<i>Residuo Trituración</i>						
BL	0,473eB	0,527dB	0,636cA	0,096aB	0,12aB	0,148aA
MN	0,254gC	0,362fB	0,451dA	0,039cB	0,078deA	0,101bcdA
VL	0,499eB	0,771cA	0,629cA	0,081abC	0,097bcdB	0,125abcA
SB	0,747bA	0,708cA	0,627cA	0,079abA	0,117abA	0,142aA
MT	0,791bA	0,846bA	0,742bA	0,096aA	0,109abcA	0,098bcdA
BE	1,016aA	1,071aA	0,581cB	0,079abA	1,07aA	0,047efB
T	0,064iB	0,055hB	0,198eA	0,003dB	0,009gB	0,047efA
<i>Residuo Extracción</i>						
BL	0,500eA	0,501deA	0,401dB	0,080abA	0,074deA	0,071defA
MN	0,336fC	0,501deB	0,626cA	0,069bB	0,075deB	0,110abcdA
VL	0,647cC	0,753cB	0,892aA	0,088abB	0,093cdB	0,110abcdA
SB	0,328fB	0,405efA	0,412dA	0,016dB	0,034fA	0,037fA
MT	0,581dA	0,425defB	0,540cA	0,045cC	0,060eB	0,082cdeA
BE	0,677cA	0,721cA	0,808bA	0,080abB	0,107abcA	0,125abcA
E	0,140hC	0,236gB	0,367dA	0,010dB	0,012gB	0,082cdeA

En cada parámetro y para cada pre-tratamiento, medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las mezclas lodo-suelo residual y/o controles ($P \leq 0,05$). En cada parámetro y para cada mezclas lodo-suelo residual y/o controles, medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los pre-tratamiento ($P \leq 0,05$).

4.4.10.4 Regresión lineal simple de los valores de las actividades enzimáticas entre muestras de suelo secas al aire o secas al aire y rehumedecidas y muestras de suelo a humedad de campo.

Siguiendo el mismo procedimiento adoptado en el estudio de suelos naturales y expuestos en el apartado 3.4.6.5, se evaluó la pendiente obtenida de regresiones lineales simples de los valores de las actividades

enzimáticas obtenidos entre muestras de suelo secas al aire o secas al aire y rehumedecidas y muestras de suelo a humedad de campo.

Los valores de la actividad β -glucosidasa y β -galactosidasa en las muestras secas al aire fueron representativos de los valores obtenidos en condiciones de campo (pendiente 0,93; R^2 0,866, $P < 0,001$ y pendiente 1,03; R^2 0,854, $P < 0,001$) (Figura 4.11). Las mayores desviaciones para ambas actividades fueron observadas con muestras secas al aire y rehumedecidas, que sobreestimaban los valores de las muestras a humedad de campo (pendiente 0,48; R^2 0,466, $P < 0,01$ y pendiente 0,68; R^2 0,39, $P < 0,05$) (Figura 4.11) y dado el valor de la pendiente no se pueden considerar representativos.

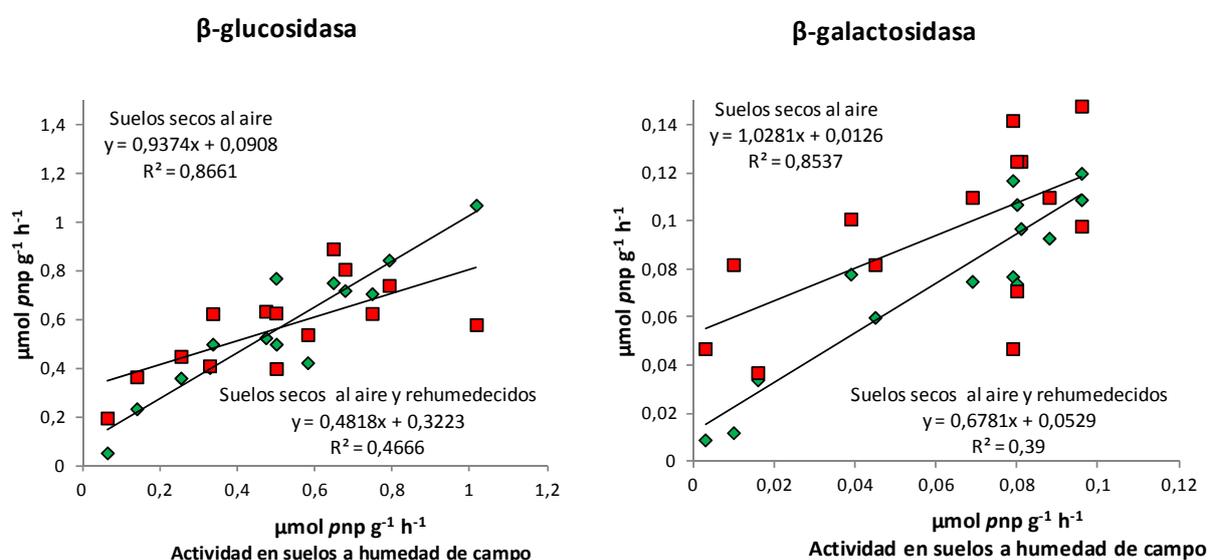


Figura 4.11. Actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa determinadas en muestras de suelo a humedad de campo, secas al aire y secas al aire y rehumedecidas.

4.4.10.5 Estudio de los efectos del secado al aire con los efectos del secado al aire y rehumedecimiento sobre los valores COE de los suelos

En la Figura 4.12 podemos observar que luego del rehumedecimiento de las muestras de suelo secas al aire, los valores de COE ($\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo) en la mayoría de las muestras se incrementaron, aunque estos

Los aumentos sólo fueron significativos en las mezclas MN-T, SB-T y BE-E. Estudios previos sugirieron que la biomasa microbiana muerta por secado al aire contribuyó significativamente al aumento de suelo C orgánico extraíble causado por secado al aire (Kieft et al., 1987). Cuando el suelo es rehumedecido, los compuestos orgánicos fácilmente degradables liberados por la biomasa microbiana muerta son rápidamente utilizados por los microorganismos que sobreviven, causando su proliferación. Si los valores de CBM alcanzados luego del secado al aire y rehumedecimiento fueron similares a los valores hallados en las muestras a humedad de campo, podríamos sugerir que el aire de secado y rehumedecimiento aumentó sobre todo la extractabilidad de la materia orgánica del suelo no biológica, presumiblemente debido a la alteración de los coloides del suelo y la exposición de la materia orgánica a la mineralización (Wu y Brookes, 2005).

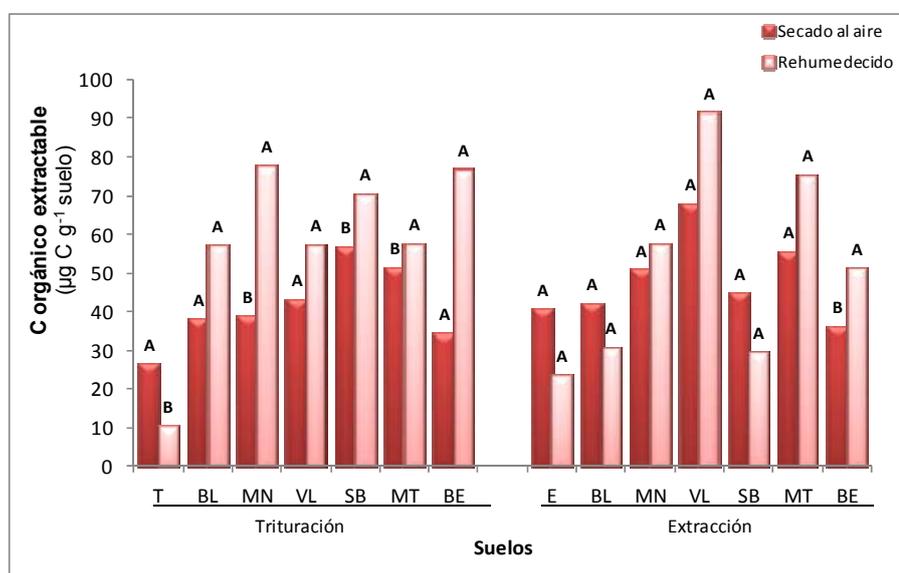


Figura 4.12. Valores de C orgánico extraíble en suelos secados al aire y secados al aire y rehumedecidos. Para cada suelo, medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre pre-tratamientos ($P \leq 0,05$).

5

***EVALUACION DEL PROCESO DE RESTAURACION:
COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE LOS
PARÁMETROS DE LOS SUELOS RESTAURADOS
CON LO DE LOS SUELOS NATURALES Y CON LOS
DE OTRA EXPERIENCIA DE RESTAURACION DE
SUELOS***

5

**EVALUACION DEL PROCESO DE RESTAURACION:
COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE LOS PARÁMETROS DE
LOS SUELOS RESTAURADOS CON LO DE LOS SUELOS
NATURALES Y CON LOS DE OTRA EXPERIENCIA DE
RESTAURACION DE SUELOS****5.1 Introducción**

En los capítulos anteriores hemos realizado un estudio del rango de valores de determinados parámetros biológicos y bioquímicos en suelos naturales catalanes y en dos suelos residuales de una cantera de piedra caliza restaurados con lodos de depuradora de EDAR.

Los valores obtenidos en los suelos naturales no alterados por acción antrópica serán utilizados en el presente Capítulo como valores de referencia para los indicadores establecidos para evaluar el proceso de restauración. El uso de la condición de pre- alteración del suelo como punto de referencia para la evaluación del éxito de la recuperación de ecosistemas drásticamente alterados ha sido cuestionado. Este hecho se debe a que muchos atributos de la condición de pre- alteración del suelo pueden ser inalcanzables, debido a la grave alteración de las características edáficas. Sin embargo, los ecosistemas inalterados cercanos a las zonas a restaurar han desarrollado características estructurales y una composición sostenible bajo controles ambientales similares. Por lo tanto, el grado de similitud entre los sitios de recuperación y la condición de pre- alteración debe proporcionar evidencias de la creación de condiciones propicias para el desarrollo de la estabilidad del ecosistema a largo plazo si los indicadores son cuidadosamente elegidos y teniendo presente sus limitaciones (White y Walker, 1997).

Un ecosistema que pasa por la restauración puede terminar en uno de una gran variedad de estados posibles. Cualquier estado que se exprese se acepta como restauración, con tal que sea comparable con alguno de los estados posibles en que la referencia se pudiera haber desarrollado. Por lo tanto, una sola referencia es una expresión inadecuada de la constelación de posibles estados y de la gama histórica de variaciones expresadas por el ecosistema restaurado. Por lo tanto, es mejor usar como referencia un agregado de múltiples sitios de referencia (*Society for Ecological Restoration (SER) International, 2004*).

5.2 Tratamiento de los datos.

5.2.1 Comparación suelos enmendados/suelos naturales

Los valores de los distintos parámetros analizados tanto de los suelos naturales como de los suelos restaurados (en este caso los controles no han sido considerados) corresponden a los ensayos realizados en los capítulos 3 y 4. En el caso de los suelos restaurados los valores considerados son los correspondientes al último muestreo (13 meses después de agregada la enmienda).

Para dicha comparación, en primer lugar se consideraron los suelos naturales y los suelos restaurados como dos grupos y se tomaron en cuenta los valores mínimo, máximo, y medias aritméticas y desviaciones estándar (DS), así como el coeficiente de variación (CV) de los diferentes parámetros analizados. Las diferencias estadísticas entre los valores promedio de ambos grupos de suelos se contrastaron mediante la prueba t de Student y considerando el valor de significación del 5%.

En segundo lugar se utilizaron modelos generales lineales (ANOVA) para evaluar la influencia de los distintos tipos de suelos (considerando cada mezcla suelo residual-lodo como un suelo del mismo modo que los suelos naturales) sobre los parámetros considerados. Los datos fueron analizados utilizando el Statistics Analysis System software y el procedimiento GLM fue llevado a cabo utilizando el análisis de la varianza (SAS 1990). Previamente se revisó la adecuación de los datos para ser analizados mediante esta técnica estadística de la ANOVA. La comparación de medias de las distintas variables se realizó según procedimiento SNK (Student-Newman-Keuls a nivel de significación $\alpha=0,05$).

En tercer lugar, se utilizó el método jerárquico de Análisis de Cluster, aplicándolo tanto a variables como a observaciones (suelos). En el caso de trabajar sobre variables, se hizo uso de las medias de éstas para cada uno de los suelos, se utilizó el método completo y como medida de distancia la correlación. En el caso del análisis de clúster para los distintos suelos, las variables fueron estandarizadas, el método usado fue el completo, y la distancia el cuadrado de la distancia euclidiana. Los distintos grupos que se formaron fueron presentados gráficamente a partir de diagramas de árbol o dendogramas.

5.2.2 Comparación del efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento entre suelos naturales y suelos enmendados con lodos sobre carbono de la biomasa microbiana, respiración basal, cociente metabólico y las actividades enzimáticas β -glucosidasa y β -galactosidasa de los suelos.

Para poder comparar el efecto causado por los pre-tratamientos del suelo (secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento) en suelos naturales y los suelos enmendados con lodos sobre los valores de CBM, RB, qCO_2 y actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa, se determinaron respectivamente las diferencias entre suelos a humedad de campo y secos al aire, y en el caso de las actividades enzimáticas también se determinaron las diferencias entre suelos a humedad de campo y suelos secos al aire y rehumedecidos. Se

evaluó mediante la prueba de t-Student si se podía mantener la hipótesis de que las diferencias entre los pre-tratamientos no eran significativamente diferentes en suelos naturales y en suelos restaurados.

5.2.3 Comparación de los resultados de nuestra experiencia con los de otra experiencia similar

En el presente capítulo se incluirá el análisis de muestras de un proyecto anterior denominado “*Aprofitament de compost de fangs de depuradora i altres residus en la recuperació de terrenys degradats (projecte ECOFANGS)*” que fue financiado por el CIRIT- Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya y que se realizó entre el Instituto Químico de Sarrià (URL), el Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals (CREAF - UAB) y la Escola Superior d’ Agricultura de Barcelona (Consorti de l’ Escola Industrial de Barcelona CEIB i UPC). Este trabajo se basa en una de las primeras experiencias de utilización de lodos de depuradora en la restauración de canteras de caliza que se realizó en Cataluña, el año 1992. El objetivo de esta primera experiencia consistió fundamentalmente en el ensayo de dos dosis y dos formas de aplicación de lodos diferentes.

Las muestras corresponde a la cantera de Rubau, localizada en Girona; suelo Calcixerollic Xerocept asociado a Lithic Xerorthens; altitud 180 m; presión atmosférica media 805 mm; temperatura media 14,7° C; pluviometría 627 mm anuales. Se utilizaron para el análisis muestras correspondientes a 2 parcelas experimentales de 100 m² cada una en un talud y en la dirección de máxima pendiente (22°), según un bloque aleatorizado (incluyendo el control, al que no se añadió lodo) y dos réplicas por cada tratamiento. El espesor del suelo o de mezcla aportado fue de 40 cm. La aplicación del lodo sobre el suelo se hizo previa mezcla de ambos y luego se aplicó sobre el talud. La proporción de lodo presente en las mezclas fue de 200 t ha⁻¹ de materia seca, que corresponden a una dosis de 7,5% (en materia seca) sobre tierra fina. El experimento se inició en Diciembre de 1992. En Febrero de 1993 las parcelas fueron sembradas con una mezcla a partes iguales de *Lotus corniculatus* (20 g m²) y *Dactylis glomerata* (20 g m²). El material sembrado no se cosechó. Se realizaron muestreos periódicos para la determinación de las actividades enzimáticas, el último de los cuales corresponde a Diciembre de 1997. Analizamos las muestras del primer y el último muestreo.

Las características del suelo, del lodo de digestión anaeróbica proveniente de la depuradora de Girona y de las mezclas fueron las siguientes:

- **Suelo:** pH 8,3; CO₃²⁻ 6,97%; C 0,66%; N 0,075%; C/N 8,88; arena gruesa 16,8%, arena fina 35,8%, limo 15,8%, arcilla 31,6%.
- **Lodo:** pH 7,5; CO₃²⁻ 7,26%; C 29,34%; N 1,09%; C/N 26,91.
- **Mezclas:** pH 7,9; CO₃²⁻ 12,7%; C 1,27%; N 0,11 %¹; C/N 11,5; arena gruesa 23,4%, arena fina 29,9%, limo 18%, arcilla 28,8%.

Las muestras secas al aire, tamizadas y conservadas a temperatura ambiente durante 5 años fueron utilizadas para las siguientes determinaciones: carbohidratos totales (CHT), carbohidratos extraíbles (CHE), C-biomasa microbiana (CBM), respiración basal (RB) y actividades β -glucosidasa (GLU) y β -galactosidasa (GAL). Las técnicas analíticas utilizadas fueron las mismas que las descritas en 3.3.4.

5. 3 Resultados y Discusión

5.3.1 Comparación de suelos naturales y suelos restaurados

Aunque los resultados se presentarán teniendo en cuenta el orden planteado en el tratamiento de los datos, es decir primero comparando los dos grupos de suelos, luego considerando el efecto de los post-tratamientos sobre los parámetros biológicos y bioquímicos seleccionados y luego el análisis por el método de Cluster, la discusión e interpretación de los resultados se ha efectuado conjuntamente con el objetivo de evitar repeticiones en la interpretación de fenómenos similares que se pueden contemplar desde el punto de vista de los parámetros medidos y dar una visión más general del conjunto de los resultados.

5.3.1.1 Comparación de los valores medios de los dos grupos de suelos: naturales y restaurados.

Como podemos apreciar en la Tabla 5.1, en general los valores medios obtenidos en los suelos naturales fueron significativamente superiores a los obtenidos en los suelos restaurados, excepto la RB, cuyos valores no mostraron diferencias significativas.

Las propiedades que más difieren entre los grupos de suelos naturales y suelos restaurados fueron CHT (7 veces), CHE (4,5 veces) y actividad β -galactosidasa (4 veces) y en menor medida el CBM (3,5 veces) y COE (3,3 veces) (Tabla 5.1).

El contenido medio de materia orgánica en los suelos restaurados fue bajo en relación al valor presentado por los suelos naturales, hecho que dificulta la comparación de los valores absolutos de los diferentes parámetros bioquímicos y no permite un diagnóstico claro del efecto del agregado de lodos en la calidad del suelo. Una forma de superar esta dificultad y permitir la comparación de los dos grupos de suelos es utilizar los valores de los parámetros analizados divididos por el contenido de C orgánico (parámetros específicos).

Tabla 5.1 Valores medios de los parámetros bioquímicos generales estudiados en los suelos restaurados con lodos de EDAR y en los suelos nativos de Cataluña desarrollados bajo vegetación climax

Parámetros ^a	Suelos Restaurados				Suelos Naturales			
	Mínimo	Máximo	Media±DS	CV	Mínimo	Máximo	Media±DS	CV
C	0,65	1,22	0,88±0,2 B*	20%	0,85	10,74	4,54±3,3 A	73%
COE	122,0	214,3	159,1±28B	16%	188,8	1423,1	527,2±368A	70%
CBM	166,1	300,4	235±38,51 B	16%	338	2170	813±569,1A	70%
RB	0,61	1,16	0,82±0,16A	19%	0,29	1,79	1,03±0,50 A	49%
qCO₂	2	4,5	3,5±0,86B	25%	2,6	7,2	4,85±1,93A	40%
CHT	0,75	1,31	1,07±0,19 B	18%	0,99	23	7,31±6,79 A	93%
CHE	0,03	0,13	0,095±0,025B	26%	0,11	1,50	0,44±0,42A	95%
GLU	0,39	1,07	0,60±0,21B	35%	0,39	3,83	1,71±1,06 A	62%
GAL	0,05	0,12	0,08±0,02 B	28%	0,03	0,98	0,35±0,34 A	97%

^a C: Carbono orgánico del suelo (%); COE : Carbono orgánico extraíble (mg kg⁻¹), CBM: Carbono biomasa microbiana (µg C g⁻¹ suelo); RB: respiración basal (µg CO₂-C mg⁻¹ biomasa-C h⁻¹); qCO₂:cociente metabólico (C-CO₂ µg ·CBM mg⁻¹ h⁻¹); CHT: carbohidratos totales (mg glucosa g⁻¹); CHE: carbohidratos extraíbles (mg glucosa g⁻¹); GLU: β-glucosidasa (µmol PNF g⁻¹ h⁻¹); GAL: β-galactosidasa (µmol PNF g⁻¹ h⁻¹).

* Medias dentro de una misma fila seguidas por la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes según prueba t-Student (P≤0,05).

5.3.2 Valores medios de los parámetros bioquímicos específicos

Los valores medios de los parámetros analizados en relación con el contenido de C orgánico (parámetros específicos) para cada grupo de suelos se presentan en la Tabla 5.2. En general podemos observar que los valores medios de los suelos restaurados fueron significativamente superiores a los obtenidos en los suelos naturales, excepto para relación β-galactosidasa respecto al C orgánico (GAL/C) que no presentó diferencias significativas entre los dos grupos de suelos. Los coeficientes de variación de las valores de los parámetros específicos en los suelos naturales fueron mucho menores que los observados en los valores absolutos, pero siguen siendo superiores a los de los suelos restaurados.

Tabla 5.2 Valores de los parámetros bioquímicos específicos en los suelos restaurados con lodos de EDAR y en los suelos nativos de Cataluña desarrollados bajo vegetación climax

	Suelos Restaurados				Suelos Naturales			
	Mínimo	Máximo	Media±DS	CV	Mínimo	Máximo	Media±DS	CV
COE/C^a	0,7	1,5	1,9±0,25A	13%	0,5	2,2	1,42±0,60B	42%
CBM/C^b	19	43	28±6,5A	23%	5	33	18,3±7,8B	43%
RB/C^c	69,4	150,6	94,4±20,6A	22%	9,3	67,6	33,9±20,7B	61%
GLU/C^d	45,8	130,2	69,8±25,1A	36%	22,2	68,2	48,3±14,1B	29%
GAL/C^e	6,5	15,3	9,5±2,7A	29%	2,3	14,5	6,5±4,1A	64%

Para cada fila, letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de suelos restaurados y suelos naturales según prueba t-Student (P≤0,05), CV: coeficiente de variación. ^a: g g⁻¹ C, ^b y ^e: µmol p-nitrofenol g⁻¹ C h⁻¹

‡ Unidades: Carbono orgánico extraíble/Carbono (COE/C) en %; Carbono biomasa/Carbono (CBM/C) en mg g⁻¹ C, Respiración basal/Carbono (RB/C) en µg C-CO₂ g⁻¹ C h⁻¹, β-glucosidasa específica (GLU/C) y β-galactosidasa específica (GAL/C) en µmol pNP g⁻¹ C h⁻¹;

5.3.3 Valores de los parámetros ensayados en suelos naturales y en suelos restaurados

Los valores de **C orgánico** de los suelos restaurados con lodos de depuradora, expresados como porcentaje, variaron entre 0,7 y 1,2 % con un valor medio de 0,93, similares a los encontrados en los suelos LG y BL con valores de 0,85 y 1,82% respectivamente, pero significativamente menores que los valores encontrados en el resto de los suelos naturales estudiados (Tabla 5.3).

Analizando los parámetros que caracterizan la composición de la materia orgánica del suelo, podemos observar que los valores de **COE** en la mayoría de los suelos naturales (Tabla 5.3) fueron significativamente superiores que en los suelos restaurados. Sin embargo, la proporción de COE respecto al C orgánico (esta relación nos da una idea de la parte de la materia orgánica que es fácilmente asimilable) fue superior en los suelos restaurados debido al aporte de lodos realizados un año antes. Esta materia orgánica lábil sirve como fuente de nutrientes para los microorganismos del suelo. Los valores de **CHT** y **CHE** en los suelos restaurados fueron similares a los valores hallados en los suelos BL, LG y SG (con los valores más bajos), a excepción de las mezclas con residuo de trituración y con el lodo SB cuyos valores de CHE fueron significativamente inferiores a los valores hallados en los suelos naturales.

El valor medio de **CBM** detectado en los suelos restaurados se sitúa en 235 $\mu\text{g g}^{-1}$ suelo, similar a los valores encontrados en los suelos naturales catalanes LT, OR, BL, LG y SG, el cual es, en función de otros valores obtenidos por diversos investigadores para suelos naturales un valor que puede ser considerado como muy bajo (Dick, 1992).

El cociente **CBM/C** tanto en los suelos restaurados como en los suelos naturales ha mostrado valores diversos que van desde 1,5 a 4,3% y de 0,5 a 3,3% respectivamente (Tabla 5.3). En general, los suelos naturales presentaron valores menores de dicha relación. Estos resultados concuerdan con la afirmación de Insam y Domsch (1988) de que cuanto menor es la relación CBM/C más estable es la materia orgánica del mismo y menos susceptible a cambiar. Así pues, aunque en una proporción muy baja, son los suelos naturales, con menor índice, los que poseen mayor estabilidad de su materia orgánica. Al analizar los resultados individualmente, encontramos que efectivamente los valores más altos corresponden a la mezcla MT-T, significativamente superior al resto de los suelos restaurados y a los suelos naturales. Esto puede ser debido a que se están produciendo procesos de mineralización de la materia orgánica debido a que una parte de la misma sea lábil o fácilmente degradable. Sin embargo entre el resto de los suelos restaurados y la mayoría de los suelos naturales las diferencias no han sido significativas, aunque en realidad cabría esperarse otros resultados, ya que luego de un año de agregada la enmienda orgánica suponíamos que los suelos restaurados presentarían una menor estabilidad de su materia orgánica. En cualquier caso los suelos enmendados con lodos de secado térmico, presentaron

Tabla 5.3 Valores de los parámetros estudiados en suelos naturales y suelos restaurados

Suelo	C (%)	C/N	COE ($\mu\text{g C g}^{-1}$)	COE/C ($\text{E } 100 \text{ E}^{-1}$)	CHT (mg glucosa E^{-1})	CHE (mg glucosa E^{-1})	CBM ($\mu\text{g C g}^{-1}$)	RB ($\text{mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	GLU ($\mu\text{mol pNF E}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	GAL ($\mu\text{mol pNF E}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	CBM/C ($\text{mg E}^{-1} \text{ C}$)	RB/C ($\text{mg C-CO}_2 \text{ E}^{-1} \text{ C h}^{-1}$)	GLU/C ($\mu\text{mol pNF E}^{-1} \text{ C h}^{-1}$)	GAL/C ($\mu\text{mol pNF mg}^{-1} \text{ C h}^{-1}$)
Suelos Naturales														
LI	3,07f	19,2	283,4f	0,9fg	4,13e	0,22e	400,5ef	0,285e	1,60d	0,33d	13,0fgh	9,3f	52,1defg	9,4bcd
CR	6,20d	16,8	517,7c	0,8fg	8,60d	0,67b	725,9 d	1,794a	2,25c	0,89b	11,7gh	28,9def	38,2gh	12,1ab
MIN	7,23c	13,4	871,4b	1,2ef	13,11b	0,59b	1187,2 b	1,717ab	3,54b	0,98a	16,4defg	23,7def	49,1defg	14,5a
VC	4,15e	13,0	519,7c	1,3ef	5,19e	0,25d	876,1 c	1,007bcde	2,19c	0,24e	21,1bcddefg	24,3def	52,7defg	4,8efg
OR	7,81b	22,3	423,6d	0,5g	11,64c	0,48b	359,4 ef	1,56abc	1,60d	0,16e	4,6h	20,0ef	22,2h	2,3g
IG	2,31g	13,6	432,9d	1,9abcd	1,33f	0,27c	504,0 e	1,311abcd	1,56d	0,16fg	21,8bcddefg	56,8bcddef	67,3cdef	4,6efg
PN	10,74a	11,4	1423,1a	1,3cdef	23,0a	1,50a	2125,6a	1,309abcd	3,78a	0,56c	19,7bcddefg	12,2f	35,7gh	3,1fg
BL	1,21i	11,0	250,6fg	2,1ab	1,81f	0,17ef	397,2 ef	0,732cde	0,53g	0,05fg	32,8b	60,5bcde	43,8fg	4,1efg
LG	0,85jklm	10,6	188,8gh	2,2ab	0,99f	0,11efg	218,4 gh	0,575de	0,46g	0,03g	26,2bcde	67,6bcd	53,9defg	4,2efg
SG	1,82h	16,5	360,7e	2,0ab	1,21f	0,16ef	271,8 fgh	0,646de	1,24e	0,12fg	15,0efg	35,5cdef	68,2cdef	5,4defg
Suelos Restaurados														
TBL	0,89jklm	6,9	167,5gh	1,9abc	1,03f	0,113fgh	263,9 gh	0,860cde	0,481g	0,101fg	26,2bcde	96,6b	51,8defg	10,9ab
TMN	0,91jklm	10,1	143,3h	1,6bcde	0,95f	0,116fgh	139,3 h	0,809cde	0,565g	0,102fg	19,3 defg	88,9b	60,9cdefg	11,0ab
TVL	0,68lm	7,4	140,3h	2,1ab	0,82f	0,095fgh	238,4 gh	0,713cde	0,490g	0,067fg	30,8b	104,9b	74,3 cde	9,6bcd
TSB	0,65m	6,8	155,5h	2,4a	0,71f	0,029h	217,5 gh	0,979bcde	0,496g	0,099fg	33,1b	150,6 ^a	75,8cd	15,3a
TMT	0,78klm	9,9	177,3gh	2,3ab	0,72f	0,108fgh	338,5 fg	0,633de	0,647g	0,093fg	43,5a	81,2bc	85,5bc	12,4ab
TBE	0,77klm	8,8	122,0h	1,6bcde	0,70f	0,082gh	236,0 gh	0,716cde	0,906f	0,057fg	33,3b	93,0b	130,2a	8,1bcde
EBL	0,98ijkl	8,2	181,7gh	1,9abcd	1,26f	0,095fgh	233,2 gh	0,870cde	0,460g	0,066fg	24,1bcddefg	88,8b	46,7efg	6,7defg
EMIN	1,02ijk	9,4	182,8gh	1,8abcde	1,28f	0,093fgh	212,7 gh	0,909cde	0,650g	0,087fg	22,4bcddefg	89,1b	62,3cdefg	8,3bcde
EVL	1,22i	6,4	214,3gh	1,8abcde	1,49f	0,093fgh	317,7 fgh	0,847cde	0,610g	0,080fg	25,0bcddef	69,4bc	50,1defg	6,6defg
ESB	0,69lm	9,2	148,3h	2,1ab	0,80f	0,083gh	183,6 h	0,608de	0,386g	0,046g	27,3bcde	88,1b	55,67defg	6,5defg
EMT	0,91jklm	10,6	208,8gh	2,3a	1,20f	0,130efg	270,6 gh	0,695cde	0,393g	0,063fg	28,7bcd	76,4b	45,8efg	7,3cdef
EBE	1,10ij	8,9	187,5gh	1,9abc	1,46f	0,109fgh	200,5 gh	1,159abcde	1,075ef	0,124f	21,9bcddefg	105,4b	98,1b	11,4ab

Carbono (C), carbono orgánico extractable (COE), carbohidratos totales (CHT), y carbohidratos extractables (CHE), carbono de la biomasa microbiana (CBM), respiración basal (RB), actividad β -glucosidasa (GLU), actividad β -galactosidasa (GAL)

Para cada parámetro medias dentro de una misma columna, seguidas por la misma letra o letras minúscula no son significativamente diferentes $p < 0,05$ SNK.

valores de la relación CBM/C más altos aunque no significativamente diferente a los valores obtenidos en suelos enmendados con lodos compostados.

En general (excepto en los suelos naturales CR, MN y OR con valores más altos), los valores de respiración basal (**RB**) en los suelos naturales fueron similares a los suelos restaurados (Tabla 5.3). La incorporación de la enmienda orgánica a los suelos residuales ha activado los ciclos biogeoquímicos de los elementos en el suelo, generando una vegetación capaz de seguir suministrando compuestos orgánicos tanto a través de exudados radiculares como de sus propios restos vegetales (como sucede en los suelos que no han sufrido acción antrópica), que estimulan la actividad microbiana. Sin embargo la relación **RB/C** fue superior en los suelos restaurados; estos resultados sugieren que a pesar que en los suelos restaurados la mayor parte de la materia orgánica lábil se mineralizó en el primer año, aún existiría una mayor proporción de materia orgánica biológicamente activa. Los sustratos fácilmente degradables inducirían una microflora conformada principalmente por ecotipos de estrategia r (rápido crecimiento). Normalmente estos ecotipos respiran más CO₂ por unidad de C degradable que los ecotipos de estrategias K (lento crecimiento). Los ecotipos de estrategia K predominan en suelos que no han recibido materia orgánica fresca y han evolucionado a una cadena alimenticia de detritos más complejos (Insam, 1990).

En los suelos restaurados, los valores de las actividades enzimáticas **β-glucosidasa** y **β-galactosidasa** fueron en general significativamente inferiores a la mayoría de los suelos naturales estudiados (Tabla 5.3). La baja concentración de carbono en los suelos restaurados hace que no exista sustrato en el medio para activar la síntesis de esta enzima, por lo que los suelos bajo vegetación natural, con mayor contenido en carbono, presenten valores bastante más altos que aquellos de los suelos restaurados (García et al., 2000). Analizando en particular los valores de actividad β-glucosidasa en los suelos restaurados, podemos apreciar que no fueron significativamente diferentes de los encontrados en los suelos BL y LG, a excepción de las mezclas que contenían el lodo BE cuyos valores de actividad fueron superiores a los suelos mencionados. Los valores de la actividad β-galactosidasa no se diferenciaron significativamente de los valores encontrados en los suelos IG, BL, LG y SG, y los valores obtenidos en la mezcla BE-E fueron en general significativamente superiores a los suelos antes mencionados.

En general, los valores de ambas **actividades enzimáticas por unidad de C** (actividad enzimática específica) son algo más altos en los suelos restaurados respecto a los valores hallados en los suelos naturales, esto denotaría nuevamente que parte de la MO agregada a los suelos residuales no está todavía estabilizada. Valores elevados de actividad específica reflejan que la materia orgánica en los suelos disminuye a una tasa más elevada que la reducción de la actividad enzimática, por lo tanto se produce un incremento relativo de actividad de enzimas en función del C orgánico del suelo.

5.3.4 Análisis de Cluster

El análisis de Cluster se utilizó para estudiar la similitud entre suelos restaurados y naturales (Figura 5.1). Teniendo en cuenta un nivel de similitud del 92%, el dendrograma mostró cinco grupos de suelos que comparten características comunes. El primer grupo incluye los suelos BL, LG, SG, IG y todos los suelos restaurados, el segundo los suelos LT y VC, el tercero el suelo OR, el cuarto grupo los suelos CR y MN y el último grupo contiene sólo un suelo, PN.

Ha sido demostrado que el suelo tiende a mantener unos niveles determinados de materia orgánica, biomasa microbiana y actividad biológica en relación al clima (Insam, 1990), por lo tanto no es extraño que los indicadores biológicos que se han evaluado nos permitan agrupar los suelos restaurados junto con los suelos naturales con características climáticas y litológicas similares. Recordemos que los suelos naturales que integran el primer grupo son suelos carbonatados con un contenido de materia orgánica menor al 3%, y con pH superiores a 8 correspondientes a la zona más árida. Los suelos LT y VC dentro del segundo grupo no comparten características comunes, el suelo VC es un suelo calcáreo perteneciente a la depresión Central, en cambio el suelo LT tiene un material parental no calcáreo como los suelos del primer grupo y se encuentra generalmente en condiciones más húmedas. La inclusión de suelo LT en el cuarto grupo puede explicarse por las condiciones meteorológicas específicas del año 2006 en este área (elevadas temperaturas y muy escasas precipitaciones) y las características físicas de este suelo (86% arena). El suelo OR (dentro del grupo 3) desarrollado sobre roca calcárea es un típico suelo rojo Mediterráneo con un horizonte A descarbonatado sobre un horizonte B carbonatado. Los suelos MN y CR son suelos desarrollados sobre material no calcáreo con valores de pH inferiores a 6,5 y con un tipo de hábitat correspondiente a zonas húmedas. En el último grupo se encuentra el suelo PN desarrollado sobre roca calcárea y ubicado en una zona seca, pero con microclima de condiciones húmedas que permiten el desarrollo de un horizonte orgánico profundo.

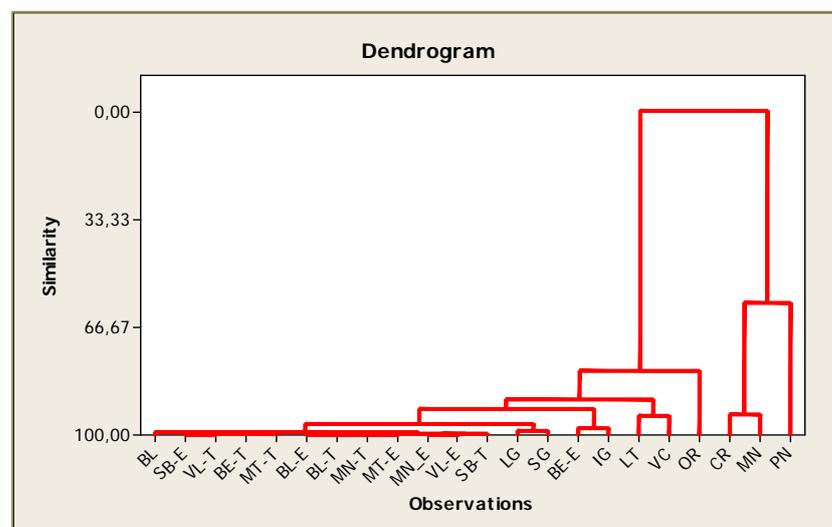


Figura 5.1 Dendrograma que muestra la agrupación de los suelos

Cuando se utiliza el mismo nivel de similitud (92%) que en el análisis de Clúster de suelos, el análisis de Clúster de variables muestra tres grupos de variables que tienen un comportamiento similar (Figura 5.2). El primer grupo compuesto por las variables C, CHT, CHE, CBM, COE y GLU, el segundo grupo por la variable GAL y el último grupo por la variable RB. Está claro que el primer grupo está asociado con el contenido de materia orgánica y las variables que la definen. La inclusión de la actividad β -glucosidasa y el CBM dentro de este grupo refleja la dependencia de estos parámetros del contenido de materia orgánica.

La β -galactosidasa que se presenta en el segundo grupo parece no estar tan ligada al contenido de materia orgánica o a la dinámica del carbono. La correlación negativa ($r = -0,894$ $P < 0,001$) que presenta esta enzima con respecto al pH del suelo nos sugiere que la actividad de esta enzima está regulada por este factor.

El último grupo está constituido por la respiración basal. En la dinámica de la materia orgánica, el carbono del suelo se puede compartimentalizar en tres grandes bloques: la biomasa microbiana como un compartimiento biológicamente activo del suelo, el carbono oxidable como un sustrato potencialmente mineralizable y el carbono del CO_2 como un producto de la actividad mineralizadora del primer grupo sobre el segundo, lo que sugiere que la RB debería encontrarse agrupada junto al CBM y COE. Sin embargo, cuando se analizan suelos que contienen carbonatos, como los suelos restaurados y algunos suelos naturales (VC, IG, BL, LG y SG), el rehumedecimiento de suelos alcalinos puede producir una producción abiótica de CO_2 (Hernández y García, 2003) y en suelos salinos parte del CO_2 puede quedar atrapado entre los intersticios del suelo formando carbonatos, los cuales en presencia de iones Mg^{2+} y Ca^{2+} , formarán sales (Anderson, 1982). De esta forma y teniendo en cuenta que la respiración del suelo está dada por la cantidad de CO_2 en relación con el peso de suelo y no a la cantidad real de células microbianas, la medida efectuada puede haber sido distorsionada y podría ser el motivo por el cual la RB forme un grupo aparte.

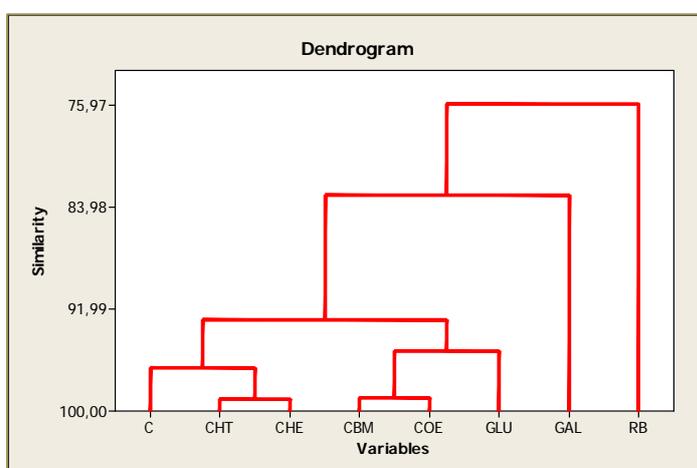


Figura 5.2 Dendrograma que muestra la agrupación de las variables en el conjunto de suelos

Si analizamos el comportamiento de las variables en los dos grupos de suelos separadamente podemos apreciar que la agrupación de las variables a un mismo nivel de similitud fue diferente. Mientras que en los suelos naturales, teniendo en cuenta un 72% de similitud todas las variables están dentro del mismo grupo (Figura 5.3), en los suelos restaurados teniendo en cuenta un nivel de similitud similar (70 %), obtenemos cuatro grupos de variables (Figura 5.4); el primer grupo está constituido por las variables C, CHT, COE; el segundo grupo por la variable CHE; el tercer grupo por la variable CBM y por el último grupo formado por las variables RB, GAL y GLU.

Podemos apreciar que dentro de los suelos restaurados existe una disminución de la conexión entre las propiedades bioquímicas y la materia orgánica de los suelos, agrupaciones que son habituales en los suelos climax y ecosistemas sin perturbar. La falta de estabilización de las hidrolasas, en general, refleja la menor madurez de estos suelos en comparación con los suelos naturales, en el que se estabilizan una gran proporción de hidrolasas por los coloides del suelo (Trasar-Cepeda *et al.*, 2008a).

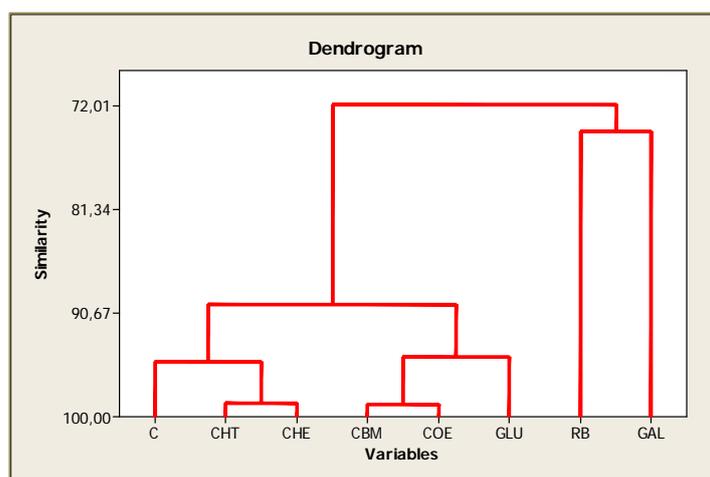


Figura 5.3 Dendrograma que muestra la agrupación de las variables en los suelos naturales

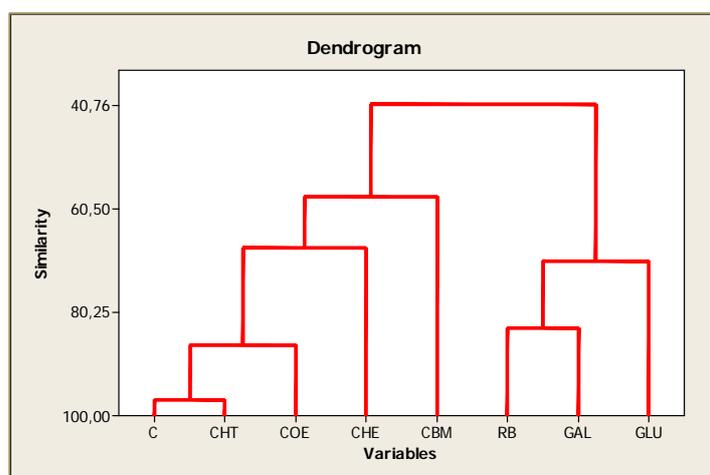


Figura 5.4 Dendrograma que muestra la agrupación de las variables en los suelos restaurados

5.3.5 Comparación entre suelos restaurados con lodos de EDAR provenientes de dos experiencias diferentes (RESMILOD y RUBAU).

En las Tablas 5.4 y 5.5 se presentan los valores de los parámetros físico-químicos y bioquímicos de los suelos utilizados como sustratos de restauración en las experiencias de RUBAU y RESMILOD en el muestreo inicial (M1).

Como podemos apreciar en la tabla 5.4 existen diferencias físico-químicas en cuanto a los sustratos utilizados en la restauración. En el caso de la cantera de RUBAU, los suelos utilizados fueron tierras de rebaje de obras de una zona cercana a la cantera, los cuales no tenían una calidad excesivamente baja, a pesar de que presentaban unos niveles relativamente bajos de materia orgánica. En cambio en la cantera del proyecto RESMILOD, se utilizó el material de rechazo del proceso productivo, (los residuos de la extracción y los residuos de trituración), suelos muy pedregosos y pobres en materia orgánica y nutrientes. Los valores de CBM, RB, CHT, CHE y actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa en los suelos control de RUBAU fueron superiores, probablemente como consecuencia del mayor contenido de materia orgánica (Tabla 5.5).

Tabla 5.4 Propiedades físico químicas de los suelos control utilizados en las experiencias RESMILOD y RUBAU en el muestreo inicial (M1)

		pH	C %	N %	C/N	T.F ^a %	CaCO ₃ %	Arena %	Limo %	Arcilla %
RESMILOD	Trituración	8,9	0,27	0,05	5,1	14,0	63,6	54,8	22,6	22,4
	Extracción	8,5	0,41	0,06	8,6	38,1	39,3	42,5	37,0	20,4
RUBAU		8,3	0,66	0,08	8,9	48,3	6,97	52,6	15,8	31,6

^a T.F: Tierra fina

Tabla 5.5 Propiedades bioquímicas de los suelos control de las experiencias RESMILOD y RUBAU en el muestreo inicial (M1)

		CBM	RB	CHT	CHE	GLU	GAL	N-AA mg g ⁻¹ suelo
RESMILOD	Trituración	32,63	nd	309	8,8	0,050	nd	0,002
	Extracción	45,02	0,182	572	30,0	0,086	nd	0,035
RUBAU		149,99	0,218	1218	138	0,184	0,016	0,073

Carbono biomasa microbiana (CBM): $\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo, Respiración basal (RB): $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$ suelo h^{-1} , Carbohidratos totales (CHT): $\text{mg glucosa kg}^{-1}$, Carbohidratos extraíbles (CHE): $\text{mg glucosa kg}^{-1}$, β -glucosidasa (GLU): $\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, β -galactosidasa (GAL): $\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. nd: no detectado

Los valores medios de los parámetros biológicos y bioquímicos obtenidos en el muestreo final de ambas experiencias se muestran en la tabla 5.6.

Los suelos restaurados de RUBAU presentaron valores superiores de CBM, carbohidratos totales y carbohidratos extraíbles y valores inferiores de respiración basal, actividad β -glucosidasa y β -galactosidasa que los hallados en los suelos restaurados RESMILOD (Tabla 5.6).

La menor actividad microbiana encontrada en los suelos de RUBAU luego de cinco años de agregada la enmienda podría ser atribuida a la estabilización de la materia orgánica que tuvo lugar durante ese período tiempo, en el cual materia orgánica lábil agregada al suelo con los lodos de depuradora fue metabolizada más rápidamente por los microorganismos del suelo (Spaccini et al, 2002), dando como resultado una continua re-síntesis microbiana y reciclaje de la biomasa (Sørensen, 1972). Durante ese período de tiempo, la biomasa microbiana fue secretando polisacáridos extracelulares que actuaron como agentes de unión para los agregados del suelo (Cheshire, 1979; Oades, 1984) dentro de los cuales quedó retenida materia orgánica. La inclusión de MO en los agregados puede explicar que una parte de la MO lábil de los suelos restaurados sea más estable, ya que, la MO acumulada en los microagregados esta protegida de la descomposición de los microorganismos y las enzimas debido a las barreras físicas entre el sustrato y la biomasa microbiana. Esta estabilización física se produce por la reducción en la difusión de oxígeno dentro de los microagregados y por la falta de agua que limitan la tasa de actividad microbiana (Six et al., 2002). Bartlett y Donner (1988) informaron mayores pérdidas por respiración desde la superficie del agregado que desde dentro del agregado, mostrando la inaccesibilidad de los microorganismos hacia el sustrato. Otro factor que podría influir en el incremento de la estabilidad de la materia orgánica de los lodos es el mayor contenido de arcilla y materia orgánica que presentaban los suelos utilizados como sustratos de restauración en RUBAU respecto a los sustratos de restauración utilizados en RESMILOD. De acuerdo a Loveland y Webb, (2003), la textura del suelo afecta al contenido de carbono orgánico de manera que cuanto mayor sea el contenido de arcilla en el suelo, mayor será su contenido de carbono orgánico. Annabi *et al.* (2007) observaron que cuando se añaden lodos de depuradora a un suelo franco limoso como enmienda orgánica, se incrementa la estabilidad de la materia orgánica como consecuencia de la fuerte cohesión que se da entre los componentes húmicos y los agregados.

Tabla 5.6 Propiedades bioquímicas de los suelos enmendados con lodos de depuradora en las experiencias RESMILOD y RUBAU correspondientes al último muestreo

Suelos Restaurados								
	RESMILOD				RUBAU			
	Mínimo	Máximo	Media±DS ^b	CV	Mínimo	Máximo	Media±DS	CV
C^a	0,65	1,22	0,88±0,2	20%	0,88	1,11	1,08±0,2	18%
CBM	166,1	300,4	236±38,51	16%	287,8	577,6	459,4±144,5	30%
RB	0,61	1,16	0,82±0,16	19%	0,19	0,29	0,24±0,07	29%
qCO₂	2	4,5	3,5±0,86	25%	1,37	1,62	1,44±0,42	29%
CHT	748	1310	1071±190	18%	1590	1650	1620±40	2,5%
CHE	29,3	131	95±25	26%	280	306	290±11	3,4%
GLU	0,39	1,07	0,60±0,21	35%	0,34	0,36	0,35±0,01	2,9%
GAL	0,046	0,124	0,08±0,02	28%	0,02	0,03	0,02±0,004	20%

^aCarbono (C): %, Carbono biomasa microbiana (CBM): $\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo, Respiración basal (RB): $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$ suelo h^{-1} , Carbohidratos totales (CHT): $\text{mg glucosa kg}^{-1}$, Carbohidratos extraíbles (CHE): $\text{mg glucosa kg}^{-1}$, β -glucosidasa (GLU): $\mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$, β -galactosidasa (GAL): $\mu\text{mol PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

^bDS: desvío estándar; CV: coeficiente de variación.

Las diferencias en los valores medios de los parámetros bioquímicos que se observan entre los suelos control y los suelos restaurados con lodos fueron superiores en los substratos de restauración de textura más gruesa (residuos de trituración), donde se observaron incrementos superiores al 100% (Figura 5.5). El bajo contenido inicial de materia orgánica de estos suelos probablemente sea la causa de tan significativos incrementos. El efecto estimulante de los lodos en los muestreos finales de ambas experiencias fue mayor en los residuos de trituración seguidos por los residuos de extracción y por último y con menor intensidad, en los substratos de restauración de la cantera de RUBAU. Jiménez *et al.*, (2007) también observaron que el incremento provocado en los parámetros bioquímicos por las enmiendas con lodos eran superiores en los suelos arenosos que en los suelos arcillosos.

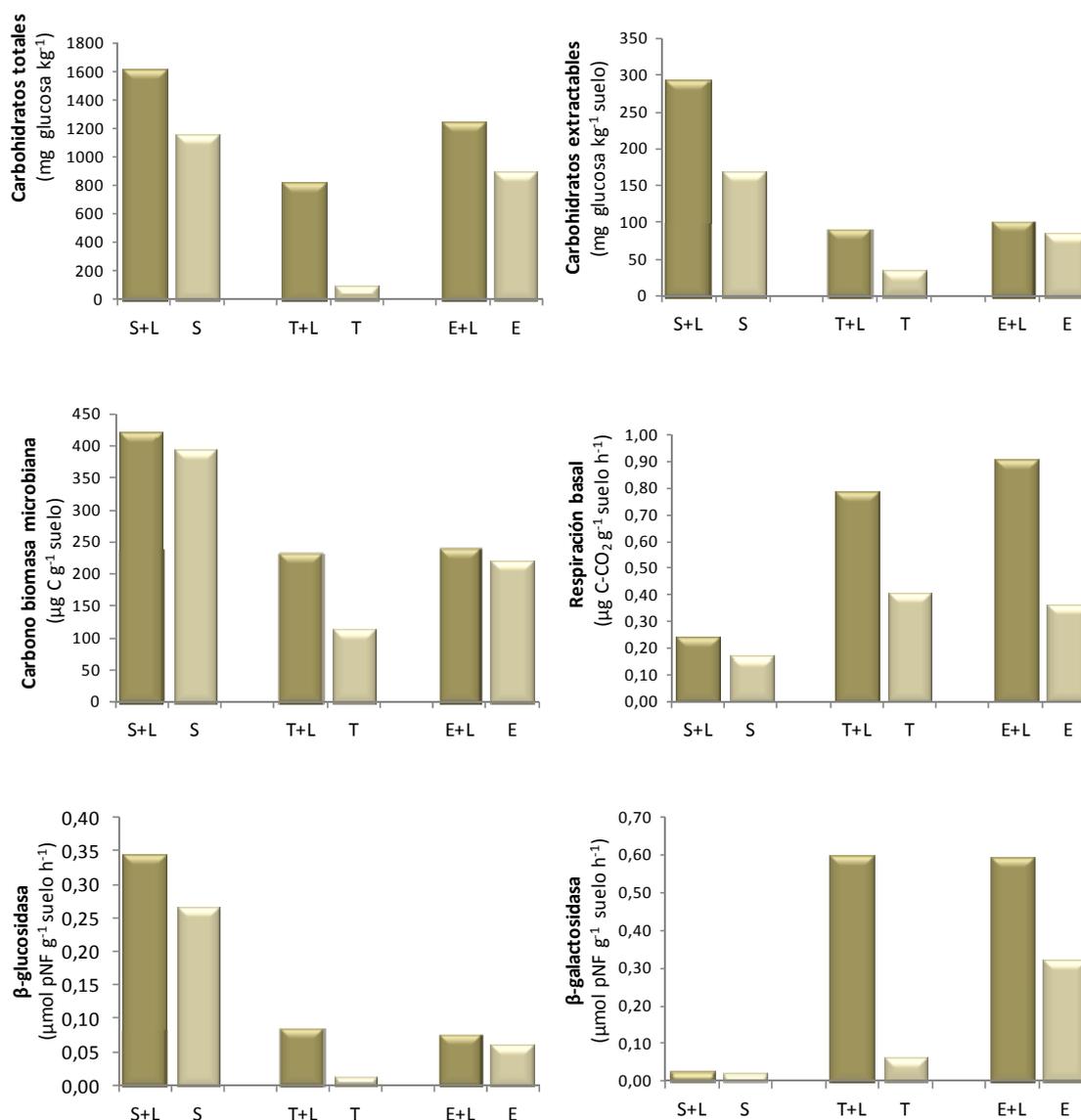


Figura 5.5 Diferencias en los valores medios de los parámetros bioquímicos entre los suelos restaurados y los suelos control en los muestreos finales. L-S: mezcla lodos suelo RUBAU, S: suelo RUBAU sin enmienda; L-T: media de las mezclas lodos suelo residual de Trituración, T: suelo residual de Trituración; L-E: media de las mezclas lodos suelo residual de Extracción, E: suelo residual de Extracción.

Con respecto a los parámetros específicos, que en el caso de RESMILOD los valores corresponden a las medias de las mezclas de ambos suelos residuales (T y E), podemos observar que la respiración por unidad de carbono fue superior en los suelos restaurados RESMILOD (Tabla 5.7). Esto, junto con la mayor relación de la actividad enzimática por unidad de C indica que quedan más componentes fácilmente oxidables de materia orgánica en RESMILOD. Debemos tener en cuenta que en RUBAU, las muestras se tomaron 5 años después de aplicado el lodo, y en RESMILOD solo un año después, por lo tanto en el caso de RUBAU ha habido mucho más tiempo para la estabilización de la materia orgánica. Wadman y Haan (1997) concluyen, desde un estudio de 20 años con 36 suelos, que aquellos suelos con bajos contenidos de C contienen relativamente grandes proporciones de C 'joven', lo que conduce a una

mayor mineralización inicial, y que la tasa de descomposición de C disminuye con el tiempo y eventualmente tiende a cero. En la medida que la disponibilidad de carbono sea menor, la comunidad microbiana respirará a una tasa mayor, manifestando una menor eficiencia metabólica como respuesta a la baja disponibilidad de nutrientes o sustratos como el carbono orgánico (Agnelli *et al.*, 2001). La fracción de MO que disminuye más fácilmente es la lábil, manteniendo casi constante el carbono humificado (Cambardella y Elliott, 1994). Las enzimas extracelulares pueden unirse a los coloides húmicos para formar complejos humo-enzimas que les confieren protección y contribuyen a su estabilización. La posibilidad de mantener un elevado potencial hidrolítico en el suelo como consecuencia de la estabilización de las enzimas, evita la necesidad de su síntesis continua (Nannipieri, 1994).

Tabla 5.7 Variables específicas en las mezclas lodos-suelo residual de 2 experiencias de restauración en Cataluña

	SUELOS RESTAURADOS					
	RESMILOD			RUBAU		
	Mínimo	Máximo	Media±DS	Mínimo	Máximo	Media±DS
CBM/C	19	43	27,6±6,5	43	45	44,2±1,2
RB/C	50,2	134,8	92,3±26,3	25	27	26,3±0,17
GLU/C	45,8	130,2	69,8±25,1	27,2	39,4	33,3±8,65
GAL/C	6,5	15,3	9,5±2,7	2,1	2,6	2,4±0,32

‡ Unidades: Carbono orgánico extraíble/Carbono (COE/C) en %; Carbono biomasa/Carbono (CBM/C) en mg g⁻¹ C, β-glucosidasa específica (GLU/C) y β-galactosidasa específica (GAL/C) en μmol pNP g⁻¹ C h⁻¹; Respiración basal/Carbono (RB/C) en μg C-CO₂ g⁻¹ C h⁻¹

5.3.6 Comparación del efecto del secado al aire y secado al aire y rehumedecimiento entre suelos naturales y suelos enmendados con lodos sobre CMB, RB, qCO₂ y las actividades enzimáticas de los suelos

En la tabla 5.8 podemos observar que el efecto del secado al aire sobre los valores de CBM, RB, qCO₂ en suelos naturales fue significativamente diferente al efecto causado sobre los suelos restaurados. En cambio, no se observaron diferencias significativas entre los efectos provocados por el secado al aire en los valores de ambas actividades enzimáticas para ambos tipos de suelos.

Tabla 5.8 Prueba t para la comparación de medias de las diferencias en los valores de carbono de la biomasa microbiana (CBM), respiración basal (RB), cociente metabólico (qCO₂) y actividades β-glucosidasa (GLU) y β-galactosidasa (GAL) obtenidos en muestras de suelos secos al aire y muestras a humedad de campo en suelos naturales y en suelos restaurados suponiendo varianzas desiguales.

	CBM		RB		qCO ₂		GLU		GAL	
	SR ^a	SN	SR	SN	SR	SN	SR	SN	SR	SN
Media	-0,4	106,7	-0,182	-0,613	-14,43	-1,235	-0,062	-0,1695	-0,0988	0,04527
Varianza	1386,30	10973,11	0,183	0,124	220,774	0,4814	0,0110	0,0670	0,0791	0,007
Observaciones	12	10	12	10	12	10	12	10	12	10
P(T<=t) dos colas	0,011		0,017		0,011		0,243		0,116	

SR: suelos restaurados; SN: suelos naturales

Los valores medios de **CBM** en las muestras de suelos naturales secos al aire fueron significativamente menores que aquellos de suelos a humedad de campo. En cambio, en los suelos enmendados con lodos no se observaron diferencias significativas luego del pre-tratamiento. Los suelos utilizados en nuestro experimento tienen una gran cantidad de elementos gruesos que les proporciona una elevada porosidad y un diámetro equivalente de poro también grande, lo que les confiere unas características muy limitadas como reservorio de agua útil. Estas características podrían otorgar resistencia a la comunidad microbiana al secado al aire del suelo. Sparling *et al.*, 1987, sugieren que las poblaciones microbianas de suelos secos fueron más resistentes a la desecación y consecuentemente fueron estos suelos los que mostraron menores cambios con el secado al aire, posiblemente debido a las mayores proporciones de esporas que pueden haberse formado como una adaptación al contenido de agua cada vez menor. La capacidad de recuperación de la biomasa microbiana podría estar dada por una pre-adaptación al estrés de humedad. Estas diferencias encontradas en el CBM entre suelos naturales y suelos restaurados frente al pre-tratamiento podrían atribuirse también a diferencias en la composición de la comunidad microbiana. Es probable que una gran proporción de bacterias en el suelo estén en un estado “inactivo” debido a la baja disponibilidad de C, y la mayoría de las bacterias son más resistentes al estrés en este estado que cuando su actividad es mayor (Bakken, 1997).

Se observaron diferencias en cuanto a la **RB** de los suelos naturales, en las cuales el secado al aire aumentó la liberación de CO₂ de todas las muestras y en cambio en los suelos enmendados con lodos, solo la mitad de las muestras analizadas aumentaron los valores de RB, en las mezclas restantes en general no hubo diferencias significativas con respecto a las muestras a humedad de campo, o se observaron menores valores en las muestras secas (mezclas BE-T y MT-T). Como ya explicamos en los capítulos anteriores, el C respirado después del rehumedecimiento puede provenir tanto del “turnover” de la biomasa como de la materia orgánica que previamente no estaba disponible. Los suelos naturales tienen un mayor contenido de biomasa microbiana y un mayor contenido de materia orgánica que los suelos restaurados, por lo tanto esto podría explicar los mayores incrementos observados luego del rehumedecimiento en estos suelos.

Por otra parte, los suelos restaurados contiene caliza activa, que como es un carbonato puede formar una capa alrededor de la materia orgánica, haciéndolo menos disponible para la biodegradación (Soltner, 1990, citado por Bohom, et al 2001). Van Gestel *et al.* (1993), consideran que la contribución de la materia orgánica no-biomásica al pulso de mineralización está influenciada por la concentración y la calidad del carbono orgánico del suelo y por las características del suelo, como textura y microporosidad. Muchos estudios han demostrado que el rehumedecimiento de un suelo seco puede causar inicialmente un flujo (de vida corta) de C, N y fósforo (P) a la solución del suelo e incrementar la tasa de respiración del suelo. Una de las causas de la liberación de estos elementos a la solución del suelo es la dispersión de los agregados. Es sabido que la agregación de suelo puede influir en la accesibilidad, la biodegradabilidad o el transporte de contaminantes apoyado por los microbios y la fauna (Ojeda *et al.*, 2008). Cuando se produce la dispersión de los agregados del suelo por el agua, aumenta la extractabilidad de la materia orgánica no biomásica y expone nuevas superficies del suelo al ataque microbiano (Fierer y Schimel, 2003). Otra causa posible que podría explicar el incremento de la materia orgánica no biomásica que aumenta el pulso respiratorio, es la liberación de solutos orgánicos acumulados por los microorganismos durante el secado del suelo.

Las diferencias en los valores de qCO_2 provocadas en los suelos restaurados por el secado al aire fueron significativamente mayores que las ocasionadas por el mismo pre-tratamiento en los suelos naturales. Sparling (1997), hace referencia al qCO_2 como un indicador de la inmadurez del ecosistema, reflejando la actividad metabólica de la microflora. Es probable que la estructura de la comunidad microbiana en suelos degradados y restaurados y de los suelos naturales sea diferente, porque la degradación y restauración puede haber llevado a un cambio en las poblaciones microbianas menos resistentes al estrés o a la perturbación. Las células "jóvenes" y poblaciones conformadas principalmente por ecotipos de estrategia-R, característica para las primeras etapas de la sucesión, normalmente tienen una mayor respiración específica que las células "antiguas" o de estrategia-K (Insam, 1990). La primera estrategia (estrategia r) es producir un número masivo de individuos, de los cuales unos pocos sobrevivirán. Su población mantiene un crecimiento exponencial hasta desaparecer bruscamente cuando las condiciones cambian. Es lo que sucede, por ejemplo, cuando llueve. La segunda estrategia (estrategia k) es tener una tasa reproductiva baja.

Las diferencias observadas por los tratamientos del secado al aire (Tabla 5.8) y del secado al aire y rehumedecimiento del suelo (Tabla 5.9) sobre los valores de las actividades **β -glucosidasa** y **β -galactosidasa** en los suelos restaurados no fueron significativamente diferentes de las observadas en los suelos naturales.

De acuerdo a Burns (1982), el total de la actividad de una enzima en el suelo está conformado por actividades relacionadas con diferentes componentes del suelo: microorganismos vivos, otras fracciones están asociadas con la materia vivientes, partículas de la matriz del suelo y el resto está presente en la solución de agua del suelo (enzimas libres). En los suelos naturales, a pesar de la reducción en la

población microbiana luego del secado al aire, la actividad bioquímica permanece en el suelo, probablemente las enzimas en su mayoría están protegidas por los coloides del suelo y generalmente tienen una larga vida-media (García., *et al* 2000). En los suelos restaurados la actividad enzimática parece ser más dependiente de la biomasa microbiana.

Tabla 5.9 Prueba t para la comparación de medias de las diferencias en los valores de las actividades β -glucosidasa (GLU) y β -galactosidasa (GAL) obtenidos en muestras de suelos secos al aire y rehumedecidas y muestras a humedad de campo en suelos naturales y en suelos restaurados suponiendo varianzas desiguales de dos muestras suponiendo varianzas desiguales.

	GLU ^a		GAL	
	SR ^b	SN	SR	SN
Media	-0,041	-0,424	-0,029	-0,167
Varianza	0,0407	0,2933	0,0009	0,0794
Observaciones	12	10	12	10
P(T<=t) dos colas	0,058		0,156	

^aGLU: β -glucosidasa, GAL: β -galactosidasa,

^bSR: suelos restaurados; SN: suelos naturales

Los resultados muestran que el rehumedecimiento de las muestras de suelo secas al aire, tanto en los suelos naturales como en los suelos enmendados con lodos aumenta la actividad enzimática con respecto a la actividad obtenida en las muestras a humedad de campo. En ambos casos las pendientes obtenidas de regresiones lineales simples de los valores de las actividades enzimáticas entre muestras de suelo secas al aire y rehumedecidas y muestras de suelo a humedad de campo muestran desviaciones con respecto a los niveles de la enzima inicial. Las ecuaciones obtenidas sobreestiman los valores de las muestras a humedad de campo.

6

RESULTADOS MÁS RELEVANTES

6

RESULTADOS MÁS RELEVANTES

En el presente apartado se presentarán y discutirán los resultados más relevantes alcanzados en esta Tesis.

6.1 Efectos generales de la aplicación de lodos sobre los suelos residuales

La aplicación de lodos a los suelos residuales tenía como finalidad incrementar los valores de MO hasta un 2% , estimular y optimizar los procesos biológicos del suelo, favorecer el reciclaje de nutrientes y posibilitar el establecimiento de la cobertura vegetal. El desarrollo de la vegetación mantendría la fertilidad del suelo mediante el sondeo del suelo en busca de nutrientes, la acumulación en su biomasa y posteriormente su transferencia a la materia orgánica del suelo, la cual se mineralizaría aportando nuevamente nutrientes a las plantas.

Los resultados que se han presentado demuestran que la adición de lodos de depuradora, tanto de secado térmico como compostados, mejoró claramente la fertilidad de los suelos residuales procedentes de una cantera de piedra caliza en términos de sus características físico-químicas y biológicas. Se ha puesto de manifiesto la persistencia de los efectos de la adición de lodos de depuradora sobre los residuos de trituración y extracción al final del experimento de restauración.

El añadido de lodos ha conseguido una clara reducción de la deficiencia en materia orgánica, en nutrientes y en fertilidad bioquímica de los residuos de la explotación utilizados en el proceso de restauración. Las mezclas lodo-suelo residual han alcanzado un nivel medio de materia orgánica de 1,6%, lo que significa haber doblado prácticamente el valor de este contenido en los residuos no enmendados; la materia orgánica se ha ido estabilizando con el tiempo. El contenido medio en N de las mezclas ha alcanzado el 0,11% (1,5 veces el de los suelos residuales). El añadido de lodos ha significado doblar aproximadamente los contenidos medios de carbohidratos totales (valor medio en las mezclas de 1,1 mg g⁻¹) y solubles (valor medio en las mezclas de 0,1 mg glucosa g⁻¹) de los residuos. La biomasa microbiana de los residuos se ha aumentado 1,5 veces (valor medio en las mezclas de 2381 µg de C g⁻¹) y las actividades β-glucosidasa (0,62 µmol g⁻¹ h⁻¹) y β-galactosidasa (0,085 µmol g⁻¹ h⁻¹) se han triplicado. Las mezclas con lodos compostados han presentado valores algo superiores de materia orgánica y N que las mezclas con lodos de secado térmicos. Los altos niveles iniciales de biomasa microbiana y respiración basal detectados en el suelo como consecuencia de las importantes cantidades de compuestos orgánicos

lábiles agregados con los lodos de secado térmico (excepto el lodo SB) se reducen durante el primer año luego de la aplicación de los lodos.

Los valores de los parámetros bioquímicos de los suelos restaurados estuvieron dentro del rango de valores presentados por los suelos naturales BL, LG, SG y IG, caracterizados como suelos carbonatados con un contenido de orgánica menor al 3%, y con pH superiores a 8 correspondientes a la zona más árida.

En los suelos restaurados existe una baja de correlación entre las propiedades bioquímicas (CBM, RB, GAL y GLU) y los parámetros relacionados con la materia orgánica de los suelos (C, CHT, COE), agrupaciones que son habituales en los suelos climax y ecosistemas sin perturbar, lo que nos indicaría que en los suelos restaurados no están en equilibrio.

6.2 Efectos del tipo de lodo utilizado en el proceso de restauración

Al inicio de la experiencia, el lodo térmico **MT** proporcionó a las mezclas los mayores contenidos de materia orgánica (MO) y junto al lodo térmico **BE** y el lodo compostado **VL** (sometido a digestión aeróbica) fueron los que presentaron los valores más altos de carbono orgánico extraíble (COE) y carbohidratos extraíble (CHE). Sin embargo, los valores de materia orgánica alcanzados al final del experimento no mostraron diferencias significativas entre lodos térmicos y compostados. Luego de 13 meses de agregada la enmienda, tampoco encontramos diferencias en el contenido de COE y RB. En el resto de los parámetros, solamente las mezclas con el lodo MT presentaron valores significativamente superiores de CBM (mezclas con los valores iniciales más altos de MO, fuentes de C y energía para los microorganismos) y las mezclas con el lodo SB valores significativamente menores de CHT (parámetro afectado por el desarrollo de la población microbiana).

Teniendo en cuenta los resultados de Fernández *et al.* (2007), quienes encontraron que más del 25% del C orgánico proveniente de los lodos térmicos se mineraliza después de 60 días, mientras que en el caso de los lodos compostados este porcentaje no supera el 3%. Nosotros hemos observado que, excepto en las mezclas con el lodo térmico MT, los niveles de MO alcanzados luego de la incorporación de los lodos se han conservado. Esto nos hace suponer que se ha producido un recambio, es decir, que las pérdidas por mineralización de las fracciones lábiles de los lodos han sido compensadas por la incorporación de nuevos componentes orgánicos, fundamentalmente vegetales.

La incorporación de lodos a los suelos residuales incrementó los valores de su cociente metabólico microbiano (qCO_2). Al final del período experimental, los valores de qCO_2 disminuyeron y no se observaron diferencias entre los suelos tratados y los controles. El aumento en el qCO_2 puede ser atribuido a una perturbación (temporal) a la que son sometidos los microorganismos a causa de la adición de materia orgánica o a un estrés (permanente) debido a la presencia de metales pesados (Sánchez-Monedero *et al.*, 2004). En nuestro caso y teniendo en cuenta que, en general se trata de lodos con un

contenido bajo de metales, y que por ejemplo las mezclas con el lodo MN que contienen la mayor cantidad de metales pesados (datos no mostrados) y la menor cantidad de COE presenta uno de los menores incrementos en el qCO_2 , podríamos sugerir que el aumento inicial del qCO_2 está relacionado con el grado de estabilización de la MO y no con el contenido de metales pesados. Una modificación temporal del equilibrio del suelo en lugar de un estrés permanente también es apoyada por la tendencia decreciente del qCO_2 en los suelos enmendados con lodos. Nicholson y Wardle (1994), indican que los sustratos que se degradan rápidamente muestran una disminución en el qCO_2 a medida que desaparece el sustrato.

Las fracciones lábiles de la materia orgánica también contienen cantidades considerables de N lábil. Los niveles de N orgánico y de proteína parecen estar vinculados al proceso de tratamiento de aguas residuales que genera cada tipo de lodo (Hattori y Mukai, 1986). En el muestreo inicial, las mezclas realizadas con lodos de secado térmico (excepto el lodo térmico Sabadell) presentaron mayores valores de N-aminoácido (expresado como porcentaje del N orgánico total) que los lodos compostados y fueron las mezclas que sufrieron la mayor mineralización del N-aminoácido posiblemente debido a sus mayores contenidos de materia orgánica fácilmente degradable. Mejía (2005), observó que en los lodos de secado térmico el contenido de aminoácidos totales es prácticamente el mismo que en el lodo deshidratado, lo que implica que no hay pérdida de aminoácidos durante el tratamiento térmico. En cambio, el proceso de compostaje del lodo reduce aproximadamente un 50% el contenido de aminoácidos totales respecto al lodo deshidratado, como consecuencia de la degradación de aminoácidos y proteínas durante el proceso.

Los lodos de secado térmico, del mismo modo que los lodos compostados, constituyen una fuente alternativa de materia orgánica y nutrientes para los suelos, ya que contribuyen en la mejora de sus propiedades bioquímicas, y por consiguiente, de su calidad. No obstante, conviene resaltar que estas enmiendas pueden contener elementos tóxicos y el conocimiento de su dinámica en los suelos es de vital importancia para minimizar los riesgos que pueden conllevar sobre el medioambiente.

Los resultados expuestos nos hacen ver la importancia de centrar los estudios en las primeras etapas luego de la aplicación de los lodos porque es en este período cuando se producen los cambios más importantes y las mayores diferencias entre los distintos tipos de lodos.

6.3 Efectos del tipo de suelo residual utilizado en el proceso de restauración

El efecto del tipo de suelo residual empleado como sustrato sólo fue patente sobre los parámetros que caracterizan la composición de la materia orgánica del suelo: carbono orgánico extraíble, carbohidratos totales y carbohidratos extraíbles, sin embargo no afectó el carbono de la biomasa microbiana, la respiración basal y las actividades enzimáticas. Evidentemente estos parámetros estaban más condicionados inicialmente por el material orgánico de procedencia que por el suelo residual

empleado. Con muy pocas excepciones, los parámetros que se vieron afectados significativamente por el tipo de suelo residual fueron mayores en los suelos residuales de extracción (E) que en los suelos residuales de trituración (T).

Estas diferencias pueden ser justificadas por las distintas características que presentaban estos dos tipos de suelos residuales. Los suelos residuales de extracción (E) contienen más tierra fina, limo y materia orgánica; tienen mayor capacidad de retención hídrica y mayor fertilidad bioquímica; contienen aproximadamente un 25% de fracciones menores de 0,5 mm; en cambio, los suelos residuales de trituración (T) contienen proporciones significativamente superiores de elementos gruesos ($> 2 \text{ mm } \emptyset$), carbonatos totales, cal activa y arena. Los efectos negativos de los fragmentos gruesos en la productividad más frecuentemente citados (Fernández-Sanjurjo, 1999) se relacionan con la reducción del espacio radical, la disminución de la capacidad de almacenamiento total de agua y del contenido de nutrientes e incremento excesivo de la temperatura del suelo. Los efectos en las mezclas con los suelos residuales T debidos a la menor capacidad de retención de agua, el mayor contenido de cal activa y el incremento excesivo de la temperatura, factores que facilitaron la mineralización de los materiales orgánicos tal como ha sido observado por Saña et al. (1996), fueron observados al final del período experimental. En cambio en las mezclas con el suelo residual de extracción, la materia orgánica del suelo (MO) sufrió menores tasas de mineralización del C. En este caso, el mayor contenido de tierra fina de estos suelos podría actuar como una barrera de protección, ya que la MO podría estar adsorbida sobre la superficie de las partículas de arcilla y limo, o podría estar recubierta por los minerales de arcilla (Tisdall y Oades, 1982; Golchin *et al.*, 1994) o se podría localizar dentro de los microagregados, fuera del alcance de los microorganismos (Elliott y Coleman, 1988).

Los resultados obtenidos, constituyen una aportación interesante para la integración de los residuos de trituración en el marco de la restauración de zonas afectadas por actividades extractivas.

6.4 Efecto del pre-tratamiento de las muestras de suelo sobre los parámetros analizados

En el presente trabajo hemos demostrado que, tanto para muestras de suelos naturales como para muestras de suelos restaurados, recolectados en primavera-verano, los valores obtenidos en muestras de suelo secas al aire para biomasa microbiana (CBM) y las actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa fueron representativos de los obtenidos en muestras a humedad de campo. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos por Zornoza *et al.* (2007^a), el secado al aire incrementó significativamente, en la mayoría de los suelos estudiados, los valores de respiración basal respecto a los obtenidos en las muestras a humedad de campo.

El secado al aire y rehumedecimiento de las muestras de suelo produce aumentos en la actividad enzimática con respecto a la actividad obtenida en muestras a humedad de campo y las estimaciones en estas condiciones no son representativas de los valores obtenidos en muestras a humedad de campo. Estos aumentos en la actividad enzimática coinciden con los resultados obtenidos por Fierer y Schimel, 2002 en un experimento con suelos bajo clima Mediterráneo donde se programó la frecuencia de los eventos de secado y rehumedecimiento durante dos meses para determinar como la historia del estrés influye en la respuesta de la comunidad microbiana a los eventos de rehumedecimiento. Tabatabai y Bremner, 1970b, sugieren que el aumento observado en la actividad enzimática luego del secado y rehumedecimiento del suelo puede ser la consecuencia de la disrupción de los agregados del suelo que expone el sustrato a las enzimas estabilizadas. Kuprevich y Scherbajova, 1971, explican este aumento como la consecuencia de la inducción de las enzimas debido a la liberación de sustratos de las células lisadas. Sin embargo, otros autores como Hinojosa *et al.* (2004), Lee *et al.* 2007 y Zornoza *et al.* 2006, no observaron incrementos en los valores de la actividad β -glucosidasa luego del rehumedecimiento de un suelo seco al aire. Esta variabilidad en los resultados en el efecto del rehumedecimiento de un suelo seco sobre la actividad β -glucosidasa podría explicarse por diferencias en las características del ecosistema regional (textura del suelo, régimen de humedad, régimen de temperatura, etc.).



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Suelos Naturales

- Los parámetros bioquímicos están generalmente dentro del rango de valores previamente publicados para suelos nativos bajo condiciones mediterráneas.
- Las variables carbohidratos totales y carbohidratos extraíbles fueron los parámetros que presentaron mayor variabilidad y la respiración basal fue la que presentó menor variabilidad.
- Las variables Carbono, carbohidratos totales, carbohidratos extraíbles, Carbono de la biomasa microbiana y la actividad β -glucosidasa fueron apropiadas para caracterizar los diez suelos estudiados.

Suelos Restaurados con lodos de EDAR

- La adición de lodos de depuradora mejoró claramente la fertilidad de los suelos residuales procedentes de una cantera de piedra caliza en términos de sus características fisicoquímicas y biológicas.
- La pérdida de materia orgánica fue menor en las mezclas que contenían lodos compostados. Un año después de la adición de lodos una fracción de la materia orgánica de las mezclas continuaba siendo moderadamente lábil. El efecto de los lodos disminuyó más en el tiempo en los parámetros asociados a la materia orgánica fácilmente degradable (carbono orgánico extraíble, carbohidratos extraíbles, carbono de la biomasa microbiana, respiración basal). La pequeña disminución del valor de carbohidratos totales confirma la alta estabilidad atribuida a este parámetro.
- Los exudados radiculares y los restos vegetales contribuyeron a incrementar las actividades de β -glucosidasa y β -galactosidasa. Las actividades enzimáticas de las mezclas correspondían en parte a las enzimas libres en la capa acuosa de suelo y una parte de la actividad de β -glucosidasa estaba probablemente asociada a coloides húmicos.

- El efecto de lodos difirió en función de los tratamientos que han recibido los mismos. Los lodos de secado térmico BE (sin digerir) y MT (digestión anaeróbica) tuvieron inicialmente los efectos más altos y estos efectos disminuyeron drásticamente al final del experimento. El lodo VL, digerido aeróbicamente, fue uno de los que presentó los valores más altos de carbono orgánico extraíble y carbohidratos extraíbles, y estos efectos disminuyeron al final del experimento. El lodo SB, suministrado en forma de pellets, tuvo el efecto inicial más bajo, pero al final del experimento su efecto fue similar al de los otros lodos. El lodo en que el proceso de compostaje había sido más eficaz, MN, presentó los valores iniciales más bajos de carbono orgánico extraíble y carbohidratos extraíbles. El efecto del lodo compostado BL fue intermedio. El tipo de post-tratamiento de los lodos no afectó significativamente el contenido de aminoácidos totales. Las mezclas con los lodos BE y MT presentaron en el muestreo inicial el mayor contenido de aminoácidos como porcentaje del contenido de N orgánico.
- El efecto del tipo de suelo residual empleado como substrato sólo fue patente sobre los parámetros que caracterizan la composición de la materia orgánica del suelo: carbono orgánico extraíble, carbohidratos totales y carbohidratos extraíbles, sin embargo no afectó el carbono de la biomasa microbiana, la respiración basal y las actividades enzimáticas, lo que sugiere que estos parámetros estaban más condicionados inicialmente por el material orgánico de procedencia que por el suelo residual empleado.
- Los indicadores biológicos evaluados nos permiten agrupar los suelos restaurados junto con los suelos naturales con características climáticas y litológicas similares, es decir suelos carbonatados con un contenido de materia orgánica inferior al 3%, y con pH superiores a 8 correspondientes a la zona más árida
- La conexión entre las propiedades bioquímicas y la materia orgánica de los suelos restaurados fue menor en comparación con la de agrupaciones encontradas en los suelos naturales en los que existe un equilibrio entre los diferentes ciclos biogeoquímicos.
- Los suelos restaurados RESMILOD mostraron luego de un año de agregada la enmienda una menor estabilización de la materia orgánica respecto a los suelos restaurados de RUBAU 5 años después de aplicado el lodo.

Efecto del pre-tratamiento en los suelos

Con respecto a la validez de los pre-tratamientos en las evaluaciones de las diferencias entre los suelos podemos concluir lo siguiente:

- El secado al aire de las muestras de suelo resultó ser un pre-tratamiento adecuado para determinar la biomasa microbiana.
- El secado al aire de las muestras de suelo modificó el rango de valores de respiración basal y el pulso de CO₂ existentes en las muestras a humedad de campo. Consideramos que la mineralización de la materia orgánica no biomásica liberada por la dispersión de los agregados del suelo por el agua fue la principal causa del aumento en la respiración basal.
- El secado al aire de las muestras de suelo naturales no modificó el rango de los valores de las actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa existentes en las muestras a humedad de campo. Sin embargo, este pre-tratamiento modificó el rango de los valores de las actividades enzimáticas en los suelos restaurados.
- El secado al aire y rehumedecimiento de las muestras de suelo produce aumentos en las actividades β -glucosidasa y β -galactosidasa con respecto a las actividades obtenidas en muestras a humedad de campo y las estimaciones en estas condiciones no son representativas de los valores obtenidos en muestras a humedad de campo.



8

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA

- ACA Agencia Catalana del Agua (en línea) Disponible en http://aca-web.gencat.cat/aca/documents/ca/publicacions/memoria2008/memoria_esp_ACA_2008.pdf
- Agnelli, A., Ugolini, F.C., Corti, G, Pietramellara, G., 2001. Microbial biomass-C and basal respiration of fine earth and highly altered rock fragments of two forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 33 : 613-620.
- Ajwa, H.A., Tabatabai, M.A., 1994. Decomposition of different organic materials in soils. *Biol. Fertil. Soils*, 18:175- 182.
- Albaladejo, J., Castillo, V., Díaz, E., 2000. Soil loss and runoff on semiarid lands as amended with urban solid refuse. *Land Degrad. Dev.*, 11: 363–373.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F., 2000. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Biores. Technol.*, 75: 43-48.
- Albiach R, Canet R, Pomares F, Ingelmo, F. 2001.Organic matter components and aggregate stability after the application of different amendments to a horticultural soil. *Bioresource Technology*, 76: 125-129.
- Alcañiz, J.M., Boixadera, J., Felipó, M.T., Ortiz, O., Poch, R.M. 2005. El paper dels sòls de Catalunya en el canvi climàtic. A: Llebot, J.E. (Ed). Informe sobre el canvi climàtic a Catalunya. Consell assessor per al desenvolupament sostenible. Generalitat de Catalunya. Institut.d'Estudis.Catalans. pp: 555-605.
- Alcañiz, J.M., Ortiz, O., Carabassa, V. 2009. Utilización de lodos de depuradora en restauración Manual de aplicación en actividades extractivas y terrenos marginales. *Centro de Investigación Ecológica y Aplicaciones Forestales. Generalitat de Catalunya. Departamento de Medio Ambiente y Vivienda. Agencia Catalana del Agua.*
- Alexander, M., 1971. Agriculture's responsibility in establishing soil quality criteria. In: *Environmental Improvement—Agriculture's Challenge in the Seventies*. National Academy of Sciences, Washington, DC, pp. 66–71.
- Allison, S.D., Vitousek, P.M., 2005. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biol. Biochem.*, 37:937-944.
- Alvarez, R., Alconada, M., Lavado, R., 1999. Sewage Sludge Effects on Carbon Dioxide-Carbon Production from a Desurfaced Soil. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 30: 1861-1866.
- Alvarez, R., Alvarez, C.R., 2000. Soil organic matter pools and their associations with carbon mineralization kinetics. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64:184-189.
- Álvarez R. y Lavado R.S. 1998. Climate, organic matter and clay content relationships in the Pampa and Chaco soils, Argentina. *Geoderma*, 83: 127-141.

- Álvarez, A., Seoane, S., Vidal, M., López, A., Santaolla, C., Mezquita, F. y Teijeiro, M.T., 1997. Utilización de lodos de pizarra en la recuperación de escombreras (II). Utilización como sustrato de vegetación. *Tecnoambiente*. Vol 69. Pag: 60-63.
- Anderson, D.W., 1979. Processes of humus formation and transformation in soils of the Canadian Great Plains. *J. Soil Sci.*, 30:77-84.
- Anderson, T.H., 1994. Physiological analysis of microbial communities in soil: applications and limitations. *In*: K. Ritz, J. Gighton & K. E. Giller (eds.) *Beyond the biomass*. John Wiley & sons, BSSS, Sayce Publishing.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 10:215-221.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1985. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in dormant state. *Biol. Fertil. Soils.*, 1:81-89.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1986. Carbon link between microbial biomass and soil organic matter *Perspectives in Microbial Ecology. Proceedings of the 4th International Symposium on Microbial Ecology* 1986 Ljubljana, Yugoslavia, pp. 467-471.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1989. Ratios of microbial biomass carbon to total carbon in arable soils. *Soil Biol. Biochem.*, 21:471-479.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1990. Application of eco-physiological quotients (qCO_2 and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping stories. *Soil Biol. Biochem.*, 22:251-255.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 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 the soil. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 393-395.
- Annabi, M., Houot, S., Francou, C., Poitrenaud, M., Le Bissonnais, Y., 2007. Soil aggregate stability improvement with urban composts of different maturities. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 71: 413-423.
- Arshad, M.A., Coen, G.M., 1992. Characterization of soil quality: Physical and chemical criteria. *American J. of Alternative Agriculture*, 7: 25-31.
- Badalucco, L., Nannipieri, P., Greco, S., 1990. Microbial biomass and anthrone-reactive carbon in soils with different organic matter contents. *Soil Biol. Biochem.*, 22:899-904.
- Badalucco, L., Gelsomino, A., Dell'orco, S., Grego, S. y Nannipieri P. 1992. Biochemical characterization of soil organic compounds extracted by 0.5 M K_2SO_4 before and after chloroform fumigation. *Soil Biol. Biochem.*, 24:569-578.
- Bakken, L.R., 1997. Culturable and unculturable bacteria in soil. *In*: "Modern Soil Microbiology", vanElsas, J.D., Wellington, E.M.H., Trevors, J.T. (Eds) Marcel Decker. pp 47-61.
- Bandick, A.K., Dick, R.P., 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1471-1479.
- Barajas-Aceves, M., 2005. Comparison of different microbial biomass and activity measurement methods in metal-contaminated soils. *Biores. Technol.*, 96: 1405-1414.

- Bardgett, R.D., Saggiar, S., 1994. Effect of heavy metal contamination on the short-term decomposition of labelled (^{14}C) in a pasture soil. *Soil Biol. Biochem.*, 26:727-733.
- Barrios, E., Delve, R.J., Bekunda, M., Mowo, J., Agunda, J., Ramisch, J., Trejo, M.T., Thomas, R.J., 2006. Indicators of soil quality: A South-South development of a methodological guide for linking local and technical knowledge. *Geoderma*, 135:248-259.
- Bartlett, J.R., Doner, H.E., 1988. Decomposition of lysine and leucine in soil aggregates: Adsorption and compartmentalization. *Soil Biol. Biochem.*, 20: 755-759.
- Bastida, F., Moreno, J.L., Hernández, T., García, C., 2006. Microbiological degradation index of soils in semiarid climate. *Soil Biol Biochem.*, 38:3463-3473.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, M.T. García, C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma*, 147:159-171.
- Bentham, H., Harris, J.A., Birch, P., Short, K.C., 1992. Habitat classification and soil restoration assessment using analysis of soil microbiological and physicochemical characteristics, *J. Appl. Ecol.*, 29: 711-718.
- Blazsó, M., Jakab, E., 1985. Study of thermal decomposition reactions in coals by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Appl Pyrolysis*, 8: 189-194.
- Blum, W.H., 1998. Basic concepts: degradation, resilience and rehabilitation. In: Lal R, Blum WH, Valentine C, Stewart BA (eds.), *Methods for Assessment of Soil Degradation*. CRC Press, Boca Ratón, pp. 1-16.
- Bonmatí, M., Jiménez, P., Álvarez, H., Calero, E., Juliá, M., Morillo, M., Núñez, E., 2000. Changes in enzyme activities during the reclamation of two soils from limestone quarries in Catalonia using high doses of sewage-sludge. In: García, C., Hernández, M.T. (Eds.), *Research and Perspectives of Soil Enzymology in Spain*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, pp. 253-293.
- Bonmati, M., Jiménez, P., Julià, M., 2003. Soil enzymology: some aspects of its interest and limitations, M.C. Lobo, J.J. Ibáñez (Eds) , *Preserving Soil Quality and Soil Biodiversity: the Role of Surrogate Indicators*, Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria, Madrid, pp. 63-75.
- Bottner, P., 1985. Response of microbial biomass to alternate moist and dry conditions in a soil incubated with ^{14}C and ^{15}N -labelled plant material. *Soil Biol Biochem.*, 17:329-337.
- Bowen, G.D., Rovira, A., 1991. The rhizosphere. In: Walsel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (Eds.), *Plants Root, The Hidden Half*. Marcel Dekker, New York, pp. 641-669.
- Boyle, M., Paul, E.A., 1989. Carbon and nitrogen mineralization kinetics in soil previously amended with sewage sludge. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53: 99-103.
- Bremner, J.M., Mulvaney, C.S., 1982. Nitrogen-total. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 2 2nd Ed. Agron.* 9, pp. 595-624.
- Brendecke, J., Axelson, R.D., Pepper, I.L., 1993. Soil microbial activity as an indicator of soil fertility: long-term effects of municipal sewage sludge on an arid soil. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 751-758.

- Brohon, B., Delolme, C., Gourdon, R., 2001. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biol. Biochem.*, 33:883-891.
- Browman, M.G., Tabatabai, M.A., 1978. Phosphodiesterase activity of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42:284-290.
- Burés, O., Soliva, M., 1984. Co-composting sewage sludge-pine bark. *Acta Horticulturae*, 150: 545-551.
- Burns, R.G., 1978. Enzyme activity in soil: some theoretical and practical considerations. In: *Soil Enzymes*. Burns R.G. (Ed). Academic Press.
- Burns, R.G., 1982. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial activity. *Soil Biol. Biochem.*, 14:423-427.
- Busto, M.D., Perez-Mateos, M., 2000. Characterization of β -d-glucosidase extracted from soil fractions. *European Journal of Soil Science*, 51:193-200.
- Cambardella, C. A., and E. T. Elliott. 1994. Carbon and nitrogen dynamics of soil organic matter fractions from cultivated grassland soils. *Soil Sci Soc Am J.*, 58:123-130.
- Campbell, C.A., Biederbeck, V.O., Zentner, R.P., Lafond, G.P., 1991. Effect of crop rotations and cultural practices on soil organic matter, microbial biomass and respiration in a thin Black Chernozem. *Can. J. Soil Sci.*, 71:363-376.
- Carbonell, G., Pablos, M.V., García, P., Ramos, C., Sánchez, P., Fernández, C., Tarazona, J.V., 2000. Rapid and cost-effective multiparameter toxicity tests for soil microorganisms. *Sci. Total Environ.*, 247: 143-150.
- Carpenter-Boggs, L., Kennedy, A.C., Reganold, J.P., 2000. Organic and Biodynamic Management: Effects on Soil Biology. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64: 1651-1659.
- Carter, M.R., 1991. The influence of tillage on the proportion of organic carbon and nitrogen in the microbial biomass of medium-textured soils in a humid climate. *Biol. Fertil. Soil*, 11:135-139.
- Carter MR, Gregorich EG, Anderson DW, Doran JW, Janzen HH and Pierce FJ. 1997. Concepts of soil quality and their significance. En: *Soil quality for crop production and ecosystem health*. Gregorich, E.G. y Carter, M. (Eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.
- Carter, M.R., Gregorich, E.G., Angers, D.A., Beare, M.H., Sparling, G.P., Wardle, D.A., Voroney, R.P., 1999. Interpretation of microbial biomass measurements for soil quality assessment in humid temperate regions. *Can. J. Soil Sci.*, 79:507-520.
- Ceccanti, B., Doni, S., Macci, C., Cercignani, G., Masciandaro, G., 2008. Characterization of stable humic-enzyme complexes of different soil ecosystems through analytical isoelectric focussing technique (IEF). *Soil Biol. Biochem.*, 40:2174-2177.
- CER Catalogo Europeo de Residuos. (en línea) (Consulta 14/12/2008) Disponible en http://www.mediterranea.org/cae/catalogo_europeo_de_residuos.htm
- Chander, K., Brookes, P.C., 1991. Effects of heavy metals from past accumulations of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and a silty loam UK soil. *Soil Biol. Biochem.*, 23: 927-932.

- Chander, K., Brookes, P.C., 1993. Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. *Soil Biol. Biochem.*, 25:1231-1239.
- Chander, K., Brookes, P.C., Harding, S.A., 1995. Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam. *Soil Biol. Biochem.*, 27: 1409-1421.
- Chen, Z.S., 1998. Management of contaminated soil remediation programmes. *Land Contamination & Reclamation*, 6: 41-56.
- Chenu, C., Stotzky, G., 2002. Interactions between microorganisms and soil particles. An overview. In: *Interactions Between Soil Particles and Microorganisms* (Eds P. M. Huang, J. M. Bollag, N. Senesi), pp. 3–39. Wiley-VCH-Verlag, Weinheim.
- Cheshire, M.V., Mundie, C.M., 1966. The hydrolytic extraction of carbohydrates from soil by sulphuric acid. *J Soil Sci.*, 17: 372-381.
- Cheshire, M.V., 1979. *Nature and Origin of Carbohydrates in Soils*. Academic Press, London.
- Clein, J.S., Schimel, J.P., 1994. Reduction in microbial activity in birch litter due to drying and rewetting events. *Soil Biol. Biochem.*, 26: 403-406.
- Cohen, S.A., Michaud, D.P., 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-*n*-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino-acids via high-performance liquid-chromatography. *Anal. Biochem.*, 211: 279-287.
- Colin, F., 1977. Mise au point de méthodes biochimiques de caractérisation de la stabilité des Boues Résiduaires. Application a l'évaluation des possibilités d'élimination finale par mise en décharge contrôlée ou utilisation agricole. *Sols et Déchets Solides*. Ministère de l'Environnement et du Cadre de Vie. Mission des Etudes et de la Recherche.
- Cook, B.D., Allan, D.L., 1992. Dissolved organic carbon in old field soils: total amounts as a measure of available resources for soil mineralization. *Soil Biol. Biochem.*, 24:585-594.
- Curtin, D., Weng, G., 1999. Organic matter fraction contributing to soil nitrogen mineralization potential. *Soil Sci. Soc. Am.*, J.63: 410-415.
- Dalal, R.C., 1998. Soil microbial biomass- what do the numbers really mean? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38: 649-665.
- Debosz, K., Rasmussen, P.H., Pedersen, A.R., 1999. Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: effect of organic matter input. *Appl. Soil. Ecol.*, 13: 209-218.
- Debosz, K., Petersen, S.O., Kure, L K., Ambus, P., 2002. Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. *Appl. Soil Ecol.*, 19: 237-248.
- Delgado, M.M., Porcel, M.A., Miralles De Imperial, R., Bellido, N., Bigerioego, M., Beltrán, E., Calvo, R., 1999. Mineralización del nitrógeno procedente de residuos orgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 15: 19-25.

- Denef, K., Six, J., Bossuyt, H., Frey, S.D., Elliott, E.T., Merckx, R., Paustian, K., 2001. Influence of dry-wet cycles on the interrelationship between aggregate, particulate organic matter, and microbial community dynamics. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1599-1611.
- DeLuca, T.H., Keeney, D.R., 1993. Soluble anthrone-reactive carbon in soils: Effect of carbon and nitrogen amendments. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 57: 1296-1300.
- Dick, R.P., 1992. A review: Long term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 40: 25-36.
- Dick, W.A., Tabatabai, M.A., 1992. Significance and potential use of soil enzymes. In: F.B. Metting, Editor, *Soil Microbial Ecology*, Marcel Decker, New York, pp. 95-130.
- Dick, R.P., 1994. Soil enzyme assays as indicators of soil quality. In: Doran, J.W.L., Coleman, D.C., Bezdicsek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Soil Science Society of America, Madison, WI, *Soil Sci. Soc. Am.* pp. 107-124.
- Dilly, O., Blume, O.H., 1998. Indicators to assess sustainable land use with reference to soil microbiology. En: *Towards sustainable land use*. H.P. Blume, H. Eger, E. Fleischhauer, A. Hebel, C. Reij & K.G. Steiner (Eds). Catena Verlag. Reiskirchen.
- Dilly, O., Munch, J.C., 1998. Ratios between estimates of microbial biomass content and microbial activity in soils. *Biol. Fertil. Soils*, 27: 374-379.
- Dommergues, Y., 1960. La notion de coefficient de minéralization du carbone dans les sols. *Agron. Trop.*, 15:53-59.
- Doran, J.W., Parkin, B.T., 1994. *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Soil Science Society of America, Inc. Special Publication. Number 35. Madison, Wisconsin, USA.
- Doran, J. W., Sarrantonio, M., Liebigh, M.A., 1996. Soil health and sustainability. *Adv. Agron.*, 56:1-54.
- Doran, J.W., 2002. Soil health and global sustainability: Translating science into practice. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 88:119-127.
- Douchafour, P.1982. *Manual de Edafología*. Ed.Masson, Barcelona.
- Düring, R.A., Gäth, S., 2002. Utilization of municipal organic wastes in agriculture: where do we stand, where will we go? *Soil Sci. Plant Nutr.*, 165: 544-556.
- Echeverría, H.E., Sainz Rozas, H., 2005. Nitrógeno en el suelo. En: "Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos", Hernán E. Echeverría y Fernando García (Eds). Ediciones INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Balcarce. Buenos Aires. Argentina.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 20: 601-606.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1990. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 22: 891-897.
- Elliot, E.T., Coleman, D.C., 1988. Let the soil work for us. *Ecol. Bull.*, 39:1-10.
- Eivazi, F., Zakaria, A., 1993. β -Glucosidase activity in soils amended with sewage sludge. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 43: 155-161.

- Emmerling, C., Liebner, C., Haubold-Rosar, M., Katur, J., Schröder, D., 2000. Impact of application of organic waste materials on microbial and enzyme activities of mine soils in the Lusatian coal mining region. *Plant and Soil*, 220: 129-138.
- Fang, M., Wong, J.W.C., 1999. Effects of lime amendment on availability of heavy metals and maturation in sewage sludge composting. *Environ. Pollut.*, 106: 83-89.
- FAO, 2001. Soil carbon sequestration for improved land management. *World soil reports 96*. Rome, 58 p.
- Fedoroff, N., 1987. The production potential of soils. Part 1. Sensitivity of principal soil types to the intensive agriculture of north-western Europe, in: Barth, E., L'Hermite, P. (Eds.), *Scientific Basis for Soil Protection in the European Community*. Elsevier, London, pp. 65-86.
- Fernández-Sanjurjo, M.J., 1999. Influencia de los fragmentos gruesos en algunas propiedades físicas y químicas del suelo: antecedentes y estado actual del tema. *Edafología*, 6: 95-107.
- Fernández, J. M., Plaza, C., Hernández, D., Polo, A., 2007. Carbon mineralization in an arid soil amended with thermally-dried and composted sewage sludges. *Geoderma*, 137: 497-503.
- Fernández, J.M., Plaza, C., García-Gil, J.C., Polo, A., 2009. Biochemical properties and barley yield in a semiarid Mediterranean soil amended with two kinds of sewage sludge. *Appl. Soil Ecol.*, 42:18-24.
- Fierer, N., Schimel, J., 2002. Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biol. Biochem.*, 34:777-787.
- Fierer, N., Schimel, J.P., 2003. A proposed mechanism for the pulse in carbon dioxide production commonly observed following the rapid rewetting of a dry soil. *Soil Sci Soc Am J.*, 67: 798-805.
- Filip, Z.K., 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 88:169-174.
- Fließbach, A., Martens, R., Reber, H.H., 1994. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.*, 26: 1201-1205.
- Frankenberger, W. T., Jr., Johanson, J. B., 1982. Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 14: 433-437.
- Frankenberger, W.T., Johanson, J.B., Nelson, C.O., 1983. Urease activity in sewage sludge amended soils. *Soil Biol. Biochem.*, 15: 543-549.
- Frankenberger, W.T., Jr., Tabatabai, M.A., 1980. Amidase activity in soils: I. Methods of assay. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44: 532-287.
- Frankenberger, W.T. Jr., Tabatabai, M.A., 1981. Amidase activity in soils: III. Stability and distribution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45: 333-338.
- Franzluebbers, A.J., Haney, R.I., Honeycutt, C.W., Schomberg, H.H., Hons, F.M., 2000. Flush of carbon dioxide following rewetting of dried soil relates to active organic pools. *Soil Sci Soc Am J.*, 64: 613-623.
- Friedel, J.K., Scheller, E., 2002. Composition of hydrolysable amino acids in soil organic matter and soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 34: 315-325.

- Frioni, L., 1999. Procesos Microbianos. Editorial Fundación Universidad Nacional de Río IV. Argentina. 332 pp.
- Fu, B.J., Chen, L.D., Ma, K.M., Zhou, H.F., Wang, J. 2000. The relationships between land use and soil conditions in the hilly area of the Loess Plateau in northern Shaanxi, China. *Catena*, 39: 69–78.
- Galantini, J.A., Suñer, L. Las fracciones orgánicas del suelo: análisis en los suelos de la Argentina. *Agriscientia* [online]. 2008, vol.25, n.1 [citado 2011-02-28], pp. 41-55. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-298X2008000100006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1668-298X.
- García, C., Hernandez, T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G., 1993. The dehydrogenase activity as an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. Proceeding XI International Symposium of Environmental Biogeochemistry, Salamanca, Spain, pp. 89-100.
- García, C., Hernandez, T., Costa, F., 1994. Microbial activity in soils under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 26:1185-1191.
- García, C., Hernández, T., 1997. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biol. Biochem.*, 29:171-177.
- García C., Hernández, T., Costa, F., 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 28: 123-134.
- García, C., Hernández, M.T., 2000. Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España, CSIC, Madrid. 352 p.
- García C., Hernández T., Pascual, J., Moreno, J.L., Ros, M. 2000. Microbial activity in soils of SE Spain exposed to degradation and desertification processes. Strategies for their rehabilitation. En: Research and Perspectives of Soil Enzymology in Spain, C. García y M.T. Hernández (Eds.). CSIC-CEBAS, Madrid, pp.253-293.
- García, C. Hernandez, T. Roldan, Martin, A., 2002. Effect of plant cover decline on chemical and microbial parameters under Mediterranean climate. *Soil Biol Biochem.*, 34: 635-642.
- García C., Roldán A. Hernández T., 2005. Ability of different plant species to promote microbiological processes in semiarid soil. In: *Geoderma*, 124:193-202.
- García-Orenes, F., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Navarro-Pedreño, J., Gómez, I., Mataix-Beneyto, J., 2005. Factors controlling the aggregate stability and bulk density in two different degraded soils amended with biosolids. *Soil Till. Res.*, 82: 65-76.
- García-Gil, J. C., Plaza, C., Soler-Rovira, P., Polo, A., 2000. Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 1907-1913.
- Gee, G.W., and J.W. Bauder. 1986. Particle-size analysis. In: A. Klute (ed.) *Methods of soil analysis*. Part 1. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI. p. 383-411.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., Violante, A., 1992. Adsorption, activity and kinetic properties of urease on montmorillonite, aluminum hydroxide and Al(OH)₃-montmorillonite complexes. *Soil Biol. Biochem.*, 24:51-58.

- Gigliotti, G., Giusquiani, L., Businelli, D., 2001. A long-term chemical and infrared spectroscopy study on a soil amended with municipal sewage sludge. *Agronomie.*, 21: 169-178.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 877-887.
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1389-1414.
- Gispert, M.A., Arcara, P.G., 1988. Studio dell'attività biologica di diversi suoli dell'area mediterranea: rapporti tra attività enzimatiche, tasso di respirazione e biomassa batterica (FITC). *Agrochimica* 37: 491-499.
- Giusquiani, P.L., Patumi, M., Businelli, M., 1989. Chemical composition of fresh and composted urban waste. *Plant and Soil*, 116: 278-282.
- Glanz, J.T., 1995. *Saving Our Soil: Solutions for Sustaining Earth's Vital Resource*. Johnson Books, Boulder, CO, USA.
- Golchin, A., Oades, J.M., Skjemstad, J.O., Clarke, P., 1994. Soil structure and carbon cycling. *Aust. J. Soil Res.*, 32:1043-1068.
- Gordon, H., Haygarth, P.M., Bardgett, R.D., 2008. Drying and rewetting effects on soil microbial community composition and nutrient leaching. *Soil Biol Biochem.*, 40:302-311.
- Griffiths, B.S., Hallett, P.D., Kuan, H.L., Pitkin, Y., Aitken, M.N., 2005. Biological and physical resilience of soil amended with heavy metal-contaminated sewage sludge. *Eur. J. Soil Sci.*, 56: 197-205.
- Gross, T.S.C., 1993. Thermal drying of sewage sludge. *J Inst. Water Env. Man.*, 7: 255-261.
- Guilamany, M., Noguera, A., 1998. Estudi i possibilitats d'aprofitament dels residus procedents de les explotacions de recursos petrolis naturals de Barcelona i Tarragona. Trabajo final de Carrera. Director: Francesc Jordana Ribà. Universitat Politècnica de Catalunya. Escola Universitària Politècnica de Barcelona.
- Guitián, F., Carballas, T., 1976. *Técnicas de análisis de suelos*. Editorial Pico Sacro. Santiago de Compostela (2.^a edición corregida y ampliada).
- Haberern, J., 1992. Viewpoint: A Soil health index. *J. Soil Water Conser.* 47: 6.
- Hall, G.H. 1984. Measurement of nitrification rates in lake sediments: Comparison of the nitrification inhibitors nitrapyrin and allylthiourea. *Microbial Ecology*, 10: 25-36.
- Hattori, T., 1973. *Microbial life in the soil*. Marcel Dekker, New York.
- Hattori, H., Mukai, S., 1986. Decomposition of sewage sludges in soil as affected by their organic matter composition. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 32: 421-432.
- Hattori, H., 1988. Microbial activities in soil amended with sewage sludges. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 34: 221-232.
- Hayano, K., Katami, A., 1977. Extraction of β -glucosidase activity from pea field soil. *Soil Biol. Biochem.*, 9: 349-351.

- Hayano, K., Tubaki, K., 1985. Origin and properties of β -glucosidase activity of tomato-field soil. *Soil Biol. Biochem.*, 17: 553-557.
- Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A., Walenzik, G., 1989. Soil microbial biomass measurements: An automated technique based on infrared analysis. *Plant Soil*, 116: 191-19.
- Hernández, T., García, C., 2003. Estimación de la respiración 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*. Mundiprensa Editorial. Madrid, Spain, pp. 311-346.
- Hernández, M.T., Mataix-Solera, J., Lichner, L., Štekaurová, V., Zaujec, A., Garcia-Izquierdo, C., 2007. Assessing the microbiological, biochemical, soil-physical and hydrological effects of amelioration of degraded soils. *Biología*, 62: 542-546.
- Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., García-Ruiz, R., Dick, R.P., 2004. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. *Soil Biol Biochem.*, 36: 1559-1568.
- Huang, P.M., Bollag, J.M., 1998. Minerals–organics–microorganisms interactions in the soil environment. In: *Structure and Surface Reactions of Soil Particles* (eds P.M. Huang, N. Senesi & J.-M. Bollag), pp. 3–39. John Wiley & Sons, New York.
- Insam, H., 1990. Are the soil microbial biomass and basal respiration governed by the climatic regime? - *Soil Biol. Biochem.*, 22: 525-532.
- Insam, H., Domsch, K.H., 1988. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microbiol. Ecol.*, 15:177-188.
- Insam, H., Parkinson, D., Domsch, K.H., 1989. Influence of macroclimate on soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 21: 211-221.
- Jackson, M.L., 1964. *Análisis químico de suelos* (Traducido por J. Bertrán). Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. 662 p.
- Jandl, R., Sollins, P., 1997. Water-extractable soil carbon in relation to the belowground carbon cycle. *Biol. Fertil. Soil*, 25: 195-201.
- Jansson, S. L., 1958. Tracer studies on nitrogen transformations in soil with special attention to mineralization-immobilization relationships. *Ann. Royal Agric. Coll. Sweden*, 24: 101-361.
- Jenkinson, D.S., Ladd, J.N., 1981. Microbial Biomass in Soil: Measurement and Turnover. In: *Soil Biochemistry*. Vol.5. E.A. Paul and J.N. Ladd (Eds). New York: Marcel Dekker; pp. 455-471.
- Jiménez, P., Ortiz, O., Tarrasón, D., Ginovart, M., Bonmatí, M., 2007. Effect of differently post- treated dewatered sewage sludge on β -glucosidase activity, microbial biomass carbon, basal respiration and carbohydrates contents of soils from limestone quarries. *Biol. Fertil. Soil*, 44: 393-398.
- Joergensen R.G., Brookes P.C., 1990. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5 K₂SO₄ soil extracts. *Soil Biol Biochem.*, 22: 1023-1027.
- Karlen, D.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F., Schuman, G.E., 1997. Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. *Soil Sci Soc Am J.*, 61: 4-10.

- Karlen, D.L., Andrews, S.S., Weinhold, B.J., Doran, J.W., 2003. Soil quality: humankind's foundation for survival. *J. Soil Water Conserv.*, 58: 171-179.
- Khan, M., Scullion, J., 2000. The effect of soil on microbial responses to metals in sludge. *Environ. Pollution*, 110: 115-125.
- Kieft, T.L., Soroker, E., Firestone, M.K., 1987. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. *Soil Biol Biochem.*, 19:119-126.
- Killham, K., Firestone, M.K., 1984. Proline transport increases growth efficiency in salt-stressed *Streptomyces griseus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 239-241.
- Kızılkaya, R., Bayraklı, B. 2005. Effects of N-enriched sewage sludge on soil enzyme activities. *App. Soil Ecol.*, 30: 192-202.
- Kononova, M. M., 1966. *Soil Organic Matter*, 2nd edition. Pergamon Press, Oxford. 554 pp.
- Kuprevich, V.T., Shcherbakova, T.A., 1971. *Soil enzymes*. USDA, Washington, DC, USA.
- Ladd, J.N., Butler, J.H.A., 1975. Humus-enzyme systems and synthetic, organic polymer-enzyme analogs. In: *Soil biochemistry*, vol 4. E.A., Paul, A.D., McLaren, (Ed). M Dekker, Inc. N.Y.
- Ladd, J. N., van Gestel M., Jocteur Monrozier L., Amato, M., 1996. Distribution of organic ¹⁴C and ¹⁵N in particle-size fractions of soils incubated with ¹⁴C, ¹⁵N-labelled glucose/NH, and legume and wheat straw residues. *Soil Biol. Biochem.*, 28: 893-905.
- Lai, C.M., Tabatabai, M.A., 1992. Kinetic parameters of immobilized urease. *Soil Biol. Biochem.*, 24: 225-228.
- Landi, L., Renella, G., Moreno, J.L., Falchini, L., Nannipieri, P., 2000. Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biol. Fertil. Soils*, 32: 8-16.
- Larson, W.E., Pierce, F.J., 1991. Conservation and enhancement of soil quality. In: *Proceedings of the International Workshop on Evaluation for Sustainable Land Management in the Developing World*. vol 2. Technical papers. International board for soil research and management, IBSRAM Proceedings. Bangkok, Thailand.
- Lee, Y.B., Lorenz, N., Dick, L.K., Dick, R.P., 2007. Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties. *Soil Sci Soc Am J.*, 71: 299-1305.
- Leirós, M.C., Trasar-Cepeda, C., García-Fernández, F., Gil-Sotres, F., 1999. Defining the validity of a biochemical index of soil quality. *Biol. Fertil. Soils*, 30: 140-146.
- Leirós, M.C., Trasar-Cepeda, M.C., Seoane, S., Gil Sotres, F., 2000. Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (atlantic oakwood) in area of the european temperate-humid zone (galicia, nw spain): General parameters. *Soil Biol Biochem.*, 32: 733-747
- Lensi, R., Lescure, C., Steinberg, C., Savoie, J.M., Faurie, G., 1991. Dynamics of residual enzyme activities, denitrification potential and physio-chemical properties in a γ -sterilized soil. *Soil Biol. Biochem.*, 23: 367-373.
- Li, X., Sarah, P., 2003. Enzyme activities along a climatic transect in the Judean Desert. *CATENA*, 53: 349-363

- Lobo, M.C., Sastre, I., Vicente, M.A., 2000. Enzymes as a measurement of environmental impact on soils. In: Research and Perspectives of Soil Enzymology in Spain. García, C., Hernández, M.T. (Eds.), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, pp. 325-352.
- Loveland, P., Webb, J., 2003. Is there a critical level of organic matter in the agricultural soil of temperate regions: a review. *Soil Tillage Res.*, 70: 1-18.
- Magid, J., Kjaergaard C., Gorissen, A., Kuikman, P. J., 1999. Drying of rewetting of a loamy sand soil did not increase the turnover of native organic matter, but retarded the decomposition of added ¹⁴C-labelled plant material. *Soil Biol Biochem.*, 31: 595-602.
- Mamilov, A.S., Dilly, O.M., 2002. Soil microbial eco-physiology as affected by short-term variations in environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 34:1283-1290.
- Martens, D.A., Frankenberger, W.T. Jr., 1991. Saccharide composition of extracellular polymers produced by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, 23: 731-736.
- Martín Vide, J., 1992. "El Clima", en *Geografia General dels Països Catalans*, 1: 1-110, Barcelona, Enciclopèdia Catalana.
- Martín, J.V., Miralles De Imperial, R., Beltrán, E.M., Porcel, M.A., Beringola, M.L., Calvo, R., Delgado, M.M., 2006. Mineralización del nitrógeno contenido en un lodo de depuradora Secado térmicamente. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 22: 125-133.
- Martínez-Iñigo, M.J., Pérez-Sanz, A., Ortiz, I., Alonso, J., Alarcón, R., García, P., Lobo, M.C., 2009. Bulk soil and rhizosphere bacterial community PCR-DGGE profiles and β -galactosidase activity as indicators of biological quality in soils contaminated by heavy metals and cultivated with *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Chemosphere*, 75: 1376-1381.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Gallardo-Lancho, J.S., 1998. Organic matter properties in cultivated versus set-aside arable soils. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 67: 267-274.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Garcia, C., 1999. Soil agro-ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores Technol.*, 59: 199-206.
- Mattana, S., Ortiz, O., Alcañiz, J.M., 2010 Substrate-Induced Respiration of a Sandy Soil Treated with Different Types of Organic Waste. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 41: 408-423
- Mejía, G., 2005. Estudio de la evolución de la materia orgánica en procesos de compostaje y secado térmico de fangos de depuradora. Tesis Doctoral. Departament de Química Analítica. C.E.T.S. Institut Químic de Sarrià. Universitat Ramon Llull.
- Melero, S; JC Ruiz Porras; JF Herencia & E Madejon. 2006. Chemical and biochemical properties in a silty loam soil under conventional and organic management. *Soil Till. Res.*, 90: 162- 170.
- Mena, E., Garrido, A., Hernández, T., García, C., 2003. Bioremediation of Sewage Sludge by Composting. *Comm Soil Sci Plant Anal.*, 34: 957-971.
- Metcalf, L., Eddy, H., 1996. "Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, Vertido y Reutilización". McGraw-Hill, Vol I y II, México.

- Miglietta, F., Raschi, A., Bettarini, I., Resti, R., Selvi, F., 1993. Natural CO₂ springs in Italy: a resource for examining longterm response of vegetation to rising atmospheric CO₂ concentrations. *Plant Cell Environ.*, 16: 873-878.
- Miller, M., Dick, R. P., 1995. Thermal stability and activities of soil enzymes as influenced by crop rotations. *Soil Biol. Biochem.*, 27: 1161-1166.
- Miralles, I., Ortega, R., Sánchez-Marañón, M., Leirós, M.C., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., 2007. Biochemical properties of range and forest soils in Mediterranean mountain environments. *Biol. Fertil. Soil*, 43: 721-729.
- Mogollón, J.P., Martínez, A., 2009. Variación de la actividad biológica del suelo en un transecto altitudinal de la sierra de San Luís, estado Falcón. *Agronomía Trop.*, 59:469-479.
- Monreal, C.M., Bergstrom, D.W., 2000. Soil enzymatic factors expressing the influence of land use, tillage system and texture on soil biochemical quality. *Can. J. Soil Sci.*, 80: 419-428.
- Moreira, M. M. S., Siqueira, J. O., 2002. *Microbiologia e bioquímica do solo*: Brasil: UFLA Ed., Universidad Federal de Lavras, Brasil, 625 p.
- Moreno, J.L, Hernández, T., García, C., 1999. Effects of a cadmium-contaminated sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soil. *Biol. Fertil. Soils*, 28: 230-257.
- Moreno, J.L., García, C., Hernández, T., 2003. Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. *Eur. J. Soil Sci.*, 54: 377-386.
- Nannipieri, P. 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst, CE; BM Doube; VVSR Gupta & PR Grace (eds.). *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. CSIRO, Australia, pp. 238-244.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Conti, C., 1982. Hydrolases extracted from soil: Kinetic parameters of several enzymes catalysing the same reaction. *Soil Biol. Biochem.*, 5:429-432.
- Nannipieri, P., Muccini, L., Ciardi, C., 1983. Microbial biomass and enzyme activities: Production and persistence. *Soil Biol Biochem.*, 15: 679-685.
- Nannipieri, P., Grego, S., Ceccanti, B., 1990. Ecological significance of the biological activity in soils. In: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, New York.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: *Enzymes in the Environment*. R.G. Burns y R. Dick (Eds), pp. 1-33. Marcel Dekker, New York.
- Nannipieri, P., Badalucco, L., 2003. Biological processes. In: *Processes in the Soil-Plant System: Modelling Concepts and Applications*.s D.K.Bembi & R.Nieder (Eds). The Haworth Press, Binghamton, NY.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.*, 54: 655-670.
- Navas, A., Machín, J., Navas, B., 1999 Use of biosolids to restore the natural vegetation cover on degraded soils in the badlands of Zaragoza (NE Spain). *Bioresour. Technol.*, 69:199-205.

- Nelson, D.W., Sommers, L.E., 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Page AL, 287 Miller RH, Keeney DR (eds) *Methods of Soil Analysis Part 2: Chemical and Microbiological 288 Properties*. Soil Science Society of America, Madison, WI USA, pp. 570-571.
- Nichols, K.A. 2003. Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. Doctor of Philosophy Thesis, University of Maryland. 307 p.
- Nicholson, K.S., Wardle, D.A., 1994. Decomposition of weed tissues in a pasture and a maize crop situation: implications for nutrient cycling. *Proceedings of the 47th New Zealand Plant Protection Society Conference*, pp. 29-33.
- Nielsen, M.N., Winding, A., 2002. Microorganisms as indicators of soil health. Technical report (388). National Environmental Research Institute, Denmark. 84 pp.
- Noble, A.D., Randall, P.J., 1999. Alkalinity effects of different tree litters incubated in an acid soil of N.S.W., Australia. *Agrofor. Syst.*, 46: 147-160.
- Nortcliff, S., 2002. Standardisation of soil quality attributes. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 88:161-168.
- Oades, J.M., 1984. Soil organic matter and structural stability mechanisms and implications for management. *Plant Soil*, 76: 319-337.
- Odum, E.P., 1985. Trends expected in stressed ecosystems. *BioScience*, 35:419-422.
- Ojeda, G., Alcañiz, J.M., Ortiz, O., 2003. Runoff and losses by erosion in soils amended with sewage sludge. *Land Degrad. Dev.*, 14: 563-573.
- Ojeda, G., Tarrasón, D., Ortiz, O., Alcañiz, J.M., 2006. Nitrogen losses in runoff waters from a loamy soil treated with sewage sludge. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 117: 49-56.
- Ojeda, G., Alcañiz, J.M., Le Bissonnais, Y., 2008. Differences in aggregate stability due to various sewage sludge treatments on a Mediterranean calcareous soil. *Agric. Ecosys. Environ.*, 125: 48-56.
- Ortega, N., Busto, M.D., Perez-Mateos, M., 1997. Estabilidad operacional de β -glucosidasa inmovilizada por asociación a humatos a través de glutaraldehído. Abs. XX Congreso SEBBM, Madrid. 145. (Consultado en: <http://nates.psu.ac.th/Link/SoilCongress/bdd/symp41/1353-t.pdf>)
- Ortiz, O., Alcañiz, J.M., 1994. Respiration potential of microbial biomass in a calcareous soil treated with sewage sludge. *Geomicrobiol. J.*, 11:333-340.
- Ortiz O., Alcañiz, J.M., 2006. Bioaccumulation of heavy metals in *Dactylis glomerata* L. growing in a calcareous soil amended with sewage sludge. *Bioresour. Technol.*, 97: 545-552.
- Pankhurst, C.E., Double, B.M. and Gupta, V.V.S.R. 1997. *Biological indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, UK.437 pp.
- Pankhurst, C.E., Yu,S., Hawke, B.G., Harch, B.D., 2001. Capacity of fatty acid profiles and substrate utilization patterns to describe differences in soil microbial communities associated with increased salinity or alkalinity at three locations in South Australia. *Biol. Fertil. Soil*, 33: 201-17.
- Paradelo, R., Cendón, Y., Moldes, A., Barral, M.T., 2006. Restauración de escombreras de pizarra con vermicompost de orujo de uva agotado. *Residuos*, 90: 44-50.

- Parat, C., Chaussod, R., Leveque, J., Andreux, F., 2005. Long-term effects of metal-containing farmyard manure and sewage sludge on soil organic matter in a fluvisol. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 673-679.
- Parker, C.F., Sommers, L.E., 1983. Mineralization of nitrogen in sewage sludges. *J Environ. Qual.*, 12:150-156.
- Pascual, J.A., García, C., Hernandez, T., Ayuso, M., 1997. Changes in the microbial activity of an arid soil amended with urban organic wastes. *Biol Fertil Soils*, 24: 429-434
- Pascual, J.A., García, C., Hernández, T., 1999. Comparison of fresh and composted organic waste in their efficacy for the improvement of arid soil quality. *Bioresour. Technol.*, 68:255-264.
- Pascual, J. A., García, C., Hernández, T., Moreno, J.L., Ros, M., 2000. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 1877-1883.
- Pascual, J. A., Moreno, J.L., Hernández, T., García, C., 2002. Persistence of immobilized and total urease and phosphatase activities in a soil amended with organic wastes. *Biores. Technol.*, 82: 73-78.
- Pedra, F., Polo, A., Ribeiro, A., Domingues, H., 2007. Effects of municipal solid waste compost and sewage sludge on mineralization of soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, 39: 1375-1382.
- Pérez de Mora, A., Ortega-Calvo, J.J., Cabrera, F., Madejón E., 2005. Changes in enzyme activities and microbial biomass after “in situ” remediation of a heavy metal-contaminated soil. *Appl. Soil Ecol.*, 28: 125-137.
- Perucci, P., 1992. Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biol. Fertil. Soils*, 14: 54-60.
- Pesaro, M., Nicollier, G., Zeyer, J., Widmer, F., 2004. Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. *Appl Environ Microbiol.*, 70: 2577-2587.
- Powlson, D.S., Brookes, P.C., Chistensen, B.T., 1987. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biol. Biochem.*, 19: 159-164.
- Powlson, D.G., Jenkinson, D., 1981. A comparison of the organic matter, biomass, adenosine triphosphate and mineralizable nitrogen contents of ploughed and direct-drilled soils. *J. Agric.l Sci.*, 97: 713-721.
- Renella, G., Reyes Ortigoza, A.L., Landi, L., Nannipieri, P., 2003. Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED₅₀), *Soil Biol. Biochem.*, 35: 1203-1210.
- Renella, G., Mench, M., Gelsomino, A., Landi, L., Nannipieri, P. 2005. Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 1498-1506.
- Rillig, M.C., Wright, S., Nichols, K., Shmith, W., Torn, M., 2001. Large contributions of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil*. 233: 167-177.
- Rillig, M.C., Caldwell, B.A., Wösten, H.A.B., Sollins, P., 2007. Role of proteins in soil carbon and nitrogen storage: controls on persistence. *Biogeochemistry*, 85: 25-44.

- Rivas-Martinez, S., 1987. *Memoria y mapa de las series de vegetación de España (1: 400.000)*. 268 pp. ICONA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Robert, M., Chenu, C., 1992. Interactions between soil minerals and microorganisms. In: Stotzky, G., Bollag, J.M. (Eds.), *Soil Biochemistry*, vol. 7. Marcel Dekker, New York, pp. 307-404.
- Ros, M., Hernández, M.T., García, C., 2003. Bioremediation of Soil Degraded by Sewage Sludge: Effects on Soil Properties and Erosion Losses. *Environ. Manage.*, 31: 741-747.
- Ros, M., Klammer, B., Knapp, B., Aichberger, K., Insam, H., 2006. Long term effects of compost amendment of soil on functional and structural diversity and microbial activity. *Soil Use Manage.*, 22:209-218.
- Rubio, J.L., Recatalá, L., 1998. El suelo: un recurso natural amenazado. *Revista valenciana d'estudis autonòmics*, 23: 329-353.
- Safarik, I., Santrucková, H., 1992. Direct determination of total soil carbohydrate content. *Plant Soil*, 143: 109-114.
- Sánchez-Monedero, M.A., Mondini, C., de Nobili, M., Leita, L., Roig, A., 2004. Land application of biosolids. Soil response to different stabilization degree of the treated organic matter. *Waste Management*, 24: 325-332.
- Saña Vilaseca, J., 1985. La utilització dels fangs de depuradores urbanes com a adobs: Caracterització de la seva fracció orgànica. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- Saña, J., Moré, J.C., Cohí, A., 1996. La gestión de la fertilidad de los suelos. MAPA. Madrid. 277 pp.
- SAS Institute, 1990. *SAS Procedure Guide, Version 6*, 3rd edition. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Sastre-Conde, I., Vicente, M.A., Lobo, M.C., 2003. Contamination and environmental impact on soil biological activity. In: Lobo M.C., Ibáñez J.J. (Eds.), *Preserving soil quality and soil biodiversity. The role of surrogate indicators*. IMIA, CSIC, Madrid, pp. 99-117.
- Saviozzi, A., Biasci, A., Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., 1999. Long-term effects of farmyard manure and sewage sludge on some soil biochemical characteristics. *Biol. Fert. Soils*, 30: 100-106.
- Saviozzi, A., Bufalino, P., Levi-Minzi, R., Riffaldi, R., 2002. Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study. *Biol. Fertil. Soils*, 35: 96-101.
- Scheu, S., Parkinson, D., 1994. Changes in bacterial and fungal biomass C, bacterial and fungal biovolume and ergosterol content after drying, remoistening and incubation of different layers of cool temperate forest soils. *Soil Biol Biochem.*, 26: 1515-1525.
- Schimel, J., Balser, T.C., Wallenstein, M., 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 88: 1386-1394.
- Selivanovskaya, S. Yu., Latypova, V. Z., Kiyamova, S.N., Alimova, F. K., 2001. Use of microbial parameters to assess treatment methods of municipal sewage sludge applied to grey forest soils of Tatarstan. *Agric. Ecosys. Environ.*, 86: 145-153.
- Senesi, N., Brunetti, G., 1996. Chemical and physico-chemical parameters for quality evaluation of humic substances produced during composting. In: *The Science of Composting*, European Commission International Symposium, Blackie Academic and Professional, London, pp. 195-212.

- Sindhu, M.A., Cornfield, A., 1967. Comparative effects of varying levels of chlorides and sulphates of sodium, potassium, calcium, and magnesium on ammonification and nitrification during incubation of soil. *Plant Soil*, 27: 468-472.
- Sinsabaugh, R.L., Antibus, R.K., Linkins, A.E., McClaugherty, C.A., Rayburn, L., Repert, D., Weiland, T., 1993. Wood decomposition: nitrogen and phosphorus dynamics in relation to extracellular enzyme activity. *Ecol.*, 74: 1586-1593.
- Six, J., Conant, R.T., Paul E.A., Paustian, K., 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil*, 241: 155-176.
- Skujins, J.J., 1978. History of abiotic soil enzyme research. En: *Soil Enzymes*, R.G. Burns (Eds.). Academic Press, New York, p. 1-49.
- Smith, J.L., Paul, E.A., 1990. The significance of soil microbial biomass estimations. *Soil Biochemistry*, 6: 357-396.
- Smith, M.T.E., Tibbett, M., 2004. Nitrogen dynamics under *Lolium perenne* after a single application of three different sewage sludge types from the same treatment stream. *Biores. Technol.*, 91: 233-241.
- Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group. 2004. The SER International Primer on Ecological Restoration. www.ser.org & Tucson: Society for Ecological Restoration International.
- Soliva, M., Huerta, O., 2004. Compostaje de lodos resultantes de la depuración de aguas residuales urbanas. *Formación de técnicos para el tratamiento y gestión de lodos de depuradora. Valsain*. CENEAM/MIMAM
- Sopper, W.E., 1993. Municipal sludge use in land reclamation. Lewis Publ., Boca Raton, FL.
- Sørensen, L.H., 1972. Stabilization of newly formed amino acid metabolites in soil by clay minerals. *Soil Sci.*, 114: 5-11.
- Sort, X., Alcañiz, J.M., 1996. Contribution of sewage sludge to erosion control in the rehabilitation of limestone quarry. *Land Degrad. Rehabil.*, 7: 69-76.
- Sort, X., Alcañiz, J.M., 1999. Effects of sewage sludge amendment on soil aggregation. *Land Degrad. Dev.*, 10: 3-12.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Mbagwu, J.S.C., Zena Teshale, A., Igwe, C.A., 2002. Influence of the addition of organic residues on carbohydrate content and structural stability of some highland in Ethiopia. *Soil Use Manage.*, 18: 404-411.
- Sparling, G.P., Speir, T.W., Whale, K.N., 1986. Changes in microbial biomass C, ATP content, and soil phospho-monoesterase and phospho-diesterase activity following air-drying of soils. *Soil Biol Biochem.*, 18: 363-370.
- Sparling, G.P., Milne, J.G., Vincent, K.W., 1987. Effect of moisture regime on the microbial contribution to Olsen P values. *New Zeal J Agr Res.*, 30: 79-84.
- Sparling G.P., 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Austr. J. Soil Res.*, 30: 195-207.

- Sparling, G.P., 1997. Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. *Biological Indicators of Soil Health*. C.E. Pankurst, B.N. Doube, & V.S.R. Gupta, (Eds). CAB: Wallingford, 4: 97-11
- Speir, T.W., 1977. Studies on a climosequence of soils, in tussock grasslands 10. Distribution of urease, phosphatase, sulphatase activities in soil fractions. *N. Z. J. Sci.*, 20:151-157.
- Speir, T.W., Ross, D.G., 1975. Effects of storage on the activities of protease, urease, phosphatase and sulphatase in three soils under pasture. *N. Z. J. Sci.*, 18: 231-237.
- Speir, T.W., Kettles, H.A., Percival, H.J., Parshotam, A., 1999. Is soil acidification the cause of biochemical responses when soils are amended with heavy metal salts? *Soil Biol Biochem.*, 31: 1953-1961.
- Speir, T.W., van Schaik, A.P., Lloyd Jones, A.R., Kettles, H.A., 2003. Temporal response of soil biochemical properties in a pastoral soil after cultivation following high application rates of undigested sewage sludge. *Biol. Fertil. Soils*, 38: 377-385.
- Speir, T.W., Horswell, J., van Schaik, A.P., McLaren, R.G., Fietje, G., 2004. Composted biosolids enhance fertility of a sandy loam soil under dairy pasture. *Biol. Fertil. Soils*, 40: 349-358.
- Stevenson F.J. 1982. Nitrogen-Organic Forms. En: *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties* (eds. A.L. Page, R.H. Miller y D.R. Keeney). ASA & SSSA. Madison WI. pp. 625-641.
- Stevenson F. J., Cole, M.A., 1999. Cycles of soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. John Wiley & Sons, Nueva York, EE.UU. 2a. edición. 427 p.
- Stotzky, G., 1972. Activity, ecology and population dynamics of microbes in soil. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2: 59-137.
- Tabatabai, M.A. 1982. Soil enzymes. En: *Methods of Soil Analysis, Part 2, 2nd Ed.*, A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (Eds.). *Agronomy 9*, American Society of Agronomy, Madison, Wis., p. 903-947.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1970a. Arylsulfatase activity of soils. *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.*, 34: 225-229.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. 1970b. Factors affecting soil arylsulfatase activity. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 34:427-429.
- Tabatabai, M.A., Dick, W.A., 1979. Distribution pyrophosphatase in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 11:655-659.
- Tabatabai, M.A., Singh, B.B., 1976. Rhodanese activity of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 40: 381-385.
- Tarrasón, D., Ojeda, G., Ortiz, O., Alcañiz, J.M. 2007. Differences on nitrogen availability in a soil amended with fresh, composted and thermally-dried sewage sludge. *Bioresour. Technol.*, 99: 252-259.
- Tate, R.L. 1987. *Soil organic matter: Biological and ecological effects*. 291 p. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Tate, R.L., 1995. *Soil Microbiology*. 398 p. John Wiley, New York.

- Tate III, R.L., 2000. Soil Microbiology. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Tisdall, J.M., 1991. Fungal hyphae and structural stability of soil. *Aust. J Soil Res.*, 29: 729-743.
- Tisdall, J.M., Oades, J.M., 1982. Organic matter and water stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.*, 33: 141-161.
- Torres Lozada, P., Escobar, J.C., Pérez Vidal, A., Imery R., Nates, P., Sánchez, G., Sánchez, M., Bermúdez, A. 2005. Influencia del material de enmienda en el compostaje de lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales-PTAR. *Ingeniería e Investigación*, 58: 53-61.
- Trasar-Cepeda, M.C., Gil Sotres, F., Guitián Ojea, F., 1985. Determinación de la actividad de la fosfatasa en suelos gallegos. Precisiones al método de Saratchandra y Perrott. *An. Edaf. Agrobiol.*, 44: 987-991.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, C., Gil-Sotres, F., Seoane, S., 1998. Towards a biochemical quality index for soils: an expression relating several biological and biochemical properties. *Biol.Fertil.Soils*. 26: 100-106.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós de la Peña, M.C., García-Fernández, F., Gil-Sotres, F., 2000a. Propiedades bioquímicas de los suelos gallegos: su utilización como indicadores de la calidad del suelo. En *Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España*. C. García, M.T.Hernández (Eds.) CSIC-CEBAS, Murcia, pp: 147-206.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Gil Sotres, F., 2000b. Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in area of the European temperate-humid zone (Galicia, NW Spain): Specific parameters. *Soil Biol Biochem.*, 32: 747-755.
- Trasar-Cepeda C., Leiros M.C., Seoane S., Gil-Sotres, F., 2000c. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 1867-1875.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Gil-Sotres, F., 2008a. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. *Soil Biol. Biochem.*, 40:2146-2155
- Trasar-Cepeda C., Leiros M.C., Gil-Sotres, F.,2008b. Modofication of biochemical properties of soils use.*J. Soil Sc. Plant Nutr.*, 8: 53-60.
- Turner, B.L., Hopkins, D.W., Haygarth, P.M., Ostle, N., 2002. β -Glucosidase activity in pasture soils. *App. Soil Ecol.*, 20: 157-162.
- Urbain, V., Block, J.C., Manem, J., 1993. Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Water Research*, 27: 829-838.
- Usman, A.R.A., Kuzyakov, Y., Stahr, K., 2004. Dynamics of organic Mineralization and the Mobile fraction of Heavy Metals in a calcareous Soil Incubated with Organic Wastes. *Water Air and Soil Pollut.*, 158: 401-418.
- Vallejo, M., Londoño, A.C., López, R., Galeano, G., Álvarez, E., Dévia, W., 2005. Establecimiento de parcelas permanentes en bosques de Colombia (métodos para estudios ecológicos largo plazo). Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá D.C. 310 p.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 19: 703-707.

- Van Gestel, M., Ladd, J.N., Amato, M., 1991. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: Influence of sequential fumigation, drying and storage. *Soil Biol. Biochem.*, 23: 313-322.
- Van Gestel, M., Merckx, R., Vlassak, K., 1993. Microbial biomass responses to soil drying and rewetting: The fate of fast- and slow- growing microorganisms in soils from different climates. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 109-123.
- Vesilind, P.A. 2003. Wasterwater treatment plant design water Environment Federation: IWA Publishing, London.
- Villesot, D., Fery, G., 1994. Le compost de boues de stations d'épuration. *Techniques Sciences Methodes : Génie urban, génie rural.*, 12 : 722-728.
- Virzo de Santo, A., Berg, B., Rutigliano, F.A., Allani, A., Fioretto, A., 1993. Factors regulating early-stage decomposition of needle litters in five coniferous forests. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 1423-1433.
- Vuorinen, A.H., 1993. Requirement of p-nitrophenol standard for each soil. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 295-296.
- Wadman, W.P., Haan, S., 1997. Decomposition of organic matter from 36 soils in a long term pot experiment. *Plant Soil*, 189: 289-301.
- Wardle, D.A., 1992. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 67: 321-358
- Wardle, D.A., Ghani, A., 1995. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biol. Biochem.*, 27: 1601-1610.
- Warketin, B.P., Fletcher, H.F., 1977. Soil quality for intensive agriculture. In: *Proceedings of the International Seminar on Soil Environment and Fertilizer Management in Intensive Agriculture*. Society for Science of Soil and Manure, National Institute of Agricultural Science, Tokyo, pp. 594-598.
- West, A.W., Sparling, G.P., Speir, T.W., 1989. Microbial activity in gradually dried or rewetted soils as governed by water and substrate availability. *Aust. J Soil Res.*, 27: 747-57.
- White, P.S., Walker, J.L., 1997. Approximating nature's variation: selecting and using reference information in restoration ecology. *Restor. Ecol.*, 5: 338-349.
- Williams, M.A., Xia, K., 2009. Characterization of the water soluble soil organic pool following the rewetting of dry soil in a drought-prone tallgrass prairie. *Soil Biol. Biochem.*, 41:21-28.
- Winogradsky, S. 1949. *Microbiologie du sol*. Masson et Cie Éditeurs. Paris.
- Wright, S.F., Upadhyaya, A., 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.* 161: 575-585.
- Wu, J., Brookes, P.C., 2005. The proportional mineralization of microbial biomass and organic matter caused by air-drying and rewetting of a grassland soil. *Soil Biol. Biochem.*, 37:507-515.
- Yeomans, J.C., Bremner, J.M., 1989. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Comm Soil Sci Plant Anal.*, 19: 1467-1476.

- Zaman, M., Chang, S.X., 2004. Substrate type, temperature, and moisture content affect gross and net mineralization and nitrification rates in agroforestry systems. *Biol. Fert. Soils*, 39: 269-279.
- Zantua, M.I., Bremner J.M., 1975. Comparison of methods of assaying urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 7: 291-295.
- Zhao, B., Chen, J., Zhang, J., Qin, S., 2010. Soil microbial biomass and activity response to repeated drying–rewetting cycles along a soil fertility gradient modified by long-term fertilization management practices. *Geoderma*, 160: 218-224.
- Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Arcenegui, V., García-Orenes, F., Mataix-Beneyto, J., 2006. Assessing air-drying and rewetting pre-treatment effect on some soil enzyme activities under Mediterranean conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 38: 2125-2134.
- Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Arcenegui, V., García-Orenes, F., Mataix-Beneyto, J., 2007a. Assessing the effects of air-drying and rewetting pre-treatment on soil microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soluble carbon under Mediterranean conditions. *Eur J Soil Biol.*, 43: 120-129.
- Zornoza R, Guerrero C, Mataix-Solera J, Guerrero C, Arcenegui V, Mayoral AM, Morales J, Mataix-Beneyto J., 2007b. Soil properties under natural forest in the Alicante province of Spain. *Geoderma*, 142: 334-341.
- Zornoza R, Mataix-Solera J, Guerrero C, Arcenegui V, García-Orenes F, Mayoral AM, Mataix-Beneyto J, Morugán A., 2007c. Evaluation of soil quality using multiple lineal regressions based on physical, chemical and biochemical properties. *Sci Total Environ.*, 378: 233-237.
- Zornoza R, Mataix-Solera J, Guerrero V, Arcenegui V, Mataix-Beneyto J, Gómez I., 2008. Validating the effectiveness and sensitivity of two soil quality indices based on natural forest soils under Mediterranean conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 40: 2079-2087.



Publicaciones asociadas a la tesis



Publicaciones asociadas a la tesis

- Ojeda G, Marando G, Bonmatí M, Alcañiz J.M., 2009. Time dependence of soil water hysteresis in a minesoil reclaimed by sewage sludge amendments. *Poromechanics IV*, DEStech Publications, Inc., PA. pp 537-542. ISBN 978-1-60595-006-8
- Ojeda, G., Mattana, S., Alcañiz, J.M., Marando, G., Bonmatí, M., Woche, S.K., Bachmann, J., 2010. Wetting process and soil water retention of a minesoil amended with composted and thermally dried sludges. *Geoderma*, 156: 399-409.
- Marando, G., Jiménez, P., Hereter, A., Juliá, M., Ginovart, M., Bonmatí, M., 2011. Effects of thermally dried and composted sewage sludges on the fertility of residual soils from limestone quarries. *Applied Soil Ecology* 49: 234- 241.
- Marando, G., Jiménez, P., Josa, R., Juliá, M., Ginovart, M., Bonmatí, M., 2012. Effects of Air-Drying and Rewetting on Extractable Organic Carbon, Microbial Biomass, Soil Respiration and β -Glucosidase and β -Galactosidase Activities of Minimally Disturbed Soils Under Mediterranean Conditions. In: *Soil Enzymology in The Recycling of Organic Wastes and Environmental Restoration. Part I Enzymes as Indicators of Environmental Soil Quality* 103-118. Rad C, Gonzalez-Carcedo S, Trasar-Cepeda C, García-Izquierdo C y Hernandez T (Eds). Springer
- Jiménez, P., Marando, G., Josa, R., Juliá, M., Ginovart, M., Bonmatí, M., 2012. Biochemical Characterisation of Minimally Disturbed Soils under Mediterranean Conditions. In: *Soil Enzymology in The Recycling of Organic Wastes and Environmental Restoration. Part I Enzymes as Indicators of Environmental Soil Quality* 77-89. Rad C, Gonzalez-Carcedo S, Trasar-Cepeda C, García- Izquierdo C y Hernandez T (Eds). Springer