

Universitat Politècnica de Catalunya

Tesi Doctoral

INDICADORS DE QUALITAT BIOQUÍMICA,
RELACIONATS AMB EL CICLE DEL CARBONI, EN LA
RESTAURACIÓ DE SÒLS AMB FANG DE DEPURADORA
SOTMÈS A ASSECATGE TÈRMIC I A COMPOSTATGE

Patricia Jiménez de Ridder

Juny 2014



**Departament d'Enginyeria
Agroalimentària i Biotecnologia**

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA



**Escola Superior d'Agricultura
de Barcelona**

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Universitat Politècnica de Catalunya

DEPARTAMENT D' ENGINYERIA AGROALIMENTÀRIA I
BIOTECNOLOGIA

Programa de Doctorat de Biotecnologia Agroalimentària i
Sostenibilitat

INDICADORS DE QUALITAT BIOQUÍMICA,
RELACIONATS AMB EL CICLE DEL CARBONI, EN LA
RESTAURACIÓ DE SÒLS AMB FANG DE DEPURADORA
SOTMÈS A ASSECATGE TÈRMIC I A COMPOSTATGE

Autor: *Patrícia Jiménez de Ridder*

Director de Tesi: Dr. Manuel Bonmatí Pont

Codirector de Tesi: Dr. Ramon Josa March

Memòria presentada per optar al títol de
DOCTORA PER LA UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Castelldefels, Juny 2014

Acta de qualificació de tesi doctoral

Curs acadèmic: 2013-2014

Nom i cognoms

PATRÍCIA JIMÉNEZ DE RIDDER

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:

NO APTE

APROVAT

NOTABLE

EXCEL·LENT

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

SÍ

NO

(Nom, cognoms i signatura)	(Nom, cognoms i signatura)
President de la Comissió Permanent de l'Escola de Doctorat	Secretària de la Comissió Permanent de l'Escola de Doctorat

Barcelona, _____ d'/de _____ de _____

RESUM

En la restauració d'activitats extractives és imprescindible la utilització d'un material edàfic de qualitat per abordar degudament la revegetació. Els fangs procedents de EDARs, convenientment dosificats i ben incorporats, poden ser molt útils com a esmena orgànica. En el nostre treball hem estudiat alguns aspectes de qualitat bioquímica en el procés de rehabilitació de sòls degradats a través de l'aplicació de fangs d'EDARs. Com a paràmetres de qualitat bioquímica del sòl ens hem centrat en el cicle del carboni, a través del contingut en carbohidrats totals (CHT) i extractables (CHE) i de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa (GLC) i β -galactosidasa (GAL) i com a paràmetres auxiliars en el contingut en Carboni orgànic (C) i Nitrogen aminoacídic (N_{AA}). També hem treballat amb resultats de dues activitats enzimàtiques relacionades amb el cicle del nitrogen, la proteolítica de BAA (BAA) i la ureàsica (UR). Hem portat a terme dues experiències d'aplicació de fangs, una primera en lisímetres i una segona en parcel·les i ambdues amb sòls de diferent textura. El disseny experimental de les dues experiències és d'especial interès ja que planteja estudiar en paral·lel els efectes de l'assecatge tèrmic i el compostatge d'un mateix fang deshidratat. Aquest estudi central de la tesi es complementa amb un treball sobre l'estàndard de qualitat en sòls naturals de Catalunya així com amb aportacions sobre la metodologia analítica per a la determinació de dos dels paràmetres estudiats (C i GLC).

Com a primera part de la tesi estudiem les característiques bioquímiques en deu sòls naturals representatius dels sòls catalans. Els resultats mostren ampli rang de valors de carboni i alta dispersió dels paràmetres bioquímics i els rangs obtinguts són similars als de sòls d'altres zones de clima mediterrani. Els paràmetres bioquímics presenten correlacions altes i positives entre ells i alhora una gran dependència del contingut en matèria orgànica del sòl així com del contingut en biomassa microbiana. El contingut en CHT està més correlacionat que les activitats enzimàtiques, amb els continguts de C orgànic i N orgànic del sòl. La GLC és l'activitat enzimàtica més relacionada amb el contingut de carboni orgànic del sòl. Les quatre activitats enzimàtiques (GLC, GAL, BAA i UR) estan més lligades a la fracció làbil de carbohidrats que a la total i les activitats GAL, UR i BAA estan molt relacionades entre elles. L'estudi ha permès constatar la influència del tipus de sòl, roca mare o vegetació en les característiques bioquímiques del grup de sòls forestals.

Pel que fa a l'aplicació de fangs, en la primera experiència hem estudiat l'efecte de tres fangs: deshidratat (D), assecat tèrmicament (T) i compostat (C) en dues dosis (per assolir un 3 % i 6 % de matèria orgànica) sobre els paràmetres bioquímics de dos sòls control degradats (argilós i sauló) provinents de pedreres (1% C i 0,1% C). L'assaig es realitza en condicions de laboratori i consta de tres mostreigs (7, 67 i 267 dies). Inicialment es detecta un increment del valor per totes les variables bioquímiques (a excepció de l'activitat UR) en les barreges sòl-fang i el contingut en CHE és la variable més incrementada. Al final de l'experiència les barreges tenen uns valors de carbohidrats i activitats enzimàtiques incrementats respecte del control de forma similar a l'increment final en matèria orgànica, i el contingut en N_{AA} és la variable més incrementada respecte del sòl control. Les diferències en els valors de l'activitat enzimàtica GLC a l'inici en funció del tipus de fang (T>D>C) són un reflex de la labilitat de la matèria orgànica aportada pels fangs. El conjunt de resultats indiquen

que: i) l'assecat tèrmic accelera el primer procés de descomposició de la matèria orgànica; ii) el compostatge proporciona una matèria orgànica no tan làbil, però amb més activitat enzimàtica que comporta més mineralització i, amb el temps, una matèria orgànica més estable i iii) l'evolució de la matèria orgànica es frena quan els fangs s'apliquen en un sòl argilós.

La segona experiència consta d'un assaig d'aplicació de fangs en dos terrenys degradats i analitzem les mostres inicials (4 dies) i finals (295 dies) de parcel·les on s'han aplicat els mateixos tres fangs de l'experiència en lisímetres, però amb una única dosi (10 Mg/ha, en matèria seca). En el cas de l'aplicació de fangs al sòl franc-arenós (sòl amb baix contingut en matèria orgànica i alta activitat enzimàtica) la dinàmica de mineralització ha estat intensa i la incidència sobre les propietats bioquímiques del sòl, un any després de l'aplicació dels fangs, ha estat molt poc acusada. Contràriament, els efectes sobre el sòl franc, on la dinàmica de la matèria orgànica ha estat menor, són més importants i bàsicament han significat l'augment del contingut en matèria orgànica i la millora de la potencialitat de la matèria orgànica d'obtenir formes assimilables de carboni.

Els resultats dels aspectes metodològics indiquen que la determinació de carboni orgànic per combustió ha resultat eficaç i confirmen la manca d'idoneïtat del mètode d'oxidació per a mostres de sòl-fang. Pel que fa a l'estudi de l'activitat β -glucosidasa i β -galactosidasa en sòls, el nostre treball representa una contribució a la descripció detallada del procediment analític i a la incidència sobre el valor de l'activitat de la determinació a partir de mostra humida o bé assecada a l'aire.

Paraules clau: sòls naturals de Catalunya, restauració de sòls, fang compostat, fang assecat tèrmicament, carboni orgànic del sòl, nitrogen aminoacídic del sòl, activitats enzimàtiques del sòl, carbohidrats del sòl.

Les experiències que es presenten en aquesta tesi han estat parcialment finançades per la CIRIT i el Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya (Projecte ECOFANGS).

ABSTRACT

Materials used in the process of restoration of mining activities must be of good quality in order to adequately address the vegetation process. Sewage sludges, when properly dosed and well incorporated, can be very useful as organic amendments. In our work we have studied some aspects of biochemical quality in the rehabilitation process of degraded soils, through the application of sewage sludge. As biochemical quality parameters, the focus is on the carbon cycle, through total (TCH) and extractable (ECH) carbohydrate content and β -glucosidase (GLC) and β -galactosidase (GAL) enzyme activities. Two auxiliary parameters have also been controlled: organic carbon (C) and amino acid nitrogen (AAN). We have obtained results of two (BAA-hydrolysing and urease) enzymatic activities which are related to the nitrogen cycle. We have conducted two experiments of sludge application over soils of different texture. In the first experiment we have used containers and the second one has been performed in plots. This experimental design is of special interest because it raised the aim of studying the effects of thermal drying or composting on one same dehydrated sludge. The study has been supplemented by work on the standard quality of natural soils of Catalonia and also with an approach to the analytical methodology used in the determination of two of the parameters (C and GLC).

In the first part of the thesis the biochemical characteristics of ten natural soils which were representative of Catalan soils have been studied. The results show the wide range of values of carbon and the high dispersion of biochemical parameters, and also that the ranges of obtained values are similar to those of other soils also belonging to Mediterranean areas. Biochemical parameters show high positive correlations among them and also a high dependence on the organic matter and the microbial biomass contents of the soil. The TCH content is more correlated with organic C and organic N than the enzyme activities. GLC is the activity showing the highest correlation with the organic carbon content. The four enzymatic activities (GLC, GAL, BAA and UR) are more related to the labile than to the total fraction of carbohydrates. GAL, BAA and UR are very interrelated. The study confirms the influence of soil type, vegetation or bedrock on the biochemical characteristics of the forest soils group

With respect to the application of sludge, in the first experiment we have studied the effect of three sludge types, dehydrated (D), thermally dried (T) and composted (C), added in two different proportions (to reach 3% and 6% of total organic matter) on the biochemical parameters of two degraded soils (clay and sand) from quarrying (1% C and 0.1% C). The test has been carried out under laboratory conditions and samples were taken after 7, 67 and 267 days. Initially, an increased value is detected for all biochemical variables (except the UR activity) in the amended soils, CHE being the most enhanced variable. At the end of the experiment the carbohydrates content and the enzyme activities of the mixtures has increased, compared to the control, in a similar value than C, AAN being the most enhanced parameter. The initial differences in the values of GLC enzyme activity depending on the type of sludge (T > D > C) are a reflection of the lability of organic matter provided by the sludge. The overall results indicate that: i) thermal drying accelerates the initial decomposition process of the organic matter which takes place in the soil; ii) composting provides a less labile but more active organic matter, which results in increased mineralization and eventually a more stable organic matter and iii) a slowing on the development of organic matter was detected when the sludge was applied in a clay soil.

The second experiment using sludges consists in a trial with two degraded soils. Initial (4 days) and final (295 days) samples are analysed in plots where the same sludge is applied than in the experience with containers, but with a single dose (10 Mg/hectare, in dry matter). In the case of the application of sludge to a sandy-loam soil, which has a low organic matter content and high enzymatic activity, the dynamics of mineralization is intense and the impact on biochemical properties one year after the application is not very important. In contrast, the effects on a loam soil, where the dynamics of organic matter is lower, are more important and primarily consists of an increase of ready available organic carbon.

Organic carbon determination by the combustion method is proved to be effective and the inappropriateness of the oxidation method for sludge-soil mixtures is confirmed. Our study of β -glucosidase and β -galactosidase activities in soils is a contribution to the detailed description of the analytical procedure and to the elucidation of the influence of air drying soil samples in the obtained activity values

Keywords: natural soils of Catalonia, restoring soil, composted sludge, thermally dried sludge, soil organic carbon, soil amino acid nitrogen, soil enzyme activities, soil carbohydrates.

A la meva mare,

i als meus.

A l'Antoni,

a la Mar

i a en Blai.

*...és preferible que durí molt anys,
que síguís vell
quan fondegís l'illa,
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí,
sense esperar que et doni més riqueses...*

Lluís LLach

El tiempo que te quede libre, si te es posible, dedícalo a mí.

M.D Pradera

*Gairebé tot el que facis serà insignificant,
però és molt important que ho facis.*

M.Gandhi

No es tira endavant celebrant èxits sinó superant fracassos.

O. Swett Marden

AGRAÏMENTS

Sovint he tingut la sensació que un treball escrit és d'alguna manera com un destil·lat, el producte que resulta d'un procés de separació, a través de successives etapes d'enriquiment, com el que té lloc en els plats d'una columna de destil·lació. Doncs bé, aquest document és, sens dubte, el resultat d'una destil·lació, d'una destil·lació fraccionada, a través d'una columna molt llarga, on han calgut molts plats i on, donat el comportament no ideal, s'han anat formant més d'un azeotrop.

Moltes persones del meu voltant han contribuït a mantenir dreta aquesta columna durant molt temps i per totes elles van aquestes breus paraules d'agraïment.

Vull agrair a en Manel la seva entrega i estima en la direcció de la tesi així com l'entusiasme transmès a l'obrir-me la porta al món dels enzims del sòl. A en Ramon voldria agrair-li les inoblidables estones de camp amb els sòls naturals i l'empenta i acompanyament en l'etapa final. A la Marta, els nostres passis de pilota entre teulades en el seu suport més que incondicional i entranyable amb l'estadística. A la Graciela, haver-me donat l'oportunitat de viatjar en un valuós tàndem durant un bon tros de camí.

A tots amb els que he viscut la feina del laboratori: a la Maria Julià i les seves llibretes -que m'han permès fer amb èxit grans cerques arqueològiques-, a la Maria Rodríguez per les infinites facilitats, a l'Enric per les innombrables estones dedicades al TOC i a la Giovanna per l'assessorament amb les analítiques dels aminoàcids; i també a tots els companys que dediquen part del seu temps a fer més agradable el dia a dia a l'ESAB.

Al jovent, Montse, Marga, Òscar....per les vegades que m'han ajudat i perquè amb ells he pogut compartir molt més que un doctorat.

A l'Agnès, la Maïte, la Roser i la Elena pel seu càlid i afectuós acompanyament.

A la meua germana que ha sabut com donar vida i color a aquest document en fer-se càrrec de l'attrezzo final.

També vull donar les gràcies als que van contribuir, en el seu dia, a fer realitat el *Projecte Ecofangs* així com a les persones que van crear el *Grupo Español de Enzimas del Suelo*.

Finalment no vull oblidar-me de pensar en tots aquells que, en diferents moments, han sabut com preguntar-me per l'assignatura pendent, ni de tots aquells als quals els hi he agrait sempre el seu silenci.

Ja per acabar, i tornant al símil inicial, voldria agrair molt especialment la paciència de la Tere i d'en Josep, que no han deixat mai de vetllar pels plats trencats, i com no, l'ajut dels de casa, per fer-me costat i per carregar amb els plats bruts i el suport de la meua família i amics, que han estat la font d'energia imprescindible del matràs d'escalfament.

ÍNDIX

1	CONTEXT, OBJECTIUS GENERALS I ORGANITZACIÓ DE LA TESI	31
2	INTRODUCCIÓ GENERAL	37
2.1	LA PERSPECTIVA: LA QUALITAT DEL SÒL	37
2.1.1	L'estudi de la qualitat del sòl	37
2.1.2	El component biològic de la qualitat del sòl	40
2.1.3	Els enzims com a indicadors de qualitat del sòl: potencialitat i mancances	46
2.2	ELS NOSTRES PARÀMETRES	59
2.2.1	Carboni orgànic i Nitrogen aminoacídic	59
2.2.2	Carbohidrats totals i Carbohidrats extractables	62
2.2.3	Activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa	66
3	PARÀMETRES DE QUALITAT BIOQUÍMICA EN SÒLS NATURALS DE CATALUNYA	75
3.1	ANTECEDENTS: L'ESTUDI DE LA QUALITAT BIOQUÍMICA EN SÒLS NATURALS	75
3.1.1	La recerca d'autors espanyols	75
3.1.1.1	Estudis del grup de Galícia	77
3.1.1.2	Estudis del grup d'Alacant	79
3.1.1.3	Estudis del grup de Múrcia	80
3.1.2	La recerca d'autors italians	82
3.2	OBJECTIUS	83
3.3	MATERIAL I MÈTODES	83
3.3.1	Disseny experimental	83
3.3.2	Materials	85
3.3.2.1	Característiques de camp i dades climàtiques	85
3.3.2.2	Característiques físico-químiques	86
3.3.2.3	Valors dels paràmetres bioquímics complementaris	90
3.3.3	Mètodes d'anàlisi	90
3.3.4	Tractament estadístic de dades	91
3.4	RESULTATS	93
3.4.1	Visió de conjunt dels paràmetres a través dels resultats del tercer any de mostreig	93
3.4.2	Incidència de l'any de mostreig	98
3.4.2.1	Resultats obtinguts en el primer i segon any de mostreig i contrast amb els resultats del tercer any de mostreig	98
3.4.2.2	Resultats globals dels tres anys de mostreig	100
3.4.3	Correlacions entre paràmetres	101
3.4.4	Efecte dels pretractament de la mostra	104
3.4.4.1	Efecte del pretractament d'assecat a l'aire de la mostra sobre les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa	104
3.4.4.2	Correlacions de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa determinades a partir de la mostra assecada a l'aire	106
3.5	DISCUSSIÓ	108
3.5.1	Comportament dels paràmetres	108
3.5.2	Diferències bioquímiques entre els sòls naturals	114
3.5.3	Efecte pretractament de la mostra	115
3.6	CONCLUSIONS	117

4	CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA DE MOSTRES SÒL-FANG PROCEDENTS DE L'EXPERIMENTACIÓ EN LISÍMETRES I EN PARCEL·LES.....	121
4.1	ANTECEDENTS: EFECTES DE L'APLICACIÓ DE FANGS DE DEPURADORA SOBRE LA QUALITAT BIOQUÍMICA DEL SÒL.....	121
4.1.1	Resultats de proves in vitro: experiències d'incubacions sòl-fang en condicions controlades	121
4.1.2	Resultats de proves de camp: experimentació en contenidors a l'exterior o en parcel·les.....	128
4.1.2.1	Experiències sobre aplicació agrícola de fangs.....	128
4.1.2.2	Experiències sobre aplicació de fangs en restauració.....	130
4.2	OBJECTIUS	134
4.3	MATERIAL I MÈTODES	134
4.3.1	Experiència 1: experiència en lisímetres	135
4.3.1.1	Disseny experimental	135
4.3.1.2	Materials.....	136
4.3.2	Experiència 2: experiència en parcel·les	138
4.3.2.1	Disseny experimental	138
4.3.2.2	Materials.....	140
4.3.3	Mètodes d'anàlisi	142
4.3.4	Tractament estadístic de dades	143
4.4	RESULTATS I DISCUSSIÓ	144
4.4.1	Experiència 1: experiència en lisímetres	144
4.4.1.1	Efectes globals.....	144
4.4.1.2	Efectes en els continguts de Carboni orgànic, N aminoacídic, Carbohidrats totals i extractables	156
4.4.1.3	Efectes en les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa.....	164
4.4.1.4	Efectes en les activitats enzimàtiques proteolítica de BAA i ureàsica	171
4.4.1.5	Efectes dels posttractaments dels fangs sobre les característiques finals de les mostres	175
4.4.2	Experiència 2: experiència en parcel·les	179
4.4.2.1	Efectes globals.....	179
4.4.2.2	Efectes en el contingut de: C orgànic, N aminoacídic, Carbohidrats totals i extractables.....	183
4.4.2.3	Efectes en les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa.....	189
4.4.2.4	Efectes en les activitats enzimàtiques proteolítica de BAA i ureàsica	193
4.4.2.5	Efectes posttractaments fangs sobre les característiques finals de les mostres	198
4.4.3	Comparació entre els resultats de les experiències en lisímetres i en parcel·les i amb els resultats dels sòls naturals.....	201
4.5	CONCLUSIONS	205
5	METODOLOGIA ANALÍTICA ASSOCIADA ALS PARÀMETRES ESTUDIATS	209
5.1	INTRODUCCIÓ	209
5.1.1	Mètodes de determinació de Carboni orgànic.....	209
5.1.1.1	Carboni total.....	209
5.1.1.2	Carboni oxidable	211

5.1.2 Mètodes d'anàlisi de Nitrogen aminoacídic	216
5.1.3 Mètodes de determinació de Carbohidrats totals i Carbohidrats extractables	217
5.1.4 Mètodes de determinació de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa	220
5.2 OBJECTIUS	222
5.3 MATERIALS.....	222
5.4 MÈTODES: SELECCIÓ I CARACTERÍSTIQUES	223
5.4.1 Carboni orgànic	223
5.4.1.1 Carboni orgànic per combustió.....	223
5.4.1.2 Carboni orgànic a partir del C-oxidable	224
5.4.2 Nitrogen aminoacídic.....	225
5.4.3 Carbohidrats totals i carbohidrats extractables	227
5.4.4 Activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa	228
5.5 RESULTATS I DISCUSSIÓ	229
5.5.1 Determinació de carboni orgànic per combustió	229
5.5.1.1 Posada a punt del mètode de determinació de C orgànic	229
5.5.1.2 Resultats i discussió de la posada a punt del mètode	231
5.5.1.3 Contrast dels resultats de C orgànic obtinguts per combustió amb els valors de C-oxidable en les mostres de sòl-fang	234
5.5.2 Determinació de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa	240
5.5.2.1 Posada a punt del mètode	240
5.5.2.2 Resultats i discussió de la posada a punt del mètode	241
5.6 CONCLUSIONS	250
6 SÍNTESI: RESULTATS MÉS RELLEVANTS.....	253
7 CONCLUSIONS GENERALS	261
8 BIBLIOGRAFIA	265
8.1 PUBLICACIONS ASSOCIADES A LA TESI	290
 ANNEX: DESCRIPCIÓ DE LA METODOLOGIA ANALÍTICA	 1

ÍNDIX DE TAULES

Taula 2.1. Propietats de qualitat biològica del sòl i els seus indicadors (Gregorich et al., 1997).....	41
Taula 2.2. Criteris de classificació dels enzims en funció de la seva localització al sòl.....	47
Taula 2.3. Composició i proporció relativa mitjanes de monosacàrids en sòls d'acord a la recopilació de dades analítiques de carbohidrats en una col·lecció de 60 mostres de diferents tipus de sòls (Cheshire, 1979).	63
Taula 3.1. Característiques generals i singularitats dels treballs en sòls naturals dels diferents grups espanyols.	76
Taula 3.2. Identificació de les mostres i localització de les zones de mostreig.	84
Taula 3.3. Característiques generals de les zones de mostreig.....	85
Taula 3.4. Paràmetres generals de les 10 mostres de sòls (any 2004).	86
Taula 3.5. Paràmetres generals de les 10 mostres de sòls per a cada any de mostreig.	88
Taula 3.6. Variabilitat interanual dels paràmetres generals per a cada mostra (mitjana de 3 anys, excepte pH mitjana de 2 anys).	89
Taula 3.7. Valors de biomassa microbiana (mitjana i d.e) en les mostres de sòls naturals (any 2006) (Marando 2013).....	90
Taula 3.8. Correspondència entre tipus de tractament de dades i les variables estudiades.	91
Taula 3.9. Correspondència entre els objectius i els tractaments estadístics de dades.	92
Taula 3.10. Mitjana, rang i dispersió pels paràmetres (absoluts i relatius al carboni) en el conjunt de sòls naturals.....	93
Taula 3.11. Resultats de l'ANOVA (factor sòl) i de la separació de mitjanes (any 2006).	94
Taula 3.12. Resultats del contingut en carboni orgànic, carbohidrats totals i extractables en les mostres de sòls naturals (any 2006).	95
Taula 3.13. Resultats de les activitats β -glucosidasa i β -galactosidas en les mostres de sòls naturals (any 2006).....	96
Taula 3.14. Resultats de les activitats ureàsica i proteolítica de BAA en les mostres de sòls naturals (any 2006).....	97
Taula 3.15. Resultats de Carboni i de les activitats β -glucosidasa i ureasa en les mostres de sòls naturals (any 2004).	98
Taula 3.16. Resultats de Carboni i de les activitats β -glucosidasa , ureasa i proteolítica de BAA en les mostres de sòls naturals (any 2005).	99
Taula 3.17. Mitjana, rang i dispersió de valors dels paràmetres en el conjunt de sòls naturals (anys 2004 i 2005).	99
Taula 3.18. Resultats de l'ANOVA: Valor de F i la seva significativitat per cada factor i per la interacció.....	100
Taula 3.19. Resultats de carboni i de les activitats β -glucosidasa, ureasa i proteolítica de BAA considerant les mitjanes dels tres anys de mostreig.	101
Taula 3.20. Coeficients de correlació lineal (valor de R) entre paràmetres bioquímics i entre paràmetres bioquímics i paràmetres generals.	102
Taula 3.21. Resultat de l'estudi de les correlacions parcials a carboni (C) i biomassa (BMC) constant. Entre parèntesis el valor de R i la seva significativitat.	103
Taula 3.22. Resultat de l'estudi de correlacions totals i parcials a biomassa constant entre paràmetres bioquímics absoluts i relatius a carboni. Valor de R i la seva significativitat.....	103
Taula 3.23. Resultat de l'estudi de correlacions parcials a carboni (C) constant i a biomassa (BMC) constant entre paràmetres bioquímics i propietats generals dels sòls. Valor de R i la seva significativitat.	104
Taula 3.24. Resultat de l'ANOVA: Valor de F i la seva significació per cadascun dels dos factors i per la interacció.	105
Taula 3.25. Efecte pretractament de mostra sobre les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa ($\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$).	105
Taula 3.26. Efecte pretractament de mostra sobre les activitats específiques β -glucosidasa i β -galactosidasa ($\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{C h}^{-1}$).	105

Taula 3.27. Valor del coeficient de correlació entre les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa determinades sobre mostra humida i sobre mostra assecada a l'aire i la resta de paràmetres.	107
Taula 3.28. Resultat de l'estudi de les correlacions parcials a carboni (C) constant de les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa determinades sobre mostra assecada: valor de R i la seva significativitat.	107
Taula 4.1. Conjunt de tractaments de l'experiència en lisímetres i nomenclatura de les mostres.	135
Taula 4.2. Característiques dels sòls utilitzats en l'experiència en lisímetres (Tarrasón et al., 2004).	136
Taula 4.3. Característiques dels fangs utilitzats en l'experiència en lisímetres (Tarrasón et al., 2010).	137
Taula 4.4. Composició de les barreges sòl-fang de l'experiència en lisímetres (Tarrasón, 2004).	138
Taula 4.5. Conjunt de tractaments de l'experiència en parcel·les i nomenclatura de les mostres.	139
Taula 4.6. Característiques dels sòls utilitzats en l'experiència en parcel·les (Tarrasón, 2010).	140
Taula 4.7. Quantitats reals aplicades dels tres tipus de fang en l'experiència en parcel·les (Tarrasón, 2004).	141
Taula 4.8. Característiques de l'anàlisi estadística de l'ANOVA per a les dues experiències.	144
Taula 4.9. Mitjana global, rang i dispersió (de les mitjanes dels valors de tots els tractaments i temps) per les mostres de barreges sòl-fang de l'experiència en lisímetres.	145
Taula 4.10. Valors (mitjana \pm desviació estàndard) dels paràmetres per el sòl control argilós (COA) de l'experiència en lisímetres.	145
Taula 4.11. Valors (mitjana i desviació estàndard) dels paràmetres per el sòl control sauló (COS) de l'experiència en lisímetres.	145
Taula 4.12. Resultats de l'ANOVA 1A per a l'experiència en lisímetres: valors de F pels factors fang (F), dosi (D) i interacció fang-dosi (F x D).	147
Taula 4.13. Resultats de l'ANOVA 1B per a l'experiència en lisímetres: valors de F pels factors: fang (F), dosi (D) i interacció fang-dosi (F x D).	148
Taula 4.14. Resultats del contingut en carboni orgànic ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), carbohidrats totals i extractables ($\text{mg glucosa } \text{g}^{-1}$) i de les relacions CHE/CHT ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), CHE/C i CHT/C ($\text{g C-glucosa } 100 \text{ g}^{-1}\text{C}$) en les barreges de l'experiència en lisímetres corresponents al sòl argilós pels 7, 67 i 267 dies de mostreig.	149
Taula 4.15. Resultats del contingut en carboni orgànic ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), carbohidrats totals i extractables ($\text{mg glucosa } \text{g}^{-1}$) i de les relacions CHE/CHT ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), CHE/C i CHT/C ($\text{g C-glucosa } 100 \text{ g}^{-1}\text{C}$) en les barreges de l'experiència en lisímetres corresponents al sòl sauló pels 7, 67 i 267 dies de mostreig.	150
Taula 4.16. Resultats de les activitats β -glucosidasa ($\mu\text{mol pNFg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), ureàsica i proteolítica de BAA ($\mu\text{mol N } \text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) i de les activitats específiques GLC/C ($\mu\text{mol pNF } \text{g}^{-1} \text{ C } \text{h}^{-1}$), UR/C i BAA/C ($\mu\text{mol N } \text{g}^{-1} \text{ C } \text{h}^{-1}$) en les barreges de l'experiència en lisímetres corresponents al sòl argilós pels dies 7, 67 i 267 de mostreig.	151
Taula 4.17. Resultats de les activitats β -glucosidasa ($\mu\text{mol pNFg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), ureàsica i proteolítica de BAA ($\mu\text{mol N } \text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) i de les activitats específiques GLC/C ($\mu\text{mol pNF } \text{g}^{-1} \text{ C } \text{h}^{-1}$), UR/C i BAA/C ($\mu\text{mol N } \text{g}^{-1} \text{ C } \text{h}^{-1}$) en les barreges de l'experiència en lisímetres corresponents al sòl sauló pels 7, 67 i 267 dies de mostreig.	152
Taula 4.18. Resultats del contingut en nitrogen aminoacídic (N_{AA}) i activitat β -galactosidasa (GAL). Valors absoluts i relatius al carboni en les mostres finals (267 dies) de l'experiència en lisímetres per sòls controls ($\bar{x}\pm d.e$) i barreges corresponents al sòl argilós i sòl sauló.	153
Taula 4.19. Resultats dels quocients entre les activitats β -glucosidasa (GLC), β -galactosidasa (GAL), proteolítica de BAA (BAA) i ureàsica (UR) i el contingut en nitrogen aminoacídic (N_{AA}) en les mostres finals (267 dies) de l'experiència en lisímetres per sòls controls ($\bar{x}\pm d.e$) i barreges corresponents al sòl argilós i sòl sauló.	153
Taula 4.20. Rang de valors de l'efecte intensificador* per a les diferents variables a l'inici i al final de l'experiència en lisímetres.	154
Taula 4.21. Resultats les activitats β -glucosidasa (GLC) i β -galactosidasa (GAL), absoluta i específica, en els tres fangs (D fang deshidratat, T fang deshidratat i assecat tèrmicament i C fang deshidratat i compostat (mitjana $\pm d.e$)).	165
Taula 4.22. Valors de termoestabilitat i de K_M de l'activitat β -glucosidasa en les mostres finals de l'experiència en lisímetres.	170

Taula 4.23. Mitjana, rang i dispersió pels paràmetres pel conjunt de mostres (sòls control i de sòl-fang) de l'experiència en parcel·les.	180
Taula 4.24. Resultats de l'ANOVA 2A per a l'experiència en parcel·les: valors de F i significativitat del factor fang per cada temps.	180
Taula 4.25. Resultats de l'ANOVA 2B per a l'experiència en parcel·les: valors de F i significativitat del factor fang (395 dies).....	181
Taula 4.26. Mitjana de l'efecte intensificador* per a les diferents variables a l'inici i al final de l'experiència en parcel·les.	182
Taula 4.27. Valors del quocient entre les activitat β -glucosidasa i β -galactosidasa i el contingut en N aminoacídic en les parcel·les amb fang i en els sòl control al final de l'experiència.....	191
Taula 4.28. Valors de termoestabilitat i de K_M de l'activitat β -glucosidasa en les mostres finals (395 dies) de l'experiència en parcel·les.	193
Taula 4.29. Valors del quocient entre les activitat proteolítica de BAA i ureàsica i el contingut en N aminoacídic en les parcel·les amb fang i en els sòl control al final de l'experiència.....	196
Taula 5.1. Principals característiques de les diferents mètodes d'anàlisi del carboni oxidable en sòls (elaboració pròpia a partir de Nelson i Sommers, 1982).....	212
Taula 5.2. Valors pel factor de recuperació del C orgànic seguint mètode de Walkley-Black (Nelson i Sommers, 1982).....	213
Taula 5.3. Comparativa de les condicions experimentals de determinació de C-oxidable d'acord al mètode de Walkley-Black descrits en tres referències bibliogràfiques: España, 1993, Porta et al., 1986 i Nelson i Sommers, 1982.	214
Taula 5.4. Resum de les característiques dels principals mètodes d'anàlisi d'aminoàcids en sòls per HPLC (LLiberia, 1996).....	217
Taula 5.5. Interval de concentració per a la determinació de C, H i S en la mostra de sòl control (MAT-SL-0205). Els valors estan expressats en p/p i sms.	230
Taula 5.6. Resultats de l'estudi de linealitat per la determinació de C-total.....	231
Taula 5.7. Característiques dels rangs de calibració emprats per l'anàlisi de Carboni total en el conjunt de mostres.	232
Taula 5.8. Característiques dels rangs de calibració emprats per l'anàlisi de Carboni inorgànic en el conjunt de mostres.	232
Taula 5.9. Resultats de l'assaig sobre la influència del pes de mostra en la determinació de C total (CT) i C inorgànic (CI) de la mostra control (n=4). Resultats expressat sms.	232
Taula 5.10. Assaig de precisió i exactitud: Resultats de l'anàlisi de C total i C inorgànic en la mostra control (n=10). Resultats expressat sms.....	233
Taula 5.11. Resultats de l'assaig de la influència del pes de mostra en la determinació de C total en la mostra COA (n=4). Resultats expressat sms.	233
Taula 5.12. Assaig de precisió: resultats de l'anàlisi de C total i C inorgànic dues mostres reals (n=5). Resultats expressat sms.	234
Taula 5.13. Valor del quocient entre el valor de C orgànic obtingut per combustió i el C-oxidable (TOC/Cox) per les mostres de l'experiència en lisímetres.	236
Taula 5.14. Valor del quocient entre el valor de C orgànic obtingut per combustió i el C-oxidable (TOC/Cox) per les mostres de l'experiència en parcel·les.	236
Taula 5.15. Influència de la compensació de l'absorció del substrat en la recta de calibració (y , Absorbància a $\lambda= 400$ nm i x , mg.L ⁻¹ pNF).....	242
Taula 5.16. Component de l'absorció mesurada en l'assaig enzimàtic per mostres, controls i patrons (davant del blanc de reactius amb substrat com a referència).	244
Taula 5.17. Condicions experimentals per a l'ajust de pH en la determinació de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa pel conjunt de mostres de les tres experiències.....	247
Taula 5.18. Característiques de les rectes de calibració amb sòl de la determinació de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa pel conjunt de mostres estudiades.....	248
Taula 0.1. Resultats de l'anàlisi de N-aminoacídic en el conjunt de mostres.....	6

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 3.1 Distribució geogràfica de les 10 zones de mostreig dels sòls naturals.	84
Figura 3.2 Temperatura mitjana i precipitació (pels períodes de primavera i anual) en les 10 localitzacions estudiades en els tres anys de mostreig.	86
Figura 4.1 Experiència en lisímetres	135
Figura 4.2 Experiència en parcel·les (Tarrasón, 2004)	139
Figura 4.3 Valors de carboni orgànic en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.	156
Figura 4.4 Canvis en els valors de N-aminoacídic de les barreges de l'experiència en lisímetres. Valors inicials (0 dies) calculats i valors finals (267 dies) experimentals. Valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre fangs a una mateixa dosi. Valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre dosi per un mateix fang.	160
Figura 4.5 Valors de carbohidrats totals en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.	161
Figura 4.6 Valors de carbohidrats extractables en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.....	162
Figura 4.7 Additivitat sòl+fang per l'activitat β -glucosidasa : contrast entre el valor de l'activitat en les barreges (real, 7 dies) i el valor calculat considerant l'additivitat entre les activitats del sòl i del fang (previsió).	166
Figura 4.8 Valors de l'activitat β -glucosidasa en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.	167
Figura 4.9 Valors de l'activitat β -glucosidasa específica en les barreges sòl-fang als 7,67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.	168
Figura 4.10 Valors de l'activitat proteolítica BAA en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.....	172
Figura 4.11 Valors de l'activitat ureàsica en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a Diferents temps 7-67-267 dies.	173
Figura 4.12 Representacions radials del conjunt de paràmetres bioquímics estandarditzats considerant totes les mostres finals (267 dies) corresponents a les barreges amb el sòl A de l'experiència en lisímetres.....	177
Figura 4.13 Representacions radials del conjunt de paràmetres bioquímics estandarditzats considerant totes de les mostres finals (267 dies) corresponents a les barreges amb el sòl S de l'experiència en lisímetres.....	178
Figura 4.14 Valors de carboni orgànic en les parcel·les amb fang i en els sòl control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.....	184
Figura 4.15 Valors de N aminoacídic en les parcel·les amb fang i en els sòl control al final de l'experiència. Valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments.....	185
Figura 4.16 Valors de carbohidrats totals en les parcel·les amb fang i en els sòls control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.	185

Figura 4.17 Valors de carbohidrats extractables en les parcel·les amb fang i en els sòls control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.....	186
Figura 4.18 Valors de carbohidrats totals i carbohidrats extractables relatius al carboni en les parcel·les amb fang i en els sòl control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.	187
Figura 4.19 Valors d'activitat β -glucosidasa en les parcel·les amb fang i en els sòls control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.	189
Figura 4.20 Valors d'activitat β -glucosidasa específica en les parcel·les amb fang i en els sòl control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.....	190
Figura 4.21 Valors d'activitat β -galactosidasa absoluta i específica en les parcel·les amb fang i en els sòl control al final de l'experiència. Per un mateix sòl, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments.	191
Figura 4.22 Valors d'activitat proteolítica BAA en les parcel·les amb fang i en els sòls controls a l'inici i al final de l'experiència.	194
Figura 4.23 Valors d'activitat específica proteolítica BAA en les parcel·les amb fang i en els sòls controls a l'inici i al final de l'experiència.....	194
Figura 4.24 Valors d'activitat ureàsica en les parcel·les amb fang i en els sòls controls a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.	195
Figura 4.25 Valors d'activitat específica ureàsica en les parcel·les amb fang i en els sòls controls a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.....	196
Figura 4.26 Representacions radials del conjunt de paràmetres bioquímics absoluts i relatius al carboni orgànic i al N aminoacídic de les mostres finals (a diferent escala quan s'inclou en sòl control) en les parcel·les de sòl franc.....	199
Figura 4.27 Representacions radials del conjunt de paràmetres bioquímics absoluts i relatius al carboni orgànic i al N aminoacídic de les mostres finals (a diferent escala quan s'inclou en sòl control) en les parcel·les de sòl franc-arenós.	200
Figura 4.28 Esquema comparatiu dels rangs de valors dels diferents paràmetres en els sòls naturals (SN) (excepte PN), les mostres sòl-fang finals (267 dies) de l'experiència en lisímetres (lis) i les mostres finals sòl-fang (295 dies) de l'experiència en parcel·les (par).....	204
Figura 5.1 Reacció de derivatització d'aminoàcids amb 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (AQC) i formació de NHS (N-hidroxisuccinimida).....	225
Figura 5.2 Reacció d'hidròlisi de l'excés de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (AQC) i formació de AMQ (6-amino quinoleïna), NHS (N-hidroxisuccinimida) i CO ₂	226
Figura 5.3 Exemples de cromatogrames de separació dels aminoàcids en el patró i en dues mostres (ADH i ATH) de barreges sòl-fang de l'experiència en lisímetres.....	226
Figura 5.4 Reacció colorimètrica de les hexoses i pentoses amb antrona en medi àcid (Stevenson, 1982).....	227
Figura 5.5 Compostos proposats com a productes de la reacció entre l'antrona i hexoses (A) o pentoses (B) (Scherz i Bonn, 1998).....	227
Figura 5.6 Reacció de l'assaig enzimàtic de l'activitat β -glucosidasa (Àlef i Nannipieri, 1995).....	228

Figura 5.7 Reacció de l'assaig enzimàtic de l'activitat β -galactosidasa.....	228
Figura 5.8 Resultats de carboni orgànic d'acord als mètodes analítics de combustió (TOC) i d'oxidació (Corg). Mostres de l'experiència en lisímetres. (*) indica diferència significativa d'acord a aquest test de t ($P < 0,05$).	235
Figura 5.9 Resultats de carboni orgànic d'acord als mètodes analítics de combustió (TOC) i d'oxidació (Corg). Mostres de l'experiència en parcel·les. (*) indica diferència significativa d'acord a aquest test de t ($P < 0,05$).	236
Figura 5.10 Superposició dels espectres d'absorció del substrat p-nitrofenil β -D-glucopiranosid i del pNF a diferents concentracions.	242
Figura 5.11 Espectre de l'absorció conjunta del substrat p-nitrofenil β -D-glucopiranosid i del pNF a diferents concentracions.	242
Figura 5.12 Espectres d'absorció conjunta del substrat i el pNF, a diferents concentracions, davant la presència de substrat a la cubeta de referència.	242
Figura 5.13 Activitat β -glucosidasa : representació gràfica de la recta de calibració sense sòl i d'una recta amb sòl (MN, sòls naturals).....	245
Figura 5.14 Valors de pH de la suspensió sòl-tampó pH 6 per a les mostres de sòls naturals dels diferents anys de mostreig. Corba de neutralització per a set de les mostres de sòls naturals (mostreig 2004) per assolir pH 6.	246
Figura 5.15 Valors de pH de la suspensió sòl-tampó pH 6 per les barreges amb sòl argilós i amb sòl sauló de l'experiència en lisímetres. Corba de neutralització per a les mostres de sòl argilós i sauló dels lisímetres i de sòl franc en parcel·les.	247

Abreviatures

Paràmetres		
C	Contingut en	Carboni orgànic
N _{AA}		Nitrogen aminoacídic
CHT		Carbohidrats totals
CHE		Carbohidrats extractables
CHT/C	Relació entre	Carbohidrats totals i C orgànic
CHE/C		Carbohidrats extractables i C orgànic
CHE/CHT		Carbohidrats extractables i Carbohidrats totals
GLC	Activitat enzimàtica	β-glucosidasa
GAL		β-galactosidasa
UR		ureàsica
BAA		Proteolítica de N-benzoil-L-argininamida
GLC/C	Activitat enzimàtica específica	β-glucosidasa
GAL/C		β-galactosidasa
UR/C		Ureàsica
BAA/C		Proteolítica de N-benzoil-L-argininamida

Sòls Naturals		
LT	Sol natural de	Serra del Litoral
CR		Serra del Corredor
MN		Serra del Montnegre
VC		Plana de Vic
OR		Serra de L'Ordal
IG		Igualada, Conca d'Òdena
PN		La Panadella
BL		Balaguer, Serra dels Camps
LG		La Granja d'Escarp, Serra de la Picarda
SG		Segre, Plana al·luvial

Experiència en Lisímetres		
A	Sòl	Argilós
S		Sauló
COA	Sòl control	Argilós
COS		Sauló
D	Fang	Deshidratat
T		Deshidratat i assecat Tèrmicament
C		Deshidratat i Compostat
H	Dosi	Alta
L		Baixa

Experiència en Parcel·les		
F	Sòl	Franc
Fr		Franc-arenós
FO	Sòl control	Franc
FrO		Franc-arenós
D	Fang	Deshidratat
T		Deshidratat i assecat Tèrmicament
C		Deshidratat i Compostat

Metodologia Analítica		
Cox	Carboni	Orgànic oxidable
Corg		Orgànic obtingut per oxidació
TOC		Orgànic obtingut per combustió
CT		Total
CI		Inorgànic

Altres	
BMC	Carboni de la biomassa microbiana
K _M	Constant de Michaelis-Menten
pNF	p-nitrofenol
sms	Sobre mostra seca
d.e	Desviació estàndard
CV	Coefficient de variació

Context, Objectius Generals i Organització de la Tesi

1 CONTEXT, OBJECTIUS GENERALS I ORGANITZACIÓ DE LA TESI

La restauració de terrenys degradats pretén assegurar la presència i funcionalitat de tots els components presents al sòl no pertorbat per tal que, de manera natural, es recuperi la totalitat de l'ecosistema amb el desenvolupament d'unes comunitats vegetals i animals. En la restauració d'activitats extractives l'obtenció i la utilització d'un material edàfic de qualitat és l'única alternativa per abordar degudament la revegetació, una vegada corregits els aspectes geomorfològics. La disponibilitat i el cost d'aquest material solen ser problemàtiques ja que els residus minerals que es generen presenten característiques texturals i químiques poc favorables pel desenvolupament de la vegetació. Tot i que els residus minerals es poden fer servir en restauració abans s'han d'optimitzar per convertir-los en un bon substrat fent mescles amb altres terres o materials i amb la incorporació d'esmenes orgàniques o adobs com fems, composts, restes vegetals triturades o bé fangs de depuradores urbanes (Alcañiz et al., 1996 i 2008).

Els fangs de depuradora o biosòlids, convenientment dosificats i ben incorporats, poden ser molt útils per adobar terres o substrats pobres ja que aporten nitrogen i fòsfor, estimulen l'activitat microbiana i contribueixen a incrementar la matèria orgànica del sòl. Conjuntament amb els avantatges, però, s'ha de tenir en compte que no són aplicables a tot tipus d'explotacions i que s'han de respectar unes normes d'aplicació per no provocar contaminació del medi ni convertir la superfície a restaurar en una abocador encobert. En cap cas s'ha de veure l'aplicació de fangs en restauració únicament com una via d'eliminació d'aquest residu, sinó que s'han d'estudiar les seves possibilitats i també les seves limitacions (Clapp, 2007; Alcañiz et al., 2008; Singh i Agrawal, 2008; Soliva, 2008).

El fang de depuradora d'aspecte líquid anomenat fang cru és el produït directament a la línia d'aigües d'una estació de depuració d'aigües residuals (EDAR) per decantació. S'anomena fang tractat o **fang deshidratat** (i també biosòlid) al producte d'aspecte pastós (18-25 % de matèria seca) resultant de les etapes de deshidratació mecànica i estabilització química o biològica, per digestió aeròbica o anaeròbia. Aquests tractaments es porten a terme en la pròpia EDAR i són necessaris per tal de disminuir el volum, facilitar l'emmagatzematge, el transport i el destí final i alhora estabilitzar la fracció orgànica, higienitzar el residu i reduir el seu potencial de putrefacció. Els fangs deshidratats sovint es tracten en plantes de posttractaments per vies físiques (assecatge tèrmic) o biològiques (compostatge) per aconseguir reduccions de massa i volum més grans i/o estadis superiors d'estabilització/higienització de la fracció orgànica.

L'assecatge tèrmic de fangs aconsegueix posant en contacte el fang, directament o indirecta, amb una font de calor la reducció de la humitat (fins a 85-90 % de matèria seca) i la higienització del material i a més, el baix contingut d'aigua, afavoreix l'estabilitat de la fracció orgànica en impedir el progrés de l'activitat microbiana (Fernández et al., 2007a, 2007b i 2009; Moliner et al., 2008; Franco-Otero et al., 2012). El producte final té un aspecte de pols o bé es presenta comprimit i fragmentat formant els *pèl·lets*.

En el **compostatge els fangs** es barregen amb materials de característiques complementàries (material estructurant) i es fa un procés de digestió aeròbia en condicions controlades de temperatura, humitat i aireació. En aquest cas, el principal benefici és la transformació de la matèria orgànica, conjuntament amb la reducció de la humitat i la higienització (Moliner et al., 2008; Soliva, 2008).

Els fangs de depuradora es classifiquen com a residu no especial (codi 190805, en el Catàleg Europeu de Residus) i actualment no hi ha una normativa específica que reguli l'aplicació de fangs en la restauració de sòls. L'ús de fangs en la restauració d'espais degradats, s'engloba dins de la valorització agronòmica (agrícola, jardineria, restauració d'activitats extractives o terrenys marginals..) encara que en comparació a l'ús agrícola, es caracteritza per aportacions relativament altes, però úniques per unitat de superfície. En el flux de la gestió dels fangs de depuradora, la valorització agronòmica es contempla a partir del compliment de la normativa espanyola d'aplicació al sòl (RD 1310/1990) i les directrius comunitàries (CEE 86/278) sobre les limitacions en la utilització agrícola dels fangs, que fa referència al contingut en metalls pesant i contaminants orgànics; així un fang tractat (deshidratat i estabilitzat) que la compleixi es pot aplicar al sòl directament o bé després de sotmetre'l al posttractament d'assecatge tèrmic o bé de compostatge (Moliner et al., 2008). Les dades de l'Agència Catalana de l'Aigua (2011) indiquen que l'any 2010 en les EDAR de Catalunya es van generar 123.755 tones de fang (de fang deshidratat i en matèria seca) de les quals un 22 % no va ser sotmès a posttractament i que el 52 % va ser sotmès a l'assecatge tèrmic i el 26 % a compostatge. D'acord a les dades sobre les destinacions finals, van ser eliminades 117.745 tones de fang (en matèria seca), un 53,8 % a través de l'aplicació al sòl (agrícola, jardineria i restauració), un 45,6 % a través de la valoració no agronòmica (energètica en cimenteres) i un 0,6 % en dipòsits controlats. Val a dir que, tant el percentatge de fang sotmès a assecatge tèrmic, com el percentatge de fang destinat a valorització energètica, van ser superiors l'any 2010, respecte als registrats en anys anteriors corresponents al període 2007-2009.

La viabilitat de la restauració de sòls amb fangs de depuradora es va començar a estudiar fa uns 20 anys per l'equip del Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals (CREAF) de la Universitat Autònoma de Barcelona conjuntament amb l'Institut Químic de Sarrià (IQS) de la Universitat Ramon Llull, el Departament de Biologia Vegetal (Universitat de Barcelona) i l'ESAB de la Universitat Politècnica de Catalunya a través de diferents assaigs experimentals en projectes d'investigació i amb col·laboracions d'assessorament tècnic de les explotacions. Els primers estudis sobre l'aplicació dels fangs en restauració de pedreres de calcària es van fer amb fang deshidratat i amb dosis molt altes. En següents experiències s'estudià la viabilitat de l'aplicació de fangs posttractats amb assecatge tèrmic i compostatge ja que en principi suposen una esmena més segura i de més qualitat. Així en el projecte **Aprofitament de fangs de depuradora i productes derivats: fang compostat i fangs d'assecatge tèrmic, en la restauració terrenys degradats (projecte Ecofangs)** és on s'emmarquen les experiències d'aquesta tesi.

Com a fruit de les experiències en restauració cal destacar, per una banda, una primera publicació del *Manual de restauració d'activitats extractives amb fangs de depuradora* (Alcañiz et al., 1996) revisada i completada posteriorment com *Utilització de fangs de depuradora en restauració. Manual d'aplicació en activitats extractives i terrenys marginals* editat per l'Agència Catalana de l'Aigua i el Departament de Medi

Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya (Alcañiz et al., 2008). Aquest manual conté àmplia informació sobre requeriments per a l'aplicació dels fangs i fases de la restauració així com el protocol administratiu a seguir. L'aplicació de fangs es planteja com una esmena orgànica que millori les propietats físiques, aportí nutrients i afavoreixi el desenvolupament dels organismes edàfics i de la vegetació. Les condicions generals, que han de complir les explotacions i que condicionaran la seva aptitud per a la restauració amb l'aplicació de fangs, són les que deriven del tipus d'explotació i les característiques del medi físic on es troba i s'estableix una dosi màxima de 50 tones per hectàrea expressada en matèria seca.

Per altra banda, els resultats dels projectes han proporcionat un bon coneixement sobre la problemàtica de restauració de diverses activitats extractives amb fangs de depuradora que ha quedat reflectit en diversos articles científics. En aquests estudis s'ha demostrat les qualitats dels fangs per a la recuperació de sòls degradats i globalment els resultats es valoren positivament. Els fangs es presenten beneficiosos com a subministradors de macro i micronutrients, com a milloradors de les propietats físiques (reducció de la taxa d'erosió, augment d'estabilitat dels agregats) i per afavorir el recobriment i la biomassa vegetal, encara que en detriment de la diversitat. Tot i que els principals inconvenients per a l'ecosistema deriven a priori del contingut dels metalls pesants, contaminants orgànics, i dels riscos potencials per l'elevada quantitat de nitrogen (lixiviació de nitrats) s'ha constatat que i) el risc per metalls pesants és baix donada la baixa mobilitat i limitada transferència a les plantes; ii) molts dels contaminants orgànics es degraden en el sòl, i iii) és important limitar la dosi en funció del contingut en matèria orgànica làbil dels fangs (Alcañiz et al., 2008).

En aquest context, **l'objectiu central** d'aquesta tesi és estudiar alguns aspectes de la qualitat bioquímica associada a la rehabilitació de sòls degradats a través de l'aplicació de fangs d'EDAR. Concretament estudiem dos sòls de diferent textura i els fangs aplicats són un fang deshidratat i els dos fangs obtinguts del seu posttractament, l'assecatge tèrmic i el compostatge. Pel que fa als paràmetres de qualitat bioquímica ens centrem en el cicle del carboni, a través del contingut en carbohidrats totals i extractables del sòl i de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa i fem servir com a paràmetres auxiliars el contingut en Carboni orgànic i Nitrogen aminoacídic. Relacionem també els resultats amb dues activitats enzimàtiques del cicle del nitrogen, la proteolítica de BAA i la ureàsica.

Aquest objectiu central es desdobla en dues experiències, una prèvia en lisímetres i una posterior en parcel·les i es complementa amb altres dos estudis:

- ✓ Un estudi sobre l'estàndard de qualitat que representen els sòls naturals per tal d'interpretar millor els paràmetres utilitzats.
- ✓ Un estudi sobre la metodologia analítica per a la determinació de dos dels paràmetres estudiats (carboni orgànic i activitat enzimàtica β -glucosidasa) en el cas de mostres de sòl-fang.

Tenint en compte aquestes consideracions podem definir com a **objectius generals** de la tesi:

- A. Realitzar un estudi de caracterització bioquímica de sòls naturals de Catalunya.
- B. Descriure els efectes de l'aplicació d'un fang deshidratat i d'aquest mateix fang posttractat amb assecatge tèrmic i posttractat amb compostatge, en dos sòls degradats sobre els paràmetres bioquímics seleccionats a través d'una primera experiència en lisímetres en condicions controlades.
- C. Descriure els efectes de l'aplicació dels mateixos fangs anteriors en dos sòls degradats sobre els paràmetres bioquímics seleccionats a través d'una segona experiència en parcel·les.
- D. Establir un protocol per a la metodologia analítica de la determinació del contingut en carboni orgànic per combustió i de l'activitat enzimàtica β -glucosidasa en les mostres de sòl-fang.

El document que es presenta s'ha organitzat per capítols atenent als objectius generals descrits i en cadascun d'ells detallem els corresponents **objectius específics**.

L'estructuració del document segueix l'ordre següent:

- Centrem la introducció general (capítol 2) entorn al concepte de qualitat del sòl donat que és la perspectiva d'estudi adoptada en el treball.
- Dediquem el capítol 3 a l'estudi dels sòls naturals d'acord a l'objectiu general A.
- Dediquem el capítol 4 als objectius generals B i C descrivint les dues experiències sobre l'aplicació de fangs, la primera en lisímetres i la segona en parcel·les.
- Agrupem les aportacions metodològiques relacionades amb l'objectiu D en el capítol 5 i adjuntem com annex el detall de les tècniques analítiques.
- Finalment en el capítol 6 fem una síntesi del treball i dels resultats més rellevants.

2 INTRODUCCIÓ GENERAL

2.1 LA PERSPECTIVA: LA QUALITAT DEL SÒL

2.1.1 L'estudi de la qualitat del sòl

Actualment una de les definicions més esteses del terme *qualitat del sòl* és la que varen proposar Doran i Parkin (1994). D'acord amb aquests autors s'entén per qualitat del sòl *la capacitat del sòl per funcionar dins els límits de l'ecosistema, sostenir la productivitat, mantenir o augmentar la qualitat ambiental (aire, aigua) i promoure la salut (vegetals, animals i humans)*. Més enllà de l'anàlisi d'aquesta o d'altres definicions que ha rebut aquest concepte, des que va sorgir a finals dels anys 80, cal destacar que el terme *qualitat del sòl* va néixer de la conscienciació del valor del sòl i de la seva salut (Elliot et al., 1996; Carter et al., 1997; Karlen et al., 2003) i que totes tenen en comú la idea de relacionar qualitat amb capacitat del sòl per funcionar en el present i també en el futur (Doran i Parkin, 1994). El concepte va néixer als EEUU de l'anàlisi dels efectes ambientals de l'explotació agrícola, però està reconeguda la necessitat de la seva aplicació per altres usos no agrícoles del sòl com la gestió forestal, mineria, activitats industrials, compactació en zones urbanes, espais recreatius o abocadors entre d'altres (Karlen et al., 2003). Si pensem en les activitats extractives com a una activitat humana que comporta l'aparició de sòls degradats, podem veure que l'estudi de la seva restauració encaixa sota la perspectiva de qualitat del sòl. Així sota aquesta perspectiva i a grans trets, hem de considerar que les activitats extractives disminueixen la capacitat del sòl resultant per l'acollida d'una determinada funció, en aquest cas les encomanades com a ecosistema natural, i per tant, la qualitat.

Hem d'assenyalar que l'estudi dels sòls sota la perspectiva de qualitat no és un terme universalment acceptat, que representa una proposa extremadament ambiciosa i que cal ser conscients de les seves limitacions. Podem observar, però, que aquestes limitacions formen part de la pròpia formulació del concepte; així Karlen et al. (1997) sostenen que tot i que la qualitat del sòl no es pot mesurar directament, és un terme que serveix *de paraigües* (en el sentit de cobrir i aglutinar) per examinar i integrar les relacions i les funcions entre els diversos paràmetres físics, químics i biològics dels sòls que són importants per conèixer els sistemes naturals i per obtenir sistemes agraris sostenibles. La visió crítica i les reserves de l'acceptació de l'estudi de la qualitat del sòl es basa en la consideració com a terme ambigu, poc científic i utilitarista, en la confusió entre propietat i funció del sòl i en la dificultat de la interpretació que inclou criteris subjectius o restringits a un tipus sòl o de regió (Sojka i Upchurch, 1999; García-Alvarez et al., 2003; Karlen et al., 2003).

Nosaltres considerem que la introducció del terme qualitat dels sòls implica una perspectiva d'estudi que aporta com a principals contribucions, per una banda la unificació sota un mateix concepte d'un ampli ventall de contextos amb diversitat de problemàtiques (impactes naturals o d'acció de l'home) i per una altra banda la sistematització metodològica del seu estudi.

La primera de les aportacions que podríem anomenar com a aglutinadora, deriva d'enfocar l'estudi a partir del terme *funció del sòl* i associar qualitat a aptitud per a desenvolupar una determinada funció. Les funcions del sòl es defineixen com a resultat de la conscienciació que els sòls són un component clau en la biosfera terrestre i contrasten amb la visió restringida de la clàssica productivitat de sistemes

agrícoles. Així per exemple, el 1995 la Soil Science Society of America (Carter et al., 1997) va descriure com a funcions bàsiques del sòl:

- Sostenir l'activitat biològica, la diversitat i la productivitat
- Regular i repartir el flux d'aigua i soluts
- Filtrar, amortir, degradar, immobilitzar i desintoxicar substàncies orgàniques i inorgàniques
- Emmagatzemar i reciclar nutrients i altres elements de la biosfera terrestre

La concepció de funció del sòl té com a premissa important que hi ha propietats del sòl directament relacionades amb el desenvolupament d'aquestes funcions. Per tant no hem de perdre de vista que estudiar qualitat és estudiar (*de fet, seguir estudiant*) les propietats dels sòls. En aquest sentit però, cal tenir en compte que el concepte qualitat del sòl diferencia dues parts: la part de capacitat pròpia (la que és inherent al propi sòl i als factors de clima i relleu) i la part de capacitat dinàmica. Si bé la primera part estaria relacionada amb les propietats que es consideren que varien poc amb el temps i que més tradicionalment han estat estudiades, la segona part és un component més innovador ja que considera que hi ha propietats del sòl que poden canviar a curt termini en resposta al seu ús o gestió. Una gestió sostenible és aquella que manté o incrementa la qualitat del sòl.

La segona de les aportacions és extremadament útil ja que proporciona eines que han de facilitar el diagnòstic i mesura de la qualitat. En aquest sentit s'estableix una sistemàtica per a l'avaluació de la qualitat del sòl basada en la següent seqüència (Carter et al., 1997):

- Definir la funció que ha de complir el sòl
- Detectar els processos del sòl que s'encarreguen de la funció
- Conèixer i identificar les propietats del sòl que tenen influència en aquest procés
- Establir els indicadors que mesuren aquestes propietats
- I finalment, establir la metodologia de mesura d'aquests indicadors

Definir la funció vol dir saber què fa el sòl o que s'espera que faci. A grans trets podem considerar les funcions ecològiques del sòl (el sòl com a reactor, com a hàbitat i com a reserva genètica) i les funcions relacionades amb les activitats humanes (suport de construccions, extracció d'aigües subterrànies, provisió de materials, producció de collites, espais recreatius...). Cal tenir present que sovint els sòls desenvolupen varies funcions simultàniament de forma no independent i que per tant l'avaluació de la qualitat del sòl esdevé complexa des del moment en què hem de considerar el seu caràcter multifuncional (Nortcliff, 1997; Nortcliff, 2002). Definir la funció del sòl vol dir també definir els diferents components que la caracteritzen. Així, per exemple, des del punt de vista agronòmic la funció específica del sòl seria la promoció del creixement vegetal i aquesta funció principal es pot descompondre en les cinc següents: medi pel creixement de les plantes, regulador de l'aigua, regulador dels gasos, regulador de l'energia i amortidor o filtre. Per estudiar cadascuna dels components es concreten els processos que tenen lloc en el sòl i que la fan possible (així tindríem per exemple emmagatzematge d'aigua, infiltració d'aigua, disponibilitat d'aigua.....). Aquests processos són coneguts i se sap que depenen d'un conjunt de propietats físiques, químiques i biològiques del sòl però l'estudi de la qualitat implica identificar quines són les propietats clau del procés, les que intervenen d'una forma

crítica en la capacitat del sòl per a desenvolupar la funció que hem definit. A més a més, aquestes propietats han de ser mesurables i per tant s'han d'establir els indicadors adients. És en aquest sentit que Karlen et al. (1997) assenyalen, en l'escala de l'avaluació de la qualitat del sòl, la necessitat d'un nivell zero de recerca bàsica sobre les propietats i els seus indicadors. Els indicadors que són especialment valuosos en l'estudi de la qualitat són aquells que reflecteixen o mesuren canvis del procés lligat a la funció i que d'aquesta forma poden detectar la pèrdua o l'increment de qualitat (Carter et al., 1997; Knoepp et al., 2000; Karlen et al., 2003). Un dels reptes importants del concepte de qualitat del sòl és precisament identificar aquestes propietats clau i confeccionar l'anomenada *mínimum data set* (MDS) que equival al nombre mínim de propietats del sòl responsables d'informar de forma directa del procés que sustenta una funció específica.

Els indicadors poden ser una mesura directa o bé indirecta de la propietat, poden ser simples o bé incloure un conjunt d'atributs del sòl, però han de ser fàcilment mesurables i validables. Diversos autors assenyalen la importància d'establir metodologies estandarditzades tant de camp com de laboratori per a l'obtenció dels indicadors (Doran i Parkin, 1994; Nortcliff, 1997; Arshad i Martin, 2002; Filip, 2002). De la mateixa manera aquests autors també adverteixen de la necessitat de la confecció de bases de dades dels indicadors (rangs, valors de referència, valors crítics..) per diferents sòls i climes que facilitin la seva interpretació.

La sistemàtica d'estudi de la qualitat del sòl es pot complementar amb mètodes matemàtics i estadístics que desemboquin en l'elaboració dels anomenats índex de qualitat on els indicadors queden integrats en una expressió algebraica. En aquests casos, l'estudi de qualitat aconsegueix com a objectiu final d'esdevenir una eina de monitorització de l'estat del sòl (Doran i Parkin, 1994; Carter et al., 1997). Revisions bibliogràfiques recents sobre els treballs publicats en els darrers 10 anys sobre qualitat del sòl assenyalen, però, que una proporció molt petita dels estudis sobre qualitat acaben proposant una mesura objectiva per a la seva quantificació d'acord amb un índex (Gil-Sotres et al., 2005; Bastida et al., 2008c).

Una altra de les necessitats derivades de l'estudi dels sòls sota la disciplina de la qualitat és l'establiment dels **estàndards de qualitat**. D'acord amb Doran i Parkin (1994) s'han establert dos criteris com a estàndards de qualitat del sòl: el que correspon a un òptim de productivitat amb un mínim d'impacte ambiental i el que correspon a les condicions del sòl natural. El primer és el que els mateixos autors van proposar per avaluar sistemes agrícoles. En aquest criteri es té en compte que la funció principal del sòl és la de producció vegetal però s'estudia des de la perspectiva de la sostenibilitat que comporta també preservar la qualitat ambiental (en termes d'aigua i aire) i contribuir a la salut humana i animal (seguretat i qualitat dels aliments). L'opció d'utilitzar els **sòls naturals** com a referència permet una visió més àmplia de la qualitat del sòl des del punt de vista de sostenibilitat. Es basa en l'associació de màxim de la qualitat amb la viabilitat per a l'ecosistema i a llarg termini de l'equilibri que assoleixen (lliurement quan no tenen intervenció antròpica o aquesta és mínima) els components del sòl amb les seves condicions pròpies de clima i vegetació (Dick, 1994; Trasar-Cepeda et al., 1998; Gil-Sotres et al., 2005). Així, trobem en la bibliografia el terme sòl natural com a sòl clímax per exportació del concepte de vegetació clímax. D'acord a Ellert et al. (1997) el punt de referència més àmpliament utilitzat per estudiar les incidències de les pràctiques agrícoles sobre la qualitat del sòl és la relativa a sòl natural (ecosistema sense cultivar) de la mateixa

localitat amb una roca mare, relleu i clima similars a pesar de tenir en compte les diferents característiques entre un ecosistema agrícola i un de natural. Aquesta opció té l'avantatge de ser una referència per a cada àrea geogràfica però presenta com a dificultat la manca de sòls naturals de referència si tenim en compte l'acusada acció antròpica en temps i espai.

2.1.2 El component biològic de la qualitat del sòl

Quan l'erosió no és superior a la velocitat de formació del sòl, el factor més important que regula la qualitat del sòl són les propietats biològiques (Elliot et al., 1996). S'entén per component biològic de la qualitat del sòl els organismes vius del sòl (plantes, animals i microorganismes) i els processos i materials derivats dels organismes vius. En termes generals es parla de components biòtics del sòl i s'estudien també en relació estreta amb la resta de components (abiòtics) (Gregorich et al., 1997).

En les primeres propostes d'avaluació de la qualitat dels sòls a través d'indicadors bàsics ja apareixien característiques biològiques del sòl. Cal recordar que aquests estudis es varen fer amb l'objectiu de valorar l'impacte dels sistemes agraris sobre el medi i derivaven del reconeixement del paper clau de la matèria orgànica (MO) i la seva pèrdua amb els cultius i de la consciència de la importància de la interrelació entre les propietats físiques, químiques i biològiques. Així tenim que Doran i Parking (1994) proposaren com a *mínimum data set* (MDS) una selecció d'indicadors físics (textura, espessor i profunditat d'arrelament, densitat aparent, taxa d'infiltració, contingut i capacitat de retenció i d'emmagatzematge d'aigua i temperatura) i químics (pH, conductivitat elèctrica, carboni (C) i nitrogen (N) totals i continguts en N mineral, fòsfor i potassi extractables) juntament amb indicadors biològics com el carboni de la biomassa microbiana (BMC), el N de biomassa microbiana, la respiració, el N mineralitzable i les relacions entre elles. Simultàniament, Karlen i Scott (1994) per la seva banda fan una proposta d'índex de qualitat per avaluar l'efecte de la incorporació de les restes de collita; fan una aposta similar utilitzant junt amb altres 8 paràmetres generals, també com a indicadors, la biomassa microbiana i la respiració, la població de cucs de terra i el contingut en ergosterol (mesura de fongs). Aquest mateix autor, però, afirma que tot i el potencial que representaven els indicadors biològics que es començaven a utilitzar llavors no es recomanava la seva inclusió com a control de rutina de la qualitat dels sòls agrícoles.

En contrast amb aquestes primeres consideracions, aquest tipus de paràmetres van ser progressivament incorporats. Així tenim que d'acord a la revisió de 52 programes de monitorització de qualitat ambiental/sòl a nivell mundial disponibles fins el 2003, el 29 % dels programes feien servir indicadors que tenen caràcter biològic (Melé i Crowley, 2008). Els mateixos autors detallen, però, també que la major part (87%) seguien fent servir indicadors químics (pH, fraccions de C, salinitat, capacitat de bescanvi, nutrients N, P i K disponibles) i el 56% de tipus físic (humitat, grandària de partícula i resistència a la penetració).

Les propietats biològiques del sòl són particularment adequades com a indicador de la qualitat del sòl, perquè responen als canvis tant naturals com induïts per l'home (Turco et al., 1994; Elliot et al., 1996; Gregorich et al., 1997; García et al., 2000; Nortcliff, 2002; Gil-Sotres et al., 2005; Bastida et al., 2008c). Hi ha consens, doncs, en valorar especialment la sensibilitat d'aquests paràmetres en contrast amb els físics i químics que només varien si ha una gran pertorbació del sòl a llarg termini (Filip,

2002). Paral·lelament però, també existeix consens respecte de les mancances que presenten aquest tipus de propietats per a complir els requisits d'indicador de qualitat. Aquestes mancances es poden agrupar en dificultats metodològiques i d'interpretació. Les metodologies de determinació dels paràmetres biològics estan especialment mancades de protocols d'estandardització i a més els resultats són molt dependents dels pretractaments de la mostra i de les condicions de conservació; a més presenten gran variabilitat respecte de factors com la història del sòl, la variabilitat estacional i el sistema de mostreig (Gregorich et al., 1997; Nortcliff, 2002; Schloter et al., 2003; Gil-Sotres et al., 2005). La principal dificultat a l'hora d'interpretar aquests paràmetres és que generalment no es coneixen els valors de referència dels nivells òptims (Dalal, 1998). Generalment s'assumeix que valors alts d'aquest tipus d'indicadors de la qualitat biològica van associats a nivells alts de qualitat del sòl, però s'ha de tenir precaució a l'hora de fer aquesta interpretació. A més a més poques vegades el valor absolut és de prou utilitat i l'evolució o els valors relatius són més adequats. Aquestes mancances provoquen que diferents autors arribin a conclusions contradictòries sobre com una determinada pertorbació afecta la qualitat del sòl (Gil-Sotres et al., 2005).

Per tenir una visió general de quins són o poden ser els paràmetres a incloure en aquest component de la qualitat esmentarem, com a punt de partida, un dels primers estudis sistemàtics sobre el component biològic de la qualitat del sòl realitzat per Gregorich et al. (1994 i 1997). Aquests autors, des d'un punt de vista agrícola i considerant la MO una propietat clau per a l'estudi de la qualitat del sòl, fan una proposta de MDS per a l'estimació de la qualitat de la MO d'acord amb els tres processos en la que està implicada: l'activitat biològica, la reserva de nutrients i l'estabilitat estructural del sòl (Gregorich et al., 1994). Aquesta MDS representa una proposta de sis indicadors que posteriorment amb una visió més amplia passen a ser deu i apareixen classificats en quatre grans grups: els atributs directament relacionats amb els cicles de la matèria orgànica, els relacionats amb els organismes vius, els que tenen a veure amb el procés microbiològic i els relacionats amb les plantes. (Gregorich et al., 1997). La proposta d'indicadors, per als tres primers d'aquest grup, s'especifiquen a la Taula 2.1; podem veure que dos dels indicadors proposats per aquests autors (carbohidrats i enzims) són els que nosaltres hem triat en el present estudi i que descrivim amb detall en l'apartat 2.2 com a *Els nostres paràmetres*.

Taula 2.1. Propietats de qualitat biològica del sòl i els seus indicadors (Gregorich et al., 1997).

Matèria Orgànica del sòl	1. Continguts totals de Carboni i de Nitrogen 2. Fracció lleugera 3. Contingut en matèria macro orgànica
Organismes del sòl	4. Biomassa microbiana 5. Micorrizes 6. Fauna
Processos microbians	7. Mineralització del Carboni i Nitrogen 8. Carbohidrats 9. Enzims 10. Activitat microbiana

Si contrastem la visió de partida amb d'altres treballs genèrics sobre el component biològic de la qualitat dels sòls, constatem que no s'inclouen la totalitat dels proposats per Gregorich (1997) ni donen la mateixa importància als diferents grups. En termes generals els indicadors més utilitzats són la biomassa microbiana, la respiració i els enzims junt amb la mineralització del N, diversitat microbiana i grups funcionals de la fauna (Scholer et al., 2003; Melé i Crowley, 2008). Si ho analitzem amb més detall podem dir que:

- a. És poc freqüent incloure l'estudi de les característiques de la MO ja que es considera que forma part de característiques de tipus químic, tot i que alguns autors (Knoepp et al., 2000) mantenen el seu estudi (en detriment dels processos enzimàtics). De la mateixa forma és poc freqüent incloure la determinació dels carbohidrats encara que sí que trobem habitualment les determinacions de carboni i/o de carbohidrats solubles en aigua i/o sulfat potàssic.
- b. Alguns autors posen especial èmfasi en el paper dels microorganismes i per tant proposen no només paràmetres microbiològics de quantificació i activitat generals sinó també de composició i diversitat de la microflora (Filip, 2002; Hofman et al., 2003; Schloter et al., 2003; Melé et al., 2008). En aquest aspecte cal remarcar que des dels inicis es va reconèixer el paper destacat dels microorganismes en la qualitat del sòl no només en la fertilitat agrícola, sinó també en estudis de restauració i contaminació de sòls. En aquests estudis es va adoptar com a millor perspectiva per a un ràpid reconeixement dels canvis en la qualitat el nivell anomenat d'ecosistema (cicles del bioelements i transformació de la MO) davant d'altres nivells com estudi de poblacions o de comunitats (Visser i Parkinson, 1992). Actualment, però, és en aquests altres nivells on poden tenir un paper més rellevant les noves tècniques moleculars de diagnosi per a l'estudi de la qualitat del sòl (Bastida et al., 2008c; Melé et al., 2008).
- c. D'altres autors es centren en els paràmetres lligats als processos, o sigui que posen l'accent en una perspectiva més bioquímica. Des d'aquest punt de vista el conjunt de propietats del sòl que poden formar part d'un component biològic del sòl, queden agrupats en els paràmetres bioquímics generals que reflecteixen l'activitat dels processos microbians i en els paràmetres bioquímics específics, que inclouen els enzims hidrolítics.

En base a aquesta darrera **perspectiva bioquímica**, Gil-Sotres et al. (2005) fan un important treball de revisió bibliogràfica abastant els estudis de la qualitat del sòl publicats entre 1990 i 2003. A partir de les dades recollides detallen quins són els paràmetres que s'han utilitzat i quines són les diferents perspectives d'utilització. D'acord amb l'anàlisi d'aquestes dades, si només tenim en compte la utilització dels paràmetres de forma individual, el 40 % de les publicacions fan servir paràmetres generals (biomassa microbiana, respiració, activitat deshidrogenasa, N mineralitzable, ATP i la capacitat hidrolítica-FDA) i un 60 % fan servir paràmetres específics (activitats enzimàtiques). Més detalladament indiquen que la biomassa microbiana és el paràmetre que presenta un percentatge més alt d'utilització (41 % dels autors) seguida per les activitats enzimàtiques fosfatàsica i deshidrogenasa (ambdues 28%) i el N mineralitzable i l'activitat β -glucosidasa (ambdues 16 %) i finalment l'activitat ureàsica (11 %).

Si contrastem aquest estudi amb la primera proposta de Gregorich (1997) des d'una perspectiva agrícola, veiem que quedarien exclosos els indicadors de caracterització de la MO (continguts totals, fraccions i carbohidrats) i els més pròpiament biològics (fauna i micorrizes). Val a dir també que apareixen com a nous paràmetres la concentració de ATP en el sòl, que és una estimació de la presència de

microorganismes vius, i la capacitat hidrolítica-FDA. L'anomenat FDA determina la hidròlisi de la fluoresceïna diacetat (3',6'-diacetilfluoresceïna) quantificant el producte de la reacció (fluoresceïna) per espectrofotometria. Es pot considerar una mesura ràpida de l'activitat microbiana ja que el substrat pot ser hidrolitzat per diferents enzims (proteases, lipases i esterases) de bacteries i fongs (Schnürer i Rosswall, 1982). En termes de qualitat Dick (1994) considera valuós aquest paràmetre pel fet de no ser un assaig tan específic com la mesura d'una activitat enzimàtica.

Els autors Gil-Sotres et al. (2005) però, coincideixen a grans trets amb les consideracions apuntades inicialment per Gregorich et al. (1997), respecte de la idoneïtat de cadascun d'aquests paràmetres com a indicadors de qualitat. Així destaquen que la biomassa presenta resultats contradictoris ja que si bé s'incrementa per certes pràctiques agrícoles (com la fertilització orgànica i la rotació de cultius) no té resposta clara al inputs de N mineral, utilització d'herbicides o bé contaminació per metalls pesants. El mateix tipus de comportament presenta l'activitat deshidrogenasa, indicador d'activitat microbiana oxidativa, tot i que resulta ser un bon indicador de recuperació de sòls contaminats per abocaments de petroli. Respecte de la capacitat de mineralització del N assenyalen també que presenta com a limitació l'alta variabilitat estacional i el baix grau d'afectació per diferents pràctiques agrícoles. També corroboren la importància de la resposta dels enzims davant múltiples afectacions i destaquen especialment la vàlua i fiabilitat de la fosfatasa com a indicador.

Cal considerar a més a més, que Gil-Sotres et al. (2005) fan una anàlisi crítica de les capacitats i mancances d'aquests **paràmetres individuals com a indicadors de qualitat** tenint en compte els requisits necessaris per a què una propietat del sòl pugui ser un bon indicador d'acord a Elliot et al. (1996) i a Dalal (1998). En aquest sentit aquests autors destaquen que, entre d'altres requisits, un indicador ha de ser sensible al màxim nombre possible d'agents causants de pertorbació (maneig agrícola, contaminació, restauració..) i han d'existir valors de referència que facilitin la seva interpretació. Gil-Sotres et al. (2005) posen de manifest, aportant resultats dels seus propis treballs, que tant les activitats enzimàtiques com la resta de paràmetres bioquímics generals incompleixen, hores d'ara, aquests requeriments i apunten com a principals problemes:

- ✓ Gran variabilitat: climàtica, geogràfica, estacional i pedogenètica (inclús dels sòls límix d'acord a Trasar-Cepeda et al. (1998)
- ✓ Diversitat de protocols experimentals
- ✓ Manca de valors de referència
- ✓ Incapacitat per discriminar diferents nivells de degradació

En el treball més recent de Bastida et al. (2008c) sobre una revisió bibliogràfica més focalitzada en la utilització d'índex de qualitat arreu del món trobem coincidències amb el que hem descrit fins ara sobre quins són els paràmetres de qualitat biològica més utilitzats i les seves mancances com a indicadors.

En els treballs de qualitat del sòl, els paràmetres bioquímics a més d'utilitzar-se individualment també apareixen com índexs simples i multi paramètrics segons siguin relacions simples entre dos paràmetres o bé expressions més complexes.

Els índexs simples van ser proposats per a facilitar la tasca d'interpretació dels paràmetres individuals (Dalal, 1998) però es considera que tenen les mateixes limitacions (Gil-Sotres et al., 2005; Bastida et al., 2008c). El coeficient metabòlic (qCO_2) és el més àmpliament utilitzat junt amb les relacions de les propietats bioquímiques amb el contingut en carboni (en el cas d'activitats enzimàtiques reben el nom d'activitats específiques) o el nitrogen total del sòl o amb el contingut en biomassa.

El coeficient metabòlic (o respiratori) qCO_2 va ser proposat per Anderson el 1985 i correspon a la quantitat de substrat que es mineralitza per unitat de carboni de biomassa microbiana. Aquest índex fisiològic s'interpreta com a una mesura de la maduresa d'un ecosistema; així s'entén que un ecosistema estable respon a una pertorbació, en general, amb un increment del coeficient (Dalal, 1998). Ha resultat ser un bon indicador de diferents tipus d'alteració (com la presència de metalls pesants) però alhora és insensible a algunes pertorbacions; a més el seu significat pot ser poc clar degut a què es pot modificar per altres causes i es pot confondre amb estrès microbià (Gil-Sotres et al., 2005; Bastida et al., 2008c). Gil-Sotres et al. (2005) destaquen l'ampli marge de valors d'aquest índex qCO_2 per un sistema estable com sòls naturals amb vegetació clímax.

Els índex com les activitats enzimàtiques específiques o els que resulten de dividir el carboni de la biomassa o la respiració pel carboni orgànic (quocient microbià i respiració específica, respectivament) són útils per comparar valors en sòls amb diferent nivell de MO. La proporció de BMC respecte del C s'ha proposat com a índex basant-se en la major sensibilitat d'aquesta fracció als canvis que no pas el global de la MO; així els efectes de degradació es poden detectar abans amb una disminució d'aquesta proporció.

Una tercera perspectiva d'utilització dels paràmetres bioquímics en l'estudi de la qualitat del sòl és l'elaboració dels anomenats **índex multi paramètrics** o expressions complexes d'un conjunt d'indicadors. En aquest tema és d'especial interès la revisió realitzada per Bastida et al. (2008c) sobre els índexs de qualitat des d'una perspectiva de component biològic de qualitat i a nivell mundial. Aquests autors detallen els resultats obtinguts pels més de 25 grups de treball sobre la construcció i la utilització d'índex de qualitat diferenciant els sòls agrícoles i no agrícoles (sòls naturals). Pel que fa a utilització d'índex de caràcter multi paramètric en sòls agrícoles destaquem com a principals les següents tres aportacions:

- a. El referent en l'estudi del desenvolupament d'índex de qualitat en sòls agrícoles són els treballs de Karlen i Scott (1994). Aquests autors varen ser dels primers en establir una metodologia en la construcció i l'aplicació d'índex de qualitat del sòl de tipus multi paramètric. Tot i que la metodologia establerta per aquests autors ha estat una referència important en treballs posteriors, presenta com a principal mancança el suport matemàtic que permet establir els coeficients corresponents al pes de cadascuna de les funcions en l'expressió de l'índex de qualitat que proposen. Posteriorment, altres autors aportaren la base matemàtica i estadística necessària per a la tria del número mínim d'indicadors (per components principals) i per l'expressió de l'índex (per l'anàlisi multivariant).

- b. La metodologia proposada ha estat aplicada per molts autors en múltiples experiències de llarga durada (més de deu anys) amb objectius diversos i en la majoria dels casos els índexs de qualitat permeten diferenciar la incidència de diferents tipus de pràctiques agrícoles sobre la qualitat del sòl. En molts casos els nivells més alts de qualitat s'assoleixen amb les pràctiques de fertilització orgànica (rotació de cultius, incorporació de restes de cultiu, producció integrada).
- c. Els indicadors utilitzats (habitualment entre cinc i deu) són bàsicament de tipus físic (estabilitat dels agregats, densitat real, conductivitat hidràulica), químic o fisicoquímic (pH, conductivitat elèctrica, MO, N o P disponibles) i l' indicador biològic més àmpliament utilitzat, sense considerar els que utilitzen les activitats enzimàtiques, és la biomassa microbiana.

Pel que fa a utilització d'índex de caràcter multi paramètric en sòls no agrícoles i naturals destaquem com a principals les següents tres aportacions:

- d. Existeixen menys grups de treball (cinc dels nou grups són espanyols) respecte dels que estudien el sòls agrícoles, els treballs són més recents i la contribució del component biològic és més important que la física i química.
- e. Els indicadors més utilitzats són les activitats enzimàtiques juntament amb els bioquímics generals com la biomassa, la respiració i la mineralització del N. També apareixen els continguts en carboni i carbohidrats solubles en aigua.
- f. Els treballs arriben a proposar dos tipus d'expressions multiparamètriques: les que es formulen com a índex auto interpretables i les que es basen en la predicció d'una de les variables a partir d'una relació algebraica de la resta de les variables. En tots dos casos les propostes s'acompanyen d'estudis de validació i d'aplicació de la seva utilitat per posar de manifest perturbacions del sòl.

Dins de la categoria d'índex de qualitat per a sòls no agrícoles Bastida et al. (2008c) també consideren els estudis sobre explotació sostenible de boscos i pel que fa a sòls contaminats també recullen l'existència d'índex de qualitat multi paramètrics a base de paràmetres biològics i bioquímics que obtenen bons resultats per diferenciar nivells de contaminació (hidrocarburs, herbicides i metalls pesants). La visió més detallada dels índexs de qualitat que utilitzen bàsicament activitats enzimàtiques la desenvolupem en l'apartat següent 2.1.3.

La utilització d'índex multi paramètrics per a l'estudi de qualitat supleix les mancances d'interpretació que tenen els paràmetres utilitzats individualment i representa l'encert d'afrontar des d'una vessant més completa el repte que suposa l'estudi de la complexitat del funcionament del sòl i de la seva qualitat. Com a principal limitació hem d'assenyalar, però, el seu ús restringit a un determinat tipus de sòl, és a dir, al que s'ha fet servir per a la seva generació/deducció. L'extrapolació de la seva aplicació i) requereix dels processos previs de validació de l'índex de qualitat en d'altres condicions (Gil-Sotres et al., 2005; Bastida et al., 2008c), i ii) no tenen caràcter universal quan en general es necessita que el tingui si es vol legislar en política de protecció del sòl a nivell de diferents països (Gil-Sotres et al., 2005).

Finalment sobre quin són els **futurs indicadors de qualitat**, Bastida et al. (2008c) destaquen el potencial de l'espectroscòpia NIR (Near Infrared Spectroscopy) i les aportacions de les tècniques derivades de la biologia molecular. L'espectroscòpia NIR és una tècnica ràpida, econòmica i no destructiva que proporciona espectres d'absorció que bàsicament contenen informació de la composició orgànica de la mostra de sòl (enllaços C-H, N-H, S-H, C=O i O-H). A partir d'aquests espectres i amb un procés previ de calibració extern adequat es pot treure informació de les propietats del sòl. Diferents estudis han trobat bons resultats en la predicció de propietats físiques, químiques i també biològiques. Així, Zornoza et al. (2008b) amb una col·lecció de més de 300 sòls de la província d'Alacant amb diferents característiques d'ús, de vegetació i de condicions climàtiques, troben molt bona predicció per molts paràmetres fisicoquímics, químics i bioquímics com la biomassa microbiana, la respiració, les activitats enzimàtiques fosfatàsica i β -glucosidasa, i biològics com la diversitat microbiana. La biologia molecular aporta noves metodologies netes i ràpides d'extracció de proteïnes i àcids nucleics que poden tenir un gran paper en el desenvolupament de nous indicadors de qualitat. La diversitat microbiana tradicionalment s'ha estudiat a través del perfil d'àcids grassos anomenat Índex de diversitat microbiana o PLFAs (Phospholipid Fatty Àcids). La metagenòmica (transcriptòmica) implica extracció, clonació, anàlisi de tota la informació genètica d'un habitat, en aquest cas d'un sòl, i per tant pot ser extraordinàriament valuosa en l'estudi de l'ecologia microbiana. Malgrat que aquesta informació pot significar l'aparició d'indicadors de qualitat sensibles, aquests indicadors no poden proporcionar informació sobre la funció d'una determinada espècie microbiana en el sòl. La manca del nexa entre l'expressió genètica i una determinada activitat microbiana o funció relacionada amb la qualitat del sòl es pot suplir a través de la tècnica SIP (Stable Isotope Probing) que incorpora ^{13}C o ^{15}N en la biomassa amb DNA o RNA marcat isotòpicament. Aquesta tècnica ha obtingut bons resultats en identificar els tipus de microorganismes actius en la degradació de certs contaminants. Així mateix, la metaproteòmica i a pesar de problemes metodològics, també ha obtingut bons resultats en detectar els enzims responsables de la degradació de la matèria orgànica i biodegradació de contaminants.

2.1.3 Els enzims com a indicadors de qualitat del sòl: potencialitat i mancances

La fauna del sòl, les plantes i els microorganismes representen les fonts d'enzims del sòl i encara que és difícil discriminar entre aquests tres orígens es creu que la font dels enzims del sòl és bàsicament de tipus microbià (Dick, 1994). D'acord als diferents estadis en la vida d'un enzim Burns (1982) va aportar una exhaustiva diferenciació d'on es poden localitzar i actuar els enzims al sòl atenent al seu microambient. L'estat, la localització i la persistència dels enzims en el sòl és un tema complex que ha donat lloc a diferents classificacions (Taula 2.2). Podem considerar que els anomenats **enzims extracel·lulars** estan constituïts, fonamentalment, per aquells que, un cop segregats a la solució aquosa del sòl, no són degradats ràpidament per les proteases sinó que, per diferents mecanismes, queden estabilitzats en el complex argilo-húmic i immobilitzats en una xarxa macromolecular tridimensional (Àlef i Nannipieri, 1995). Actualment i d'acord amb resultats experimentals, està molt acceptat que els enzims del sòl estan immobilitzats en una xarxa de complexos organo-minerals. Aquesta característica d'interacció amb el component abiòtic és la que dona als enzims la seva importància com a indicadors de qualitat (Tate III, 2002). L'existència dels enzims extracel·lulars permet veure el sòl com un teixit viu, com una entitat biològica on es

donen reaccions químiques complexes tal com ho va concebre Quastel ja l'any 1946 (Dick, 1994). Aquest fet comporta que tant la fase orgànica com la mineral d'un sòl, junt amb la rizosfera, tinguin una influència especial en la seva activitat enzimàtica (Tabatabai i Dick, 2002).

Taula 2.2. Criteris de classificació dels enzims en funció de la seva localització al sòl.

Localitzacions dels enzims en el sòl d'acord amb Burns (1982)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Intracel·lulars <i>estRICTES</i> (actuen dins la cèl·lula, en el citoplasma de microorganismes, plantes o animals) 2. Periplasmàtiques (actuen en l'espai periplasmàtic) 3. Enganxats a la paret cel·lular de cèl·lules vives (ectoenzims) 4. Extracel·lulars <i>estRICTES</i> (secretats per les cèl·lules vives per a la seva activitat normal i que es troben en la solució aquosa del sòl) 5. En cèl·lules vives però no proliferatives (espores microbianes, arrels, llavors ...) 6. En cèl·lules mortes o residus cel·lulars 7. Lliures (es troben en la solució del sòl però provenen de cèl·lules existents o de lisi cel·lular) 8. Associats temporalment a complexos Enzim-Substrat (solubles o insolubles) 9. Adsorbits al silicats 10. Associats a col·loides húmics
Localitzacions dels enzims en el sòl d'acord amb Nannipieri et al. (2002 i 2006)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Enzims intracel·lulars Són principalment els associats a cèl·lules microbianes (fongs i bacteris) però també de les arrels i la fauna del sòl 2. Enzims extracel·lulars <ol style="list-style-type: none"> 2.1 Lliures 2.2 Complexats amb les argiles 2.3 Complexats amb l'humus
Localitzacions dels enzims en el sòl d'acord amb Bonmatí et al. (2003)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Enzims associats a la biomassa existent <ol style="list-style-type: none"> 1.1 Els <i>estRICTAMENT</i> intracel·lulars 1.2 Els enzims lliures, que anomenen <i>desprotegits</i> 2. Enzims associats a la matèria orgànica no humificada <ol style="list-style-type: none"> 2.1 Els de les cèl·lules no proliferatives o restes cel·lulars 2.2 Els associats a lipopolisacàrids (una part dels lliures poden quedar parcialment protegits quan s'uneixen a lipopolisacàrids parcialment hidrolitzats procedents de parets de bacteris i que posteriorment poden passar a formar part dels enzims immobilitzats amb la seva unió als col·loides húmics) 3. Enzims immobilitzats (terme que manté el sentit original i inclou aquells que no depenen de la biomassa ni de les seves oscil·lacions i tenen una vida mitjana llarga) <ol style="list-style-type: none"> 3.1 Enzims adsorbits a silicats 3.2 Enzims units als col·loides húmics 3.3 Enzims dels complexos argilo-húmics

Ladd (2003) assenyala la importància d'aquests enzims a partir dels valors quantitius de distribució de la proteïna en el sòl. Afirmar que tenint en compte que el 40 % del N total és N proteic i que el N de la biomassa (que representa només el 2 % del N total) és majoritàriament N d'aminoàcids (proporció del 75 %) el 90 % del N proteic és extracel·lular. Qualitativament, hem de tenir present que els enzims que no necessiten de cofactor i no són components d'una seqüència catabòlica o anabòlica poden tenir un component extracel·lular important, d'aquests els que més s'han estudiat són les hidrolases (Speir i Ross, 2002).

Hi ha dues vies d'estudi dels enzims extracel·lulars: la via de l'extracció i l'obtenció de complexos al laboratori. D'acord amb Nannipieri (2006) només s'han extret enzims lliures o bé complexos E-humus però no E-argila dels quals només es tenen evidències indirectes ja que no s'han detectat per microscòpia electrònica. A través d'aquests

estudis s'han proposat les teories sobre mecanismes de protecció de l'activitat dels enzims extracel·lulars en el sòl. Els principals mecanismes d'estabilització i immobilització van ser proposats per Weetall l'any 1975: microencapsulació, encadenament, copolimerització, adsorció, bescanvi iònic i unió covalent (Burns, 1978). Els complexos húmnic-enzimàtics es poden formar per adsorció, empresonament o copolimerització de l'enzim en el procés d'humificació o bé per unions covalents, ponts d'hidrogen o atraccions iòniques a través de cations metàl·lics a la superfície del nucli húmnic ja format (Bonmatí, 1988). Diferents estudis (especialment amb ureasa, fosfatasa i arilsulfatasa) han evidenciat experimentalment algunes d'aquestes formes d'unió amb els components minerals (adsorció) i amb la matèria orgànica encara que no sempre han estat completament entesos (Tabatabai i Dick, 2002). Els mecanismes d'estabilització dels enzims immobilitzats ha d'assegurar que es manté de forma catalíticament activa encara que poden quedar alterades les seves característiques cinètiques. Normalment aquests mecanismes de protecció provoquen la disminució de l'activitat, però els protegeixen de l'acció de les proteases o agents desnaturalitzants (Bonmatí, 1988; Sinsabaugh, 1994a; Morra, 2002; Ladd, 2003).

A el component extracel·lular de l'activitat enzimàtica se li dóna, en molts casos, una significació ecològica que la potencia com a indicador de qualitat del sòl. Així, Dick (1994) sota la visió del sòl com a ecosistema, afirma que un nivell òptim d'enzims extracel·lulars en el sòl pot significar un factor de qualitat ja que considera que aquest component enzimàtic és molt important pels organismes del sòl d'acord amb la hipòtesi formulada per Burns (1982). Aquest autor va postular que, els microorganismes no tenen accés directe a certs substrats grans o insolubles ni els poden detectar per induir la síntesi del sistema enzimàtic necessari per a la seva degradació. El complex humus-enzim, en canvi, si que permetria l'accés directe d'alguns substrats i mitjançant la catàlisi donaria lloc a productes que si poden ser assimilats pels microorganismes. Per a certes espècies aquest mecanisme podria significar una estratègia de supervivència en condicions ambientals hostils.

Quan es parla d'enzims extracel·lulars és important tenir present la problemàtica associada a la diferenciació dels diferents components enzimàtics a partir de l'assaig enzimàtic (que és una mesura indirecta de la concentració d'enzim) (Nannipieri et al., 2002; Tabatabai i Dick, 2002; Bonmatí et al., 2003). Per respondre a la pregunta *Quina és la contribució dels diferents components deguts a les diferents localitzacions d'un mateix enzim en la mesura d'activitat a partir d'un assaig enzimàtic* hem de tenir en compte:

- El tipus d'enzim, ja que no tots els enzims poden actuar fora de la cèl·lula; per exemple l'activitat deshidrogenasa que regula un procés intracel·lular, és inactiva en forma extracel·lular.
- Els enzims extracel·lulars lliures tenen un curt període de vida, per tant la component extracel·lular serà majoritàriament deguda als enzims immobilitzats que es caracteritzaran per tenir resistència a la degradació tèrmica i proteolítica.
- El temps d'incubació és una variable experimental important ja que afecta a les complicacions degudes al creixement microbià, a la catàlisi intracel·lular i a la nova síntesi d'enzim durant l'assaig.

- El pretractament de la mostra, es a dir fer l'assaig a partir de mostra humida, assecada o rehidratada així com les condicions d'emmagatzematge, pot afectar a la importància relativa de les diferents components ja que s'altera la seva distribució i els enzims no estan uniformement distribuïts en les diferents grandàries de partícula.

Malgrat que en l'actualitat encara no es pugui diferenciar els components, en la bibliografia trobem diferents estratègies seguides per a la seva diferenciació. D'acord amb Nannipieri et al. (2002) aquestes estratègies deriven de considerar un dels dos punts de partida excloents entre si:

1r. Que en la mesura de l'activitat hi contribueixen dos components (anomenats intra i extracel·lular) encara que el temps d'incubació sigui curt. L'ús d'un agent bacteriostàtic, com el toluè, per a prevenir el creixement microbià i així la síntesi dels enzims intracel·lulars durant el període d'incubació no és satisfactori ja que provoca canvis en la permeabilitat de la paret cel·lular i per tant l'alliberament dels enzims intracel·lulars. A més a més, aquest agent, així com les radiacions, provoquen efectes variables depenent del sòl en l'assaig enzimàtic.

2n. Que en els assaigs enzimàtics curts (unes hores) la contribució és fonamentalment de el component extracel·lular i que el component total es pot determinar després de provocar la lisi amb cloroform o amb ultrasons.

El primer punt de partida és el que mantenen Nannipieri et al. (2002) i proposen com a temptativa d'investigació de l'activitat extracel·lular l'anomenada *Resposta Fisiològica (PR)*. En aquest cas s'incuba el sòl en condicions òptimes de desenvolupament microbià a través de subministrament de glucosa i nutrients (nitrat o amoni) i es fan múltiples mesures de biomassa microbiana (o d'ATP) i d'activitats enzimàtiques en la mostra incubada. De la correlació d'aquests dues mesures es dedueix l'activitat extracel·lular com la que correspon a la interpolació a valors de zero de biomassa.

El segon punt de partida és dels autors Klose i Tabatabai i són partidaris del mètode *Cloroform Fumigation (CF)* (Nannipieri et al., 2002). La fumigació amb cloroform o bé el tractament amb ultrasons provoca la lisi de les cèl·lules i per tant en la mesura de l'activitat en una mostra així tractada consideren que hi ha la contribució d'ambdós components intra i extra cel·lular. Aquests autors van trobar en mostres humides de sòls agrícoles que el component d'activitat extracel·lular era en mitjana dels 45 % en l'arilsulfatasa i del 47 % en la ureasa respecte de l'activitat total. Seguint aquesta mateixa línia d'acord amb els resultats sobre el grau d'afectació per la fumigació, Ladd (2003) conclou que la deshidrogenasa és un enzim completament intracel·lular, la caseïna és extracel·lular i les proteases que actuen sobre pèptids (ZPL i BAA) són majoritàriament (80-90 %) extracel·lulars.

Per la seva banda Tate III (2002) afirma que l'existència dels diferents components enzimàtics pot quedar verificada a través de paràmetres cinètics. Com què hi ha alteració dels paràmetres cinètics quan un enzim queda estabilitzat (adsorbit en les argiles o bé quan queda enllaçat covalentment a substàncies húmiques o bé a

carbohidrats) el component que més segueix la cinètica de Michaelis-Menten seria la intracel·lular, la lligada als processos metabòlics essencials.

Diversos autors tenen present que qualsevol estratègia de diferenciació obliga a més a més a descartar la existència de la catàlisi no enzimàtica encara que tampoc hi ha una metodologia clara per a diferenciar-la. En aquest sentit, s'ha utilitzat l'esterilització del sòl que desnatura els enzims, però no queda clar que no quedi activitat residual dels enzims acumulats i que no afecti a la pròpia activitat catalítica dels col·loides del sòl.

Finalment hem de pensar en el potencial que les **noves tècniques emergents** poden representar a l'hora d'estudiar la localització dels enzims en matrius com el sòl i per tant per esbrinar la importància relativa dels diferents components que engloben l'activitat enzimàtica (Nannipieri, 2006; Wallenstein i Weintraub, 2008). En aquest sentit Nannipieri (2006) considera que la caracterització del contingut en ADN i ARN del sòl pot permetre la determinació de les espècies que intervenen en un determinat procés, però que és necessària la informació de la proteòmica per conèixer realment la seva funció. Per aplicar correctament la proteòmica als sòls s'ha de tenir present la complexitat del sistema ja que només el 4 % del N total està present en la biomassa mentre que el 30-45 % del N del sòl està present com a proteïna extracel·lular estabilitzada, no estan relacionada amb l'activitat microbiana. A més a més, un dels problemes és el propi procés d'extracció que mai dona un extracte prou net (obliga a fer una purificació prèvia a l'anàlisi de les proteïnes) i que s'obté una barreja de proteïna microbiana i de l'estabilitzada; en aquest sentit proposa com a via primer separar les cèl·lules de les partícules del sòl. Només les proteïnes que estiguin associades a cèl·lules podran ser considerades en la caracterització de les funcions dels microorganismes en el sòl i els seus canvis amb agents externs (proteòmica funcional). També proposa l'anomenada proteòmica estructural, equivalent a caracteritzar les proteïnes adsorbides o estabilitzades als col·loides i entendre els mecanismes d'estabilització. Per la seva banda, Wallenstein i Weintraub (2008) proposen com a tècniques emergents les mesures directes de l'activitat enzimàtica in situ (amb sensors o microscòpia) i la detecció directa dels productes de les reaccions enzimàtiques (espectrometries de masses). Aquests autors també destaquen les tècniques de microplats i la cromatografia per HPLC com a alternatives a les mesures tradicionals de l'assaig enzimàtic.

L'activitat de qualsevol enzim en el sòl és el resultat de la síntesi, persistència, estabilització, regulació i comportament catalític de la proteïna present en el sòl en el moment de l'assaig. Tots aquests processos estan dinàmicament relacionats i influenciats pels canvis físics, químics i biològics del sòl. L'expressió i conservació d'una activitat pot ser afectada per factors ambientals naturals (canvis estacionals, localització geogràfica, règim hídric o tèrmic) i activitats antròpiques (pràctiques agrícoles, presència de contaminants...) (Gianfreda i Ruggiero, 2006). D'acord amb aquesta premissa, la principal **potencialitat dels enzims com a indicadors de qualitat** es sosté pels resultats de moltes experiències descrites a la bibliografia sobre la influència d'aquests factors ambientals i de diversitat d'activitats antròpiques sobre les activitats enzimàtiques del sòl.

La primera utilitat que es va donar a les mesures d'activitat enzimàtica va ser considerar-les com a **índex de fertilitat** en sòls agrícoles com a mesura del nivell de disponibilitat en nutrients i per tant potencialment directament relacionats amb la producció. Entre els anys 1950 i 1960 les activitats enzimàtiques invertasa, proteasa,

asparaginasa, ureasa, fosfatasa i catalasa es van assumir com a indicadors vàlids de fertilitat encara que a través de l'anàlisi de diverses experiències s'arriba a resultats contradictoris (Nannipieri 1994; Nannipieri et al., 2002; Dick, 1994). Aquests autors resumeixen la seva visió crítica assenyalant:

- Només en sistemes no alterats podem esperar una estreta relació entre un paràmetre biològic o l'activitat enzimàtica i la producció vegetal; en sistemes agrícoles amb grans aportacions de nutrients i aigua es pot estimular el creixement vegetal sense necessàriament trobar resposta per part de la vida microbiana del sòl.
- Els fertilitzants poden incrementar la producció i l'activitat de la biomassa i rebaixar l'activitat enzimàtica. Com a explicació de certs resultats consideren l'efecte supressor de certs fertilitzants sobre les activitats enzimàtiques (amoni sobre ureasa i amidasa, fosfat sobre fosfatasa).
- Els enzims estan relacionats amb una reacció específica per tant no poden ser reflex de l'estat dels nutrients en un sòl ni tampoc del global de l'activitat; així la tria de l'enzim com a índex de qualitat relacionada amb la fertilitat s'ha de fer, per tant, acuradament.

Posteriorment prengueren interès els efectes de les diferents **pràctiques agrícoles** sobre les activitats enzimàtiques del sòl. La bibliografia recull resultats de múltiples experiències a llarg termini sobre l'aplicació de diferents tipus d'adobat, tipus de llaurat, rotació de cultius, conservació del dallat,..... que indiquen que les activitats enzimàtiques són sensibles i capaces de discriminar entre els tractaments. La seva capacitat de resposta és ràpida, ja que es donen quan encara no es detecten canvis mesurables en la MO, i a més es comprova que perduren amb el temps (Dick, 1994). Les diferents pràctiques agrícoles alteren les propietats biològiques del sòl i afecten els valors, i la distribució espacial en el perfil de sòl, de la biomassa microbiana i la seva activitat així com de les activitats enzimàtiques. Principalment aquesta alteració es deu als canvis en l'aportació de nutrients i en la quantitat i qualitat dels residus vegetals que rep el sòl. Generalment les activitats enzimàtiques en un sòl sense cultivar són superiors respecte d'un sòl amb cultiu si considerem la capa superficial però succeeix al contrari en les capes de més profunditat. En els cultius convencionals s'accelera l'oxidació microbiològica de la MO i s'estimula una major activitat microbiana però també hi ha una reducció de la mateixa d'acord amb la pèrdua de MO. A més, la degradació física del sòl associada al monocultiu té efectes negatius sobre l'activitat microbiològica. Les activitats enzimàtiques es veuen afectades indirectament pels canvis ocasionats en l'estructura de les comunitats microbianes (Gianfreda i Ruggiero, 2006). Podem considerar que en general les esmenes orgàniques (fems, adob verd, restes de collita, residus municipals,...) augmenten significativament l'activitat d'una àmplia gamma d'enzims i que encara que sovint aquests materials contenen enzims, l'augment és bàsicament degut a l'estimulació de l'activitat microbiana (Martens i Frankenberger, 1992; Dick, 1994). Tanmateix és fàcil trobar a la bibliografia una extensa i diversa relació d'experiències sobre efectes de la fertilització orgànica davant la convencional a llarg termini amb resultats difícilment generalitzables pel que fa a les activitats enzimàtiques (Marschner et al., 2003, Bending et al., 2004, Creccio et al., 2004, Böhme et al., 2005, García-Ruiz et al., 2008).

Des d'una **perspectiva ambiental** també s'ha posat de manifest la utilitat de les activitats enzimàtiques (a través de la seva distribució en les partícules de diferents grandàries o bé de les característiques cinètiques com la K_M) com a indicadors de degradació dels sòls donada la seva associació amb els canvis de la qualitat de la matèria orgànica (Speir i Ross, 2002). D'acord amb aquests autors però, és superior la seva capacitat d'indicar la recuperació dels sòls en la restauració que la de predicció de la degradació. En aquest sentit, troben correlació entre les activitats enzimàtiques (especialment de les carbohidrolases) amb desenvolupament de la coberta vegetal i s'incrementen més ràpidament del que ho fa el contingut en MO. Diversos autors manifesten l'evidència que les activitats enzimàtiques decreixen en paral·lel a la degradació de la cobertura vegetal (Bastida et al., 2008a).

Pel que fa a l'efecte dels contaminants sobre les activitats enzimàtiques els primers estudis es deuen a Kiss et al. (1975). La bibliografia també és molt extensa i en general, s'estudia per separat els contaminants orgànics (degut a abocaments o a l'ús de pesticides en agricultura) dels inorgànics (bàsicament, metalls pesants). Cal tenir present que els efectes d'un compost orgànic tòxic en el sòl són temporals i depenen de l'habilitat dels microorganismes para adaptar-se a la seva presència o a degradar-lo. En contrast, els metalls pesants poden romandre en el sòl i afectar a llarg termini negativament diversos processos biòtics i abiòtics (Gianfreda i Ruggiero, 2006). Respecte dels contaminants orgànics, és important conèixer el seu temps de persistència en el sòl i Nannipieri (1994) considera que tenen efectes directes (poden provocar inhibició o estimulació de l'activitat) i efectes indirectes (interacció amb les poblacions microbianes associades, efectes en la fisiologia dels microorganismes o bé els derivats de la seva biodegradació). La interacció de l'activitat enzimàtica amb els pesticides s'ha estudiat molt a través de l'activitat deshidrogenasa per la seva relació amb l'activitat microbiana (Speir i Ross, 2002).

Els metalls pesants afecten les activitats enzimàtiques per modificació de la conformació de la proteïna i per inhibició de la seva síntesi. També poden tenir efectes indirectes en provocar canvis en la comunitat microbiana com la selecció de microorganismes resistents que disminueix l'efecte inhibidor quan el sòl en rep addicions successives. Nannipieri (1994) afirma que existeix una correlació negativa entre l'activitat enzimàtica i la presència de metalls pesants (especialment Cu, Pb i Zn) i que els efectes es poden quantificar a través de la ED_{50} o concentració que redueix l'activitat a la meitat. Els resultats són però contradictoris ja que els efectes depenen no només de l'enzim i del metall i de la seva concentració i forma en que es troba, sinó també del tipus de sòl i dels altres compostos afegits amb el metall. L'aplicació de fangs de depuradora al sòl ha estat una forma d'estudi dels efectes dels metalls pesants. En aquests estudis, però, cal tenir present que l'estimulació de l'activitat biològica provocada per proporcionar MO làbil pot emmascarar l'efecte negatiu sobre l'activitat enzimàtica (Bonmatí et al., 1985; Nannipieri, 1994; Speir i Ross, 2002; Gianfreda i Ruggiero, 2006). Per altra banda, Speir i Ross (2002) assenyalen que el sòls poden oferir protecció als enzims davant la inhibició provocada pels metalls pesants. En aquest sentit afirmen que les activitats enzimàtiques poden ser considerades com una mesura de l'impacte dels metalls sobre el global de la biologia del sòl i de la seva absorció i toxicitat per les plantes. La inhibició dels enzims en sòls contaminats per metalls pesants pot informar de la biodisponibilitat d'aquests metalls i per tant ser indicadors d'ecotoxicitat o biosensors.

D'acord amb Trasar-Cepeda (2000a), encara que les experiències sovint demostren que les activitats enzimàtiques presenten sensibilitat davant la presència d'un o més contaminants, no sempre compleixen d'altres requisits com a indicadors de qualitat com l'habilitat en reflectir els diferents nivells, la consistència en el signe de la resposta o la de discriminar els efectes a diferents nivells de degradació. Per la quantificació de la degradació del sòl es necessita la informació de les activitats enzimàtiques però, degut a les seves limitacions, ha de ser complementada amb d'altres propietats bioquímiques.

Pel que fa a les **mancances de les activitats enzimàtiques com a indicadors de qualitat** hem de fer referència a les associades als paràmetres del component biològic: la seva inherent variabilitat, les de tipus metodològic i les lligades a la seva interpretació.

La bibliografia conté àmplia varietat de resultats sobre la variabilitat estacional de les activitats enzimàtiques i coincideix en assenyalar-la com una mancança a l'hora de ser considerades indicadors de qualitat del sòl (Dick, 1994; Nannipieri, 1994). D'acord amb Dick (1994) però, els enzims hidrolítics tenen l'avantatge, davant de la biomassa i la respiració, que presenten menys variacions estacionals. A més a més també considera que en el cas que diverses activitats hidrolítiques presentin poques variacions estacionals es pot pensar que l'activitat prové d'enzims estabilitzats pels col·loides del sòl. Encara que en general s'assumeix que l'activitat enzimàtica és màxima en primavera (coincidint amb l'estació de pluges) hi ha autors que no observen aquesta tendència o que troben que depèn de l'enzim i que per tant no es pot generalitzar una pauta de comportament (Bastida et al., 2006). Nannipieri (1994) afirma que abans de triar una activitat com a índex cal fer l'estudi de la seva variabilitat estacional. En la revisió bibliogràfica trobem tant aquest tipus d'estudi previ per tal de justificació l'època de mostreig (Trasar-Cepeda et al., 1998) com molts treballs on s'inclou la variabilitat estacional com un factor de variabilitat dels resultats (Sardans i Peñuelas, 2005; Bastida et al., 2006 i 2008c; Armas et al., 2007).

Pel que fa a la variabilitat espacial es pot afirmar que és superior a els paràmetres químics degut a la seva major susceptibilitat a les influències externes (Speir et al., 1984; Bonmatí et al., 1991). No obstant, d'acord a un dels primers estudis de la variabilitat en l'espai de Bonmatí et al. (1991), cal tenir present que part d'aquesta alta variabilitat es pot atribuir a la major variabilitat analítica associada a l'assaig enzimàtic. En aquest estudi es compara la variabilitat espacial de tres activitats (ureasa, fosfatasa i proteasa) respecte la de dos paràmetres generals (C orgànic i N orgànic) i si bé en base als coeficients de variació la variabilitat de les activitats és superior a la que presenten el C i el N, quan es contrasta amb la variabilitat analítica (amb l'anàlisi de la variància) passa a ser el C junt amb l'activitat ureàsica els paràmetres que presenten major variabilitat (Bonmatí et al., 1991 i 2003).

Si considerem que els **aspectes metodològics** s'inicien amb la presa de mostra d'acord amb el que hem assenyalat anteriorment, és important que, igual que d'altres propietats bioquímiques i microbiològiques, l'estratègia de mostreig consideri la dinàmica de distribució temporal i espacial. Així, el moment de mostreig, el número de mostres i la seva distribució horitzontal i en profunditat ha d'estar definit en el procediment de mostreig. Tate III (2002) adverteix que la presa de mostra (i també els pretractaments i la conservació de les mostres) altera les propietats físiques i un petit canvi en l'estructura física del sòl pot significar un canvi en l'activitat enzimàtica ja que pot provocar inducció (alliberament de substrat) o repressió (o d'inhibidors per

disrupció de l'estructura). Destaca també que s'augmenta l'accessibilitat de la MO, s'afavoreix el creixement de microorganismes i per tant pot quedar incrementada l'activitat encara que en el cas dels enzims estabilitzats l'alteració ha de ser menys important.

D'entre els problemes metodològics també s'han de tenir en compte els aspectes relacionats amb els procediments de laboratori. Si bé l'assaig enzimàtic és considerat un procediment simple i que es pot fer rutinàriament, la revisió bibliogràfica de les metodologies indica que existeix molta variabilitat en els procediments utilitzats pels investigadors i que per tant es fa necessària una estandardització dels protocols incloent-hi aspectes com el pretractament de les mostres (Morra, 2002; Bonmatí et al., 2003; Hinojosa et al., 2004; Gil-Sotres et al., 2005; Zornoza et al., 2006). Molts autors destaquen la importància del protocol de pretractament de mostra de sòl a causa de la seva incidència en la diferenciació de la contribució de les diferents components en l'activitat mesurada. Generalment es recomana: i) realitzar la determinació a partir de la mostra humida, ja que es considera més fidedigna, i guardar les mostres a 4 °C (durant un cert temps, màxim 10-15 dies) quan no es pot fer de forma immediata, i ii) si hi ha necessitat d'assecat tenir en compte l'enzim que s'ha de determinar i el component que interessa (Àlef i Nannipieri, 1995; Tabatabai i Dick, 2000; Morra, 2002; Gianfreda i Ruggiero, 2006). Tabatabai (1982) afirma que l'assecat generalment rebaixa el valor de l'activitat, però no és així en tots els casos. Dick (1994) també afirma que dependrà de l'enzim ja que n'hi ha que s'inactiven en l'assecat, i també que quan es vol emfatitzar l'activitat no associada a la biomassa, s'ha de treballar amb mostra assecada, la qual cosa representa un avantatge respecte a altres indicadors biològics. Bonmatí et al. (2003) afirmen que el procés d'assecat accelera el procés d'estabilització dels enzims per adsorció als col·loides i consideren que amb l'assaig enzimàtic amb mostres assecades a l'aire (i amb incubacions de menys de 4 hores) es mesura l'activitat més estabilitzada ja que l'associada a la biomassa existent i als enzims lliures es perd pràcticament del tot en l'assecat.

Bonmatí et al. (2003) adverteixen també com a aspecte metodològic que cal tenir en compte el temps d'emmagatzematge de les mostres. Quan s'opta per la determinació a partir de les mostres assecades (per tal de conèixer la capacitat catalítica més genuïna en quant a més estabilitzada) recomanen conservar les mostres un temps suficient per a assegurar-se que ja no variarà; aquest temps pot ser de l'ordre de mesos (2-6) depenent de l'enzim, el tipus de sòl i si la mostra ha rebut aport de MO.

Pel que fa als protocols de laboratori Bonmatí et al. (2003) destaquen que, a part de les condicions de tampó, pH i temperatura, les condicions en la que es porti a terme la incubació afecten al resultat ja que el sistema d'agitació i mida del recipient augmenta la difusió del substrat incrementant el valor d'activitat. Aquests autors també assenyalen la més alta variabilitat analítica associada a aquest tipus de determinació en comparació amb les determinacions de paràmetres químics i fisicoquímics- i el major cost econòmic especialment en inversió de temps.

Existeix com a mancança un altre aspecte complex que sorgeix un cop hem obtingut el resultat i són les **dificultats en la interpretació**. Tot i que les activitats enzimàtiques poden ser sensibles a les pertorbacions amb el temps, en estudis comparatius, l'ideal fora que la seva interpretació com a indicador de qualitat fos independent d'una referència temporal i regional. Això es creu que difícilment serà possible (Dick, 1994); així expliquem a continuació els diferents aspectes associats a aquesta dificultat així com les temptatives de solució proposades per diferents autors.

Un primer aspecte controvertit en la interpretació dels resultats, i que merma la potencialitat dels enzims com a indicadors, és la relació entre l'activitat enzimàtica i les propietats biològiques com l'activitat microbiana. Des dels anys 60 s'han fet intents de relacionar l'activitat enzimàtica amb l'activitat microbiana. Segons Dick (1984) primer es van relacionar amb la respiració i amb el recompte directe de microorganismes i es van trobar poca relació. Posteriorment, Frankerberger (1983) va trobar relacions més fortes entre algunes (fosfatasa, amidasa i catalasa) de les onze activitats enzimàtiques mesurades i la biomassa microbiana i amb la respiració però no amb el recompte en placa. Altres autors varen trobar resultats similars amb altres enzims (proteasa, cel·lulasa, ureasa) i l'ATP. La deshidrogenasa, activitat que només pot existir intracel·lular, no s'ha trobat gaire correlacionada amb la biomassa, encara que aquest fet es pot explicar per problemes metodològics específics (Dick, 1984).

Nannipieri (1994) indica que en qualsevol estudi s'ha de tenir en compte la relació entre els efectes sobre l'activitat enzimàtica i els efectes sobre l'activitat de la biomassa i per tant qüestiona si s'afecten directament els enzims o bé els efectes són sobre la biomassa, o sigui per estimulació de l'activitat microbiana. Nannipieri et al. (2003) consideren que l'activitat microbiana està relacionada amb els enzims intracel·lulars i no amb els extracel·lulars. Dick (1994) defensa que la mesura de les activitats enzimàtiques no tenen el sentit de ser una mesura més de l'activitat biològica del sòl per si mateixa, sinó més aviat com un indicador integrador de canvi en la biologia i la bioquímica del sòl degut a factors externs com ambientals o bé de gestió del sòl; així sosté que l'activitat enzimàtica està associada amb els microorganismes actius perquè la biomassa microbiana es considera la font primària d'enzims en el sòl, però no existeix una correlació directa entre la mida de la biomassa i el seu estat metabòlic. Cal dir finalment que, per diversos autors, aquesta controvèrsia està lligada a la dificultat de diferenciació dels dos components (enzims intra i extracel·lulars) i assenyalen la necessitat de trobar una mesura experimental diferenciadora que donaria rellevància a la mesura de l'activitat enzimàtica com a índex de qualitat (Nannipieri et al., 2002; Tabatabai i Dick, 2002).

Un segon aspecte a considerar és la relació de les activitats entre sí. Nannipieri et al. (2002) contempen tres raons per les quals una sola activitat enzimàtica no pot ser un índex d'activitat microbiològica o de fertilitat del sòl encara que sigui crucial per un determinat procés metabòlic:

- i. Es refereixen a un substrat molt específic i l'activitat microbiana respon a una gran varietat de processos.
- ii. La biomassa microbiana pot estar correlacionada amb la respiració o amb una activitat enzimàtica però no ha de ser sempre vàlida per a tots els sòls ni per tots els ambients.
- iii. En la mesura de l'activitat s'inclou el component d'enzims estabilitzats i aquesta pot ser que no sigui tan sensible als factors ambientals com ho són els que afecten a l'activitat microbiològica.

Aquests autors consideren que no sembla possible que una sola activitat pugui ser un bon indicador, i proposen la mesura simultània d'una bateria d'activitats com a estimació més vàlida de la resposta metabòlica del sòl als diferents agents (Nannipieri, 1994 i 2002). Consideren que aquesta resposta es pot esbrinar a través de la mesura de les activitats enzimàtiques perquè les funcions que realitzen els microorganismes són degudes a l'acció catalítica dels enzims (encara que sota el control dels microorganismes). En aquest sentit afirmen que un índex que integri les activitats

enzimàtiques que catalitzen les reaccions limitants dels principals processos metabòlics pot ser utilitzat per a mesurar l'anomenada *diversitat funcional microbiana* (*microbial functional diversity*) terme que defineixen com una mesura de l'àmplia i versàtil capacitat metabòlica del sòl en contrast amb l'activitat microbiana que només dóna idea del seu nivell. La tria de les activitats ha de ser acurada i sembla raonable mesurar les activitats que limitin la velocitat d'una ruta metabòlica (restringir-se a aquelles involucrades en un procés concret com la degradació de la matèria orgànica, la mineralització del N, la nitrificació....). Insisteixen, un cop més, que els enzims intracel·lulars són els responsables de la diversitat funcional microbiana i s'haurien de poder diferenciar d'altres components abiòtics o extracel·lulars. Atenent al conjunt de les consideracions anteriors Nannipieri et al. (2002) recomanen, per a l'estudi de la qualitat, un grup d'activitats enzimàtiques conjuntament amb paràmetres físics, químics i microbiològics agrupats en els anomenats índexs empírics seguint la línia general ja apuntada en l'apartat 2.1.2.

Com a **índexs simples** semblen apropiats els quocients de l'activitat respecte al carboni, la biomassa o el contingut d'argila (Nannipieri, 1994); el mateix autor també proposa comparar dos índexs: l'activitat/biomassa amb la deshidrogenasa/biomassa. Respecte de les activitats específiques (activitat dividida entre C o N) Gil-Sotres (2005) afirma que són un intent de normalitzar l'activitat enzimàtica i que s'han utilitzat per comparar activitats en sòls amb diferents continguts en matèria orgànica. Si bé s'han fet servir amb èxit per estudiar l'efecte de la fertilització orgànica en l'activitat enzimàtica associada a diferents grandàries de partícula, en d'altres casos (avaluar el comportament en sòls contaminats) no han resultat ser útils. Altres autors utilitzen com a paràmetres el quocient entre activitats enzimàtiques (Caldwell et al., 1999).

Masciandaro et al. (1998) varen proposar l'anomenat Índex del Potencial Metabòlic (MPI, metabòlic potencial índex) que es defineix com l'activitat deshidrogenasa (DH) dividida pel contingut de carboni orgànic soluble (WSOC) ($MPI = DH/WSOC$). Aquesta relació resulta ser el paràmetre més sensible en assenyalar la dinàmica de la recuperació l'activitat metabòlica i fertilitat d'un sòl després d'anys de cultiu intensiu envers la seva evolució cap a un sòl natural.

Pel que fa als **índexs multi paramètrics** que incorporen més d'una activitat enzimàtica s'han de destacar els anomenats BIF (Biological Fertility Índex) i EAN (Enzyme Activity Number) que varen ser proposats per avaluar la incidència de les pràctiques agrícoles sobre la qualitat dels sòls prenent com a referència sòls naturals (Nannipieri et al., 2002; Bastida et al., 2008c).

El BIF (proposat per Stefanic el 1984) fa servir només dues activitats enzimàtiques i respon a l'expressió:

$$BIF = (DH + k \cdot CA) / 2$$

DH (deshidrogenasa, expressada com a mg TPF trifenílformazan) i CA (catalasa en percentatge de O₂ alliberat de l'H₂O₂), k coeficient de proporcionalitat

L'índex EAN va ser proposat per Beck el 1984 i té en consideració, a més de de les activitats oxidoreductases, les relacionades amb les dinàmiques del cicle del C, N i P. La seva expressió és:

$$EAN = 0,2 \cdot (DH + CA/10 + AP/40 + PR/2 + AM/20)$$

DH (deshidrogenasa en mg TPF trifenilformazan), CA (catalasa en % O₂/H₂O₂), AP (fosfatasa alcalina en µg de fenol), PR (proteases en µg de N-amino) i AM (amilasa en % midó hidrolitzat)

D'acord amb Nannipieri et al. (2002) en la proposta d'aquests índexs no queda clar el criteri de la tria dels paràmetres que porten a la seva confecció; així per exemple a l'índex EAN considera incorrecte incloure l'amilasa i no la cel·lulasa quan la cel·lulosa és més important que el midó atenent a la composició de les restes vegetals.

Posteriorment diversos autors han aplicat aquests índexs per a l'avaluació de la qualitat en sòls agrícoles (veure apartat 3.1.2). Els resultats obtinguts els hi permet afirmar que un sòl agrícola presenta una qualitat inferior en comparació a un sòl natural (prat o bosc) (Saviozzi et al., 2001; Riffaldi et al., 2002). Aquests autors també utilitzen l'índex HC (Hidrolizing Coefficient) que utilitza la mesura de FDA o hidròlisi de la fluoresceïna diacetat proposat per Perucci (1992). Aquest índex HC o coeficient hidrolític representa la relació entre la fluoresceïna hidrolitzada i la fluoresceïna total i té un rang entre 0-1. La FDA és fàcil de determinar i proporciona una visió més realista de l'activitat metabòlica involucrada en l'alliberament de nutrients de la MO i per tant pot ser considerat índex de fertilitat (Perucci, 1992).

Per últim Puglisi et al. (2006) fan un important treball de deducció d'un índex de qualitat basat únicament en activitats enzimàtiques (AI). Tracten tres llocs amb tres tipus d'alteració (contaminació per reg amb aigües residuals, cultiu intensiu sense fertilització orgànica i reg amb aigua salina) cadascuna dels quals comparen amb un sòl adjacent no afectat per aquesta pertorbació. Desenvolupen progressivament tres índexs AI.1, AI.2 i AI.3 partint de set activitats enzimàtiques. Per AI.1 consideren totes les activitats, per A.2 només les de més pes en l'anàlisi de components principals (GLC, FOSF, UR i INV) i per l'últim AI.3 només tres (eliminen la INV) ja que són les tres activitats enzimàtiques comunes a d'altres set experiències descrites a la bibliografia que li permeten fer una àmplia validació de l'índex. L'expressió del AI.3 és la següent:

$$AI.3 = 7,87 \cdot GLC - 8,22 \cdot FOSF - 0,49 \cdot UR$$

GLC (β-glucosidasa) i FOSF (fosfatasa) en µmol de pNF per g i h i UR (ureasa) en µmol d'urea per g i h

(Puglisi et al., 2006)

i té capacitat discriminant entre sistemes alterats i no alterats en una àmplia gamma de situacions reg amb aigua salina, contaminació per metalls pesants, explotació agrícola intensiva, contaminació per indústria de curtits i lixiviats d'abocador, activitat minera, i erosió; presenta limitacions, però, per trobar incidència entre diferents sistemes de cultiu.

Com a estratègia d'interpretació també existeixen molts estudis que apliquen el tractament estadístic de l'anàlisi multivariant (anàlisi de components principals) i arriben a discriminar tipus de sòls utilitzant paràmetres enzimàtics (Nannipieri et al., 2003). Seguint aquesta estratègia trobem molts treballs on el resultat de l'anàlisi de components principals acaba amb la proposta d'expressions algebraiques on intervenen diversos paràmetres bioquímics com a índex. La utilitat d'aquests índexs es

posa de manifest en l'estudi de sòls naturals (Trasar-Cepeda et al., 1998; Jiménez et al., 2002; Bastida et al., 2006; Zornoza et al., 2007b i 2008a) o bé en l'estudi de factors agrícoles (Puglisi et al., 2006) o d'altres factors antròpics (Kandeler et al., 1999).

Com a intent d'esbrinar les limitacions d'interpretació de les activitats enzimàtiques, és interessant l'estudi de Gianfreda et al. (2005) on es fa deliberadament comparació de llocs i situacions molt diferents per veure si els enzims són capaços de detectar diferents factors d'afectació del sòl (agricultura intensiva i presència de contaminants). Tot i que alguns resultats són en part bons (en global es detecta la sensibilitat de ureasa i deshidrogenasa a contaminants orgànics) troben que les correlacions es compleixen només dins dels grups de sòls, però es perden quan s'integra la globalitat de mostres. Conclouen que globalment no sembla que es pugui dir que hi ha relació causa-efecte en els canvis que hi ha en el sòl en resposta a un determinat factor i el comportament dels enzims. En aquest mateix sentit Gianfreda i Ruggiero (2006) conclouen que el repte del futur seria suplir les mancances que té la mesura de l'activitat enzimàtica, que fan difícil explicar els canvis que s'observen en resposta a un determinat factor, o establir la relació causa-efecte entre el factor aplicat i la variació de l'activitat enzimàtica.

Existeixen també **altres vies d'interpretació** que no suposen la confecció d'un índex. Així, Nannipieri et al. (2002) també consideren la possibilitat de fer *sunrayplots* (diagrames radials amb valors normalitzats) amb diferents activitats per visualitzar la diversitat microbiana ja que en un índex es perd la informació de cada paràmetre; afirmen que l'àrea pot proporcionar una mesura integrada de la diversitat i l'aspecte de l'estrella permet una comparació visual de les característiques de les mostres. Per la seva banda Kandeler et al. (1999) donen importància als estudis de la distribució dels microorganismes i de les activitats enzimàtiques a microescala en les diferents grandàries de partícula i les seves variacions a petita escala per a analitzar la resposta de les pràctiques agrícoles sobre la qualitat (Gianfreda i Ruggiero, 2006). L'enfoc que segueixen Sinsabaugh (1994, 2002) per a la interpretació dels valors d'activitat enzimàtica diferencien un 1er nivell d'estudi dels enzims com a mesuradors de l'activitat microbiana (coincideix amb Nannipieri) i un 2n nivell que representa centrarse en les activitats que s'encarrega d'un determinat procés (com la degradació de material lignocel·lulític o la mineralització del fòsfor orgànic). Consideren que el substrat selecciona la comunitat microbiana, que aquesta produeix els enzims extracel·lulars que el degrada i que la seva descomposició provoca la successió de la comunitat. Així estudien el rol dels enzims en la descomposició de la fullaraca en sòls forestals i sostenen que es porta a terme per sistema múltiple d'enzims que interactuen sinèrgicament. Així, considerant que la velocitat de la degradació de la fullaraca ha d'estar relacionada amb l'activitat dels enzims responsables, troben correlació entre la pèrdua de pes d'aquest material i l'activitat de les cel·lulases.

2.2 ELS NOSTRES PARÀMETRES

El centre d'interès del nostre estudi és la fracció activa de la MO del sòl, fracció on tenen lloc la majoria de transformacions bioquímiques, i concretament ens centrem en les transformacions relacionades amb el cicle del C. Hem triat com a paràmetres principals del nostre estudi els continguts en carbohidrats totals i carbohidrats extractables del sòl, ja que els carbohidrats són un component important de la matèria orgànica, i les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa com a responsables de l'última etapa de la transformació d'aquests compostos de carboni. A més també hem considerat, com a paràmetres auxiliars, el contingut en C orgànic i N aminoacídic del sòl; paràmetres que hem cregut necessaris per posar de manifest la importància relativa dels paràmetres principals respecte del total dels components de la MO. Els carbohidrats i els enzims són dos dels quatre indicadors dels processos microbians d'acord amb la visió general sobre indicadors del component biològic de la qualitat del sòl proposada per Gregorich et al. (1997). Els carbohidrats totals i la proteïna hidrolitzable (el N aminoacídic) junt amb els lípids i la lignina constitueixen dues de les fraccions en què es pot estudiar la complexitat de la MO del sòl d'acord amb Kögel-Knaber (2006). En aquest apartat exposem les característiques generals, la significació de cadascun dels paràmetres, el seu rang de valors i els principals resultats derivats del seu estudi i en el capítol 5 la metodologia associada a les seva determinació analítica.

2.2.1 Carboni orgànic i Nitrogen aminoacídic

El carboni orgànic és un paràmetre bàsic de caracterització dels sòls a través del qual es mesura el contingut en MO. El contingut de carboni orgànic forma part, junt amb el N total i les fraccions lleugera i macro orgànica, dels indicadors de la MO del sòl sobre el component biològic de la qualitat del sòl (apartat 2.1.2). Aquests continguts no informen dels canvis de la matèria orgànica en el sòl; malgrat això, són utilitzats com a indicadors grollers de la qualitat del sòl, perquè nivells elevats generalment indiquen bona correlació amb altres propietats desitjables del sòl com alts nivells de biomassa microbiana, nutrients disponibles per a les plantes i bona estructura (Gregorich et al., 1997). En la revisió bibliogràfica d'estudis de qualitat de sòls veiem que forma part habitualment dels índexs de qualitat i és molt útil per a l'expressió relativa de paràmetres bioquímics.

La quantificació directa del contingut en MO d'un sòl és difícil ja que cap mètode és suficientment exacte. L'alternativa per a la mesura del contingut en MO del sòl és l'estimació a través de la concentració de carboni orgànic del sòl ja que el carboni és el major constituent de la MO en pes. L'estimació s'obté multiplicant el contingut en carboni orgànic per un factor basat en el percentatge de carboni en la MO i s'anomena Van Bemmelen factor que proporciona només una estimació de la MO ja que el percentatge de carboni de la MO és variable entre sòls, i a més varia amb la profunditat, de manera que el factor apropiat hauria de ser determinat experimentalment per a cada sòl (Nelson i Sommers, 1982; Rosell et al., 2001).

El carboni total del sòl és la suma del carboni orgànic i inorgànic. La majoria del carboni orgànic està present en la fracció de la matèria orgànica del sòl mentre que el carboni inorgànic es troba com carbonats minerals. El carboni orgànic es troba en la fracció orgànica del sòl contituda per les cèl·lules dels microorganismes, les restes de plantes i animals en diferents estats de descomposició, l'humus sintetitzat a partir d'aquestes i les formes elementals de carboni. El carboni orgànic es pot estimar per

diferència (entre el carboni total i el carboni inorgànic) o bé es pot determinar directament d'acord amb el procediment de carboni total (després d'eliminar el carboni inorgànic) o bé per oxidació. En el capítol 5 descrivim amb més detall les característiques de les dues vies clàssiques així com les noves tecnologies associades a la mesura de les formes de carboni en sòls.

El nitrogen en el sòl es troba majoritàriament (95 %) en forma orgànica i deriva principalment de la descomposició de teixits vegetals (on els compostos que contenen N representen entre el 2-15 % del pes sec) i també del N de la biomassa microbiana (on els compostos que contenen N representen entre el 50-60 % en bacteris i 14-52 % en fongs). Les formes minerals de N són fàcilment eliminades del sòl com a formes solubles de NO_3^- o gasoses (NH_3 , N_2O) i només NH_4^+ pot fixar-se als col·loides minerals (Kögel-Knabner, 2001). Estudiant les formes de N presents en el sòl des d'un punt de vista d'anàlisi clàssica, és a dir a través d'un procediment hidrolític (sotmetre la mostra a una hidròlisi àcida, habitualment HCl) es troba que la major part és N hidrolitzable (79-91 %). Aquesta fracció inclou el N aminoacídic (30-45 %), el N d'aminosucres (5-10 %) així com el N-amoniacal (20-35 %) i les formes de N no identificades (10-20 %). La part resistent a la hidròlisi és anomenada N no hidrolitzable o insoluble, pot representar entre el 10-30% del N orgànic i és bàsicament de tipus heterocíclic. El N d'aminoàcids del sòl es pot considerar que representa entre 40-50 % del N total del sòl i majoritàriament es troben formant part de pèptids i proteïnes ja que els aminoàcids lliures representen una proporció molt petita (Kögel-Knabner, 2006).

En els organismes vius la majoria del N orgànic es troba en forma de proteïna normalment constituïdes pels 20 aminoàcids principals (AA) i tenen funcions d'enzims, transportadores, reguladores, de reserva i també part d'aquestes proteïnes poden tenir també caràcter estructural. Si bé la unitat bàsica de les parets cel·lulars de fongs i esquelet extern d'insectes és la quitina (polisacàrid format per la unió de N-acetilglucosamina per enllaç 1-4), les cèl·lules de la paret dels bacteris està formada per peptidoglucans (mucopolisacàrids). Els peptidoglucans són polímers amb estructura de polisacàrid i cadenes curtes de pèptids. Les unitats principals són N-acetilglucosamina i N-acetilmuràmic i la part proteica conté els AA comuns i d'altres d'específics. El N a més a més de formar part de les proteïnes i dels polímers amb aminosucres en els organismes vius també forma part d'ADN i ARN i es troba en altres compostos menys abundats com porfirines, alcaloides i esfingolípid (Kögel-Knabner, 2006).

Els compostos orgànics que alliberen les arrels de plantes vives són una font important de N orgànic en el sòl; els exsudats de les arrels contenen principalment aminoàcids i amides i també nucleòtids i flavonones. Els components del exsudats són ràpidament consumits pels microorganismes del sòl i per tant immobilitzats en els residus microbians. En la solució del sòl o en els microporus podem trobar els aminoàcids lliures, però el nivell poques vegades supera 2 $\mu\text{g/g}$ encara que pot ser molt més alt en la rizosfera. La fracció de AA lliures està molt influenciat pel temps, la humitat, el tipus de planta i la seva edat i l'addició de residus orgànics. Nivells més alts de AA lliures van associats a més activitat microbiana.

En la fracció de l'hidrolitzat del sòl trobem a més de les formes nitrogenades conegudes, junt amb l'amoni que prové de la degradació parcial d'alguns aminoàcids, d'altres N- biomolècules que constitueixen la fracció de formes no identificades (*HUN*, *Hydrolysable-Unknown-N*). Una proporció important de compostos de N del sòl es

desconeguda degut a les dificultats que representa el seu aïllament pels mètodes convencionals. Cal tenir present que les tècniques no destructives més modernes que permeten caracteritzar la composició de compostos de N directament en la mostra de sòl tenen poca resolució per identificar compostos específics degut a la baixa sensibilitat i el baix contingut en N de molts sòls. Entre aquestes tècniques es troben la piròlisi (Py-CG-MS) l'espectroscòpia ^{15}N -NMR i la XANES (X-ray absorption Near-Edge Structure Spectroscopy). Malgrat les dificultats analítiques, a través de la tècnica ^{15}N -NRM, s'ha pogut detectar que quasi tot el N orgànic del sòl està present en forma d'enllaç amida (N de pèptids o proteïnes) i a través de la piròlisi també es detecta una important fracció de N heterocíclic aromàtic (encara que, en part, es creu que poden ser artefactes). La presència majoritària de N en forma d'aminoàcids és indicativa de que la major part del N orgànic es format biològicament perquè és difícil que de forma abiòtica es formi l'enllaç amida. Pel que fa a les formes de N del residu àcid insoluble (fracció no hidrolitzable) actualment es considera que és resistent però no inert ja que també pot contenir, a més del N heterocíclic, N proteic protegit. L'alt contingut de N d'amida en el material humificat s'explica per la protecció que es dona de les proteïnes durant la humificació per adsorció en la fase mineral mitjançant diversos mecanismes, no del tot explicats (Nannipieri i Eldor, 2009).

El cicle del N en el sòl va associat, en moltes fases, al del carboni. La mineralització del N afecta un 60-80 % de les entrades anuals de N depenent del tipus de MO que s'incorpori, però sempre queda un romanent de N orgànic associat a l'humus en formes molt estables. Aquest té un temps de residència de segles i en canvi el N de proteïnes i àcids nucleics és metabòlicament molt actiu i per tant està subjecte a una ràpida renovació. L'activitat biològica del sòl depèn en gran mesura de la disponibilitat d'aquest element (Alcañiz et al., 2005). La major part del N de les plantes com el de la biomassa microbiana és susceptible de degradació microbiana i és ràpidament mineralitzat o reutilitzat per producció biològica. Les proteïnes dels teixits vegetals i de la biomassa són considerats components poc estables, fàcilment degradables, per la facilitat en que es pot desfer l'enllaç amida. Les parets cel·lulars dels microorganismes són relativament fàcils de degradar, i les seves unitats estructurals (glucosamina, galactosamina o àcid muràmic) es troben en l'hidrolitzat i s'acumulen durant el període de descomposició de la fullaraca. Aquests components específics de fongs i bacteris poden fer-se servir de marcadors per estimar la contribució dels residus microbians en la MO del sòl (Kögel-Knabner, 2006).

El procés d'estabilització dels compostos de N no mineralitzats es du a terme per una sèrie de transformacions complexes (microbianes i abiòtiques) que suposen una gran modificació de la seva estructura cap a la formació de compostos més estables com les substàncies húmiques (Kögel-Knabner, 2006). La formació de compostos aromàtics heterocíclics de N s'ha proposat com un mecanisme important d'estabilització del N durant la humificació (s'ha vist que són importants en sòls on la vegetació s'ha cremat) afavorida per condicions dràstiques de transformació de la MO.

La concentració de N en el sòl és molt variable, depèn del contingut en MO i com a rangs es pot parlar de valors de 0,1-0,2 % en sòls agrícoles, valors més alts en prats i sòls forestals i arribar fins a 3,5 % en torbes (Stevenson, 1982; Kögel-Knabner, 2006). Respecte dels percentatges de distribució de les diferents formes de N en el sòl s'observen grans variacions, però està poc clar la seva relació amb les propietats del sòl. Una gran varietat de factors complexos pot afectar la proporció de N d'aminoàcids en el sòl incloent la síntesi i destrucció de la biomassa indígena, l'absorció a les argiles

i les reaccions amb quinones i sucres reductors. Respecte de la influència de la zona climàtica, es troben % més alts de N aminoàcids i aminosucres i inferiors % d'amoni en climes càlids; pel que fa al cultiu té pocs efectes sobre la distribució de formes de N encara que, en general, disminueix la proporció N-AA i la d'aminosucres creix lleugerament. Per altra banda el percentatge de N-AA és més alt en superfície i també depèn dels continguts en àcids húmics i fúlvics (Stevenson, 1982).

Respecte del perfil d'aminoàcids presents en els sòls els predominants són els que estan presents en les parets cel·lulars dels microorganismes: Gly, Ala, Asp i Glu sovint junt amb Lys, ornitina i diaminopimelic la qual cosa sembla indicar que els que s'acumulen en el sòl deriven dels pèptids, mucopèptids, i àcids teicoics de les parets cel·lulars microbianes. La proporció D-AA/(D-AA+L-AA) per Ala, Asp i Glu és més alta que en d'altres proteïnes i això està d'acord amb el fet que els D-AA són metabòlits i components de les parets microorganismes i que aquests compostos són preservats en els sòls. Els àcids húmics contenen, en comparació amb els àcids fúlvics, més proporció de AA bàsics i menys de AA àcids. En contrast amb les diferències quantitatives en el contingut en N aminoacídic detectades entre sòls de pastura, forestals o de cultiu són poques les diferències en la composició en AA (Stevenson, 1982). El perfil d'aminoàcids és, però, especialment variable entre el N aminoacídic de la biomassa microbiana i està condicionat per l'abundància relativa entre fongs i bacteris (Senko i Tabatabai, 1998; Friedel i Scheller, 2002).

2.2.2 Carbohidrats totals i Carbohidrats extractables

Tant el contingut en carbohidrats totals com el de carbohidrats extractables del sòl són dos paràmetres subjectes a la seva determinació analítica. Així s'entén per **carbohidrats totals (CHT)** el valor de monosacàrids totals (expressats com a glucosa) que s'obté de sotmetre al sòl a una hidròlisi de condicions dràstiques i per **carbohidrats extractables (CHE)** el valor de monosacàrids (expressats com a glucosa) obtinguts en una extracció amb el reactiu sulfat potàssic.

En el sòl trobem carbohidrats que provenen de les restes de les plantes i animals juntament amb els que són d'origen microbià. Els valors de contingut en carbohidrats totals dels sòls és molt variable i s'estima que representen entre 5-25 % de la MO (Lowe, 1978); relació que si la referim a fracció de C de carbohidrat sobre el C orgànic representa al voltant del 10 % d'aquest (3-17 %). El nivell de carbohidrats en el sòl depèn del contingut total de matèria orgànica i en conseqüència està influenciat per les aportacions i per la seva velocitat de descomposició. Tanmateix, els productes de degradació parcial de polisacàrids de plantes i microorganismes serveixen com a unitats estructurals de formació de nous polisacàrids que es troben en el sòl. A pesar de les incerteses sobre l'origen i turnover dels polisacàrids que es poden aïllar del sòl, d'acord a Stevenson (1982), la major part de polisacàrids en la majoria de sòls (a excepció de l'horitzó 0 de sòls forestals, de restes vegetals no descomposts) han estat sintetitzats pels microorganismes. La contribució dels exsudats de les plantes és poc important donat que són sucres simples i tenen vida curta en el sòl.

A part dels factors generals (pH, humitat, temperatura i aireació) que intervenen en la degradació de la MO del sòl, en el cas dels carbohidrats es creu que existeixen diferents factors que els fan resistents de manera que la seva dinàmica esdevé molt poc predictable (Lowe, 1978). Així se sap que l'estabilitat dels carbohidrats en el sòl depèn de factors com la seva complexitat estructural que els fa resistents a l'atac enzimàtic, la capacitat d'adsorció a argiles, la formació de sals insolubles o complexos

amb metalls i la possibilitat d'establir enllaç covalent amb substàncies húmiques (Stevenson, 1982).

Els monosacàrids identificats en els hidrolitzats són pràcticament els mateixos en diferents tipus de sòls analitzats. Només es detecten variacions en la proporció dels diferents monòmers. La D-glucosa és el sucre més abundant seguida d'altres hexoses D-galactosa i D-manosa i de les pentoses L-arabinosa i D-xilosa. En menor proporció es troben les metilpentoses (o desoxihexoses) L-ramnosa i L-fucosa i per últim la ribosa (també pentosa). També es poden trobar aminosucre (glucosamina i galactosamina i N-acetilglucosamina i N-acetilgalactosamina) i àcids urònics (glucurònic i galacturònic). S'ha de destacar que alguns dels sucres identificats no es troben en plantes superiors sinó que són constituents habituals de polisacàrids exocel·lulars dels microorganismes (Cheshire, 1979). D'acord amb el recull de dades d'anàlisi de carbohidrats d'unes 50 mostres de diferents sòls de tot el món que ens proporciona Cheshire (1979) veiem que el contingut oscil·la entre 1-20 mg de glucosa/g sòl (si traiem valors superiors més extrems) i que el contingut mitjà és de 7,7 mg de glucosa/g sòl. En la Taula 2.3 indiquem la composició qualitativa mitjana en carbohidrats i la seva proporció relativa. Observem que la relació entre glucosa i les altres dues hexoses és de l'ordre del doble i que la relació hexoses/pentoses s'acosta a 3.

Taula 2.3. Composició i proporció relativa mitjanes de monosacàrids en sòls d'acord a la recopilació de dades analítiques de carbohidrats en una col·lecció de 60 mostres de diferents tipus de sòls (Cheshire, 1979).

		Contingut (mg glucosa/g sòl)	Proporció (%)
Hexoses	Glucosa	2,8	35,4
	Manosa	1,2	17,1
	Galactosa	1,2	14,7
Pentoses	Arabinosa	0,9	11,9
	Xilosa	0,7	10,4
	Ribosa	0,1	1,5
Desoxihexoses	Ramnosa	0,5	5,9
	Fucosa	0,3	3,4
Total		7,7	

A través de l'estudi dels polisacàrids extrets del sòl es veu que n' existeix una gran varietat i complexitat (que contrasta amb el reduït nombre d'unitats), que es diferencien no només en la seva composició sinó també en el seu grau d'associació amb altres components no-carbohidratats.

La cel·lulosa és el biopolímer més abundant en les plantes ja que és el principal component estructural de les parets cel·lulars i també es troba en algues i fongs i rarament en bacteris (Szegi, 1988; Kögel-Knabner, 2002 i 2006). Les hemicel·luloses són el segon polisacàrid en abundància en els teixits vegetals i es troba amb íntima associació física amb cel·lulosa en les parets cel·lulars. Polisacàrids heterogenis, similars a la de les parets cel·lulars de les plantes, es troben també en bacteris, fongs i algues (Kögel-Knabner, 2002 i 2006). La paret cel·lular dels bacteris es compon de peptidoglucans, polímers de carbohidrats (les unitats són N-acetilglucosamina i N-acetilmuràmic) i pèptids que contenen a més a més dels 20 AA proteics d'altres poc usuals. Com a polímers extracel·lulars trobem els dextrans (glucosa enllaços 1-6 ,

ramificacions). A més a més els bacteris produeixen multitud d'altres components estructurals com àcids teicoics, teurònics i lipopolisacàrids. Les parets cel·lulars de fongs també són bàsicament homo i hetero polisacàrids i en alguns fongs la proporció de proteïna és elevada.

En sòls que tenen restes vegetals poc descompostos una part dels carbohidrats existeix com a cel·lulosa ja que és el principal constituent dels vegetals (15-60 % sms) seguida per hemicel·lulosa (10-30 % sms). Ara bé, també es creu que la majoria dels polisacàrids del sòl representen productes del metabolisme microbià ja que el perfil dels hidrolitzats s'assembla més als constituents estructurals dels microorganismes (Stevenson, 1982). Els carbohidrats d'origen microbià són polímers de diferents monosacàrids (6 o més) i productes derivats formant varietat d'estructures depenent de l'enllaç glucosídic (α o β , 1-4 o bé 1-6) i a més a més estan sovint lligats a proteïnes i lípids. Aquesta composició contrasta amb els polisacàrids de les plantes superiors i els animals que només contenen 2-3 tipus de monòmers

Tot i els intents de deducció de **l'origen dels carbohidrats** a partir de la relació entre monòmers (enfoc que no sempre és fiable per la relació que pot haver entre degradació/acumulació) existeixen encara moltes incerteses sobre l'origen i el turnover dels carbohidrats en el sòl. S'ha d'assumir que l'acumulació de carbohidrats en els sòls és resultat de diversitat de fonts i varietat de rutes metabòliques i que a més les condicions ambientals afecten en la predominança dels diferents processos. Encara que les plantes representen el major aport (restes en superfície, arrels, exsudats) també hem de tenir en compte la contribució dels microorganismes i els animals quan moren. Amb diferent origen i grau de persistència es troben barrejats: (1) components de les plantes que han resistit a la descomposició (2) els de síntesi microbiana a partir de material no-carbohidratat (3) transformació microbiana dels monòmers formats en el procés de degradació de restes vegetals (Lowe, 1978).

La descomposició bioquímica dels polisacàrids en el sòl s'inicia per acció enzimàtica de l'enllaç glucosídic. Els exoenzims ataquen la cadena per l'extrem no reductor i els endoenzims poden atacar l'enllaç en altres punts de la cadena. La despolimerització dona oligosacàrids i monosacàrids que seran posteriorment transformats/oxidats. Entre d'altres factors, la degradació dels polisacàrids ve condicionada per la seva composició i estructura ja que aquesta condiciona la susceptibilitat a l'acció dels enzims. Les característiques que dificulten l'acció dels enzims són: insolubilitat en aigua, estructura cristallina, les ramificacions, heterogeneïtat dels monòmers i presència de derivats de sucres (metil, alcohol, acetil). Un factor important que afecta a l'estabilitat/persistència dels polisacàrids en el sòl és la seva associació a d'altres compostos orgànics no-carbohidratats com substàncies fenòliques (tanins), proteïnes, lípids i substàncies húmiques, així com cal tenir en compte que també es poden trobar com a sals i complexos amb metalls (Fe, Al, Zn Cu). Finalment cal tenir present la protecció a la descomposició dels carbohidrats que exerceixen les argiles (Cheshire, 1979; Tate III, 1992). Aquests factors són els que cal tenir en compte per explicar que, si bé els monosacàrids i la majoria dels derivats dels polisacàrids d'origen vegetal o microbià, inclosa la cel·lulosa, són degradats en el sòl de manera relativament ràpida en condicions favorables, hi ha una considerable quantitat de polisacàrids que s'acumulen en el sòl (Lowe, 1978).

Els carbohidrats tenen influència en **propietats físiques, químiques i biològiques** del sòl. Els polisacàrids tenen un paper clau en l'estabilitat dels agregats, són font de nutrient i d'energia pels microorganismes i alhora també participen en el bescanvi

catiònic i proporcionen material de síntesi pels compostos húmics. El comportament químic dels carbohidrats deriva dels seus grups reactius: principalment hidroxils i, si n'hi ha, carboxil dels àcids urònics i amino dels aminosucre. En els polisacàrids l'abundància d'aquests grups i l'estructura lineal fa que puguin interactuar amb els metalls i els col·loides inorgànics. Poden establir diferents tipus d'enllaç amb les partícules minerals influint en l'estructura del sòl a través de l'estat d'agregació (formació i estabilitat dels agregats) que a la seva vegada afecta a les propietats d'aïreació, drenatge i infiltració. A més a més, el seu caràcter hidròfil fa que contribueixin directament a la capacitat de retenció d'aigua. La solubilitat i la capacitat d'adsorció i d'actuar de lligam dels polisacàrids depèn dels cicles de rehumitejar-assecat a la que es sotmet el sòl (Martin, 1971).

Des del punt de vista biològic la característica més important és el seu paper de substrat per a l'activitat de molts microorganismes. També estan clarament involucrats en la formació de l'humus a través de l'activitat microbiana, així per processos d'oxidació, condensació i polimerització amb AA i compostos fenòlics formen els polímers húmics. Altres efectes indirectes que tenen els carbohidrats a nivell de font de nutrient es donen a través de la seva contribució a l'increment de la capacitat de bescanvi catiònic i propietats quelants que mantenen elements en solució. Des del punt de vista ambiental estan relacionats amb la retenció de metalls pesants i indirectament com a font de substrat per l'activitat microbiana necessària per a la degradació de pesticides. Cal tenir present que l'addició de residus amb molta MO làbil, rics en carbohidrats pot donar lloc a períodes de condicions anaeròbiques per l'alt consum d'oxigen (Lowe, 1978).

L'estudi dels carbohidrats en el sòl es va fer inicialment de la fracció total amb anàlisi dels perfils de monosacàrids i posteriorment prengueren importància altres fraccions de compostos carbohidrats com la fracció extractable pel seu lligam amb la biomassa. Per altra banda, diferents fraccions analítiques de carbohidrats s'ha fet servir tant a l'hora d'estudiar el paper en l'estabilitat estructural com en estudis més recents que adopten la perspectiva de qualitat del sòl.

En un principi, els treballs sobre carbohidrats en el sòl varen tenir com a centre d'interès el seu **origen, distribució i la seva persistència** en aquest medi. Així trobem diversos estudis sobre l'origen dels carbohidrats amb proves d'incubació de sòl amb material vegetal i control dels carbohidrats, en les restes vegetals descomposades i en el sòl, al llarg del temps (Murayama et al., 1984; Cheshire et al., 1988; Miltner i Zech, 1998; Coelho et al., 1988). Donat el paper dels carbohidrats sobre l'estabilitat dels agregats alhora prengueren importància els estudis de la distribució dels carbohidrats entre les partícules de diferents grandàries en sòls agrícoles com a un dels efectes del conreu (Benzing-Purdie, 1980; Baldock et al., 1987; Dalal i Henry, 1988; Bowman et al., 1990). En general, aquests treballs detecten que el conreu implica pèrdua ràpida i important dels carbohidrats totals (CHT) com a fracció làbil de la MO i que la proporció CHT/C també disminueix; el cultiu implica pèrdua, especialment en la fracció lleugera i en la fracció d'arena i troben que la fracció de mida més petita resta enriquida en C i carbohidrats.

Posteriorment l'estudi dels carbohidrats del sòl va adquirir rellevància pel significat dels sucres soluble lliures com a **índex d'activitat microbiana**, per l'interès en trobar el valor de carboni disponible per a la biomassa (important en estudis d'immobilització de N en sòls agrícoles) i es va relacionar amb la nova metodologia de la determinació de la biomassa per fumigació-extracció. A partir d'aquest moment

trobem que adquireix especial atenció la determinació dels carbohidrats no totals sinó una fracció que podríem anomenar **carbohidrats solubles o extractables**. La tècnica de determinació de la biomassa per fumigació-extracció es pot complementar amb l'anàlisi de la composició dels extractes de K_2SO_4 0,5 M en mostres fumigades i no fumigades; així s'entén per substàncies antrona-reactives (ARC) els compostos de C (bàsicament carbohidrats) que reaccionen amb l'antrona extrets amb K_2SO_4 0,5 M i el valor d'ARC en mostres fumigades menys no fumigades representa les hexoses que s'alliberen de la lisi cel·lular (Badalucco et al., 1990, 1992). Posteriorment, DeLuca i Keeney (1993) consideren que els CHE del sòl, són el reflex dels associats a les restes vegetals i als que són alliberats de polisacàrids més complexos per l'activitat enzimàtica i són indicadors de C fàcilment disponible. Per la seva banda Joergensen et al. (1996) estudien la proporció de CHE respecte del carboni orgànic extraïble i troben que el % és molt variable i oscil·la entre 3-50 % amb un valor mitjà del 7,3 %.

A partir dels anys 90 trobem molts treballs sobre el paper dels carbohidrats en la **estabilització dels agregats** que estudien amb profunditat la distribució dels carbohidrats en les fraccions d'argila, llim i arena i en les diferents mides d'agregats en sòls agrícoles (Cheshire et al., 1990 ; Haynes i Swift, 1990; Haynes i Francis, 1993; Hu et al., 1995a i 1995b; Angers i Mehuys, 1990; Ball et al., 1996 i Puget et al., 1999).

En treballs més recents és fàcil trobar la determinació de carbohidrats en estudis de **qualitat del sòl** on sovint trobem treballs que analitzen com l'ús del sòl afecta a la composició de la matèria orgànica en carbohidrats (Guggenberger et al., 1994; Sanger et al., 1997). En aquests estudis sovint la determinació de carbohidrats apareix conjuntament amb paràmetres com el C-soluble. Sparling et al., 1998 i Ghani et al., 2003 estudien la idoneïtat dels carbohidrats solubles en aigua calenta com a paràmetre de qualitat en la comparació de diferents tipus d'ús del sòl conjuntament amb d'altres com el N mineralitzable, el C-soluble en aigua i en aigua calenta i el C i N de la biomassa microbiana. La dinàmica dels carbohidrats entre les diferents grandàries de partícula en el procés de conversió de sòls forestals en sòls de cultiu és estudiada per Jolivet et al. (2006) i demostren que els carbohidrats són sensibles als canvis d'ús i poden ser indicadors de canvis en la qualitat de la MO. Bongiovanni et al. (2006) comparen els efectes del cultiu davant d'un sòl natural i constaten una pèrdua en els macroagregats de C, de MO particulada i de carbohidrats solubles en aigua calenta i en àcid diluït. Spielvogel et al. (2007) estudien perturbacions de sòls forestals i comproven que el pool de sucres no cel·lulolítics és sensible a les alteracions junt amb el pool de lignina.

2.2.3 Activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa

El conjunt de les glicosidases del sòl són enzims que tenen un paper molt destacat en la descomposició dels compostos orgànics i actuen sobre els enllaços glicosídics en glicòsids, oligosacàrids i polisacàrids i carbohidrats complexos (Klose i Tabatabai, 2002). Les glucosidases (α i β) i galactosidases (α i β) són quatre enzims que tenen en comú que hidrolitzen l'enllaç glicosídic de l'extrem terminal no reductor i alliberen el monòmer corresponent α -D-glucosa, β -D-glucosa, α -D-galactosa o β -D-galactosa. Les glucosidases i galactosidases es troben àmpliament distribuïdes en la natura i s'han detectat en microorganismes, animals i plantes. En el sòl juguen un paper molt important en la degradació final dels carbohidrats i els monosacàrids resultants de les reaccions hidrolítiques constitueixen un aport d'energia important pels microorganismes del sòl (Tabatabai, 1982; Eivazi i Tabatabai, 1988). La β -

glucosidasa (GLC) (gentobiasa o cel.lobiasa) és l'enzim que catalitza la reacció limitant de la degradació microbiana de la cel·lulosa en glucosa i presenta una activitat predominant dins del grup de les glucosidases i galactosidases del sòl (Àlef i Nannipieri, 1995). La seva síntesi en molts organismes és induïda pels productes de degradació de la cel·lulosa (Turner et al., 2002). La β -glucosidasa s'ha estudiat des del punt de vista fitopatològic per l'efecte dels aglicons dels β -glucòsids fenòlics com a precursors de malalties en les plantes (Hayano i Katami, 1977; Hayano i Tubaki, 1985). La **β -galactosidasa (GAL)** té un paper similar a la β -glucosidasa però amb la diferència que no té un substrat majoritari; en aquest cas l'enzim intervé en la degradació de diferents homo/heteropolisacàrids no cel·lulòsics presents en els vegetals (com hemicel·luloses). En general però, els glucòsids que contenen galactosa formen part d'estructures polimèriques complexes (glucans, glicoproteïnes, proteoglicans, glucolípid...) de les membranes cel·lulars de microorganismes i també vegetals.

Pel que fa al rang de valors, tot i la variabilitat i les discrepàncies l'expressió dels resultats que hem pogut detectar, podem situar l'activitat β -glucosidasa entre 0,151-4,580 $\mu\text{mol pNF/g h}$ i l'activitat β -galactosidasa entre 0,057-0,201 $\mu\text{mol pNF/g h}$ (Jiménez i Bonmatí, 2003; Martínez-Iñigo et al., 2003).

En la mesura d'aquestes activitats els primers substrats assajats varen ser cel·lobiosa i α - o β - fenilglucòsids i α - o β fenilgalactòsids. Hayano (1973) va proposar un mètode acurat i simple de l'assaig enzimàtic a través de la quantificació del paranitrofenol i és el que més es fa servir en l'actualitat. El mètode va ser millorat posteriorment pels treballs de Tabatabai (1982) i Eivazi i Tabatabai (1988) alhora que s'estudien **proprietats generals** de les glucosidases i galactosidases en sòls.

En el treball de Eivazi i Tabatabai (1988) s'estudien les quatre activitats enzimàtiques α i β -glucosidases α i β - galactosidases en 10 sòls diferents amb un contingut en C d'entre 0,5-5,5 %. Respecte del rang de valors i la proporció entre les quatre glicosidases troben que la β -glucosidasa es presenta amb valors sempre més alts (0,2-2 $\mu\text{mol pNF/gh}$) i amb un rang també més ampli (valor màx/valor mín= 10). Les altres tres activitats presenten valors generalment bastant inferiors a la primera (entre 4 i 14 vegades). La validesa del mètode analític assajat queda patent en veure que, per a tots els sòls estudiats, els valors d'activitat mesurats segueixen el model de Michaelis-Menten. Els valors de K_M per a la β -glucosidasa són els més baixos i els més uniformes entre sòls, varien entre 1,3 i 2,4 mM. Per la β -galactosidasa varien entre 2,7 i 14,3 mM. Depenent del sòl els valors de V màxima varien per a les 4 glicosidases. (per β -glucosidasa entre 58-526 i per β -galactosidasa entre 48-85 $\mu\text{g pNF/g h}$ a 37 °C). La β -glucosidasa presenta una temperatura d'inactivació de 70 °C, més alta que les altres (60 °C), i els valors d'energia d'activació (mitjana 3 sòls) són per la β -glucosidasa de 30,8 i de 32,6 kJ/mol per a la β -galactosidasa.

Aquests primers valors de les propietats termodinàmiques són similars a les que més recentment recullen Trasar-Cepeda et al. (2007) en la determinació de paràmetres termodinàmics per enzims en sòls naturals. Concretament determinen els valors de E_a i Q_{10} entre 5-70 °C per oxidoreductases i hidrolases en tres tipus de sòls naturals de pastura amb valors de C d'entre 3,3-6,9 %. Per l'activitat β -glucosidasa troben valors de E_a 26,3-30,3 kJ/mol i el Q_{10} entre 1,58-1,30. També detecten que aquest enzim, a excepció de la resta d'hidrolases (que presenten màxim d'activitat a 57 °C) incrementa l'activitat fins a la temperatura màxima assajada de 70 °C. Els autors

expliquen aquest resultat com a reflex de la localització extracel·lular així com la forta estabilització per part dels components dels sòls.

Els primers estudis de la β -glucosidasa a partir de mesures d'activitat en extractes de sòl i la determinació de les propietats de l'enzim comparativament a l'aïllat de fongs i bacteris es deuen a Hayano i Katami (1977) i Hayano i Tubaki (1985). A partir dels seus estudis sobre les condicions d'extracció i de les propietats (especificitat de substrat i estabilitat en funció del pH) dedueixen que és un enzim extracel·lular que s'adsorbeix iònicament sobre les partícules del sòl i que pel tipus de propietats el seu origen són els fongs (tipus *mucoraceous*). Més recentment però, (a través de l'estudi del perfil PLFA) per cinc sòls tropicals amb diferents tipus d'ús Waldrop et al. (2000) troben alta correlació entre l'activitat β -glucosidasa i els bacteris Gram-negatius i no amb els fongs.

Les propietats de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa en sòls es coneixen, principalment, a través dels **treballs de dos grans grups d'autors** liderats per Tabatabai i per Dick. Aquests treballs tenen en comú que es centren en aquestes activitats (i més específicament en la β -glucosidasa) i que si bé en un principi tracten de la incidència de les pràctiques agrícoles sobre les activitats enzimàtiques posteriorment estudien l'activitat com a índex de qualitat del sòl.

En el primer grup d'autors trobem els treballs de Eivazi i Tabatabai (1990), Deng i Tabatabai (1996), Klose i Tabatabai (2002) que representen la continuació de treball inicial de Eivazi i Tabatabai (1988) sobre determinació i propietats de les glucosidases esmentat anteriorment.

Eivazi i Tabatabai (1990) estudien diferents propietats de les 4 glicosidases per 5 sòls agrícoles. Respecte del rang de valors i proporció trobats la β -glucosidasa és la de valors més alts seguida per la β -galactosidasa (entre 2 i 10 vegades inferiors) i α -galactosidasa i la que presenta menys activitat és la α -glucosidasa. Fan assaigs d'incubació afegint-hi diferents sals i metalls pesants per veure la possible inhibició d'aquest tipus d'enzim per efecte dels fertilitzants. Troben que les sals inhibeixen molt més les formes alfa que les beta i més les galactosidases que les glucosidases. Pel que fa als metalls la inhibició pels elements traça depèn del sòl. La β -glucosidasa és la que presenta menys percentatge d'inhibició. El percentatge d'inhibició de la β -glucosidasa per metalls oscil·la entre un 21 % pel Hg i 74 % amb el Mo; també sembla que els que més afecten l'activitat són: B, Co, Cu i Hg. Deng i Tabatabai (1996) estudien la incidència de diferents sistemes de pràctiques agrícoles sobre les 4 glicosidases i la cel·lulasa en mostres de sòls amb un contingut en C d'entre 1-3 % C. Obtenen valors i proporció de les activitats semblant a estudis anteriors i totes resulten molt correlacionades amb el C (la α -GLC la que menys). A més resulten molt correlacionades entre sí (especialment la α -glucosidasa i les galactosidases) i també presenten correlació amb la cel·lulasa (especialment la β -GLC i la α -GAL).

Respecte de les propietats d'aquestes activitats enzimàtiques en relació amb d'altres paràmetres del sòl i del tipus d'associació amb la MO és d'especial interès els resultats del treball de Klose i Tabatabai (2002). Els autors treballen amb una col·lecció de 10 sòls amb diversitat de valors de pH, C (1,2-4,4 %), N, textures i biomassa i estudien l'efecte de la fumigació de les mostres amb cloroform (d'acord amb el mètode *Cloroform Fumigation* (CF) proposat per aquests autors per diferenciar els components intra/extracel·lular) (veure apartat 2.1.3). Paral·lelament també estudien el comportament dels enzims purs aïllats de microorganismes. Els autors dedueixen que

les glicosidases GLC i GAL tenen associacions diferents; l'enzim GLC es presentaria en el sòl més estabilitzat o amb més capacitat per estabilitzar-se, en canvi l'activitat de l'enzim GAL seria més dependent d'un component intracel·lular.

En el segon grup d'autors, destaquem les experiències de Miller i Dick (1995) i de Bandick i Dick (1999) que són un referent en l'estudi d'aquestes activitats enzimàtiques com a paràmetres de qualitat i representen els antecedents de l'important treball de Knight i Dick (2004) on s'estudia l'activitat enzimàtica β -glucosidasa en exclusiva.

Miller i Dick (1995) plantegen si el sistema de rotació de cultiu, amb i sense incorporació d'adobat en verd, afecta tres activitats enzimàtiques (β -glucosidasa i dues amidohidrolases amidasa i L-asparaginasa). D'entre els tres enzims destaca la β -glucosidasa com l'enzim més sensible al sistema de cultiu i als canvis temporals de contingut en carboni; a més les diferències entre els dos sistemes de conreu es posen de manifest a través de la resistència dels enzims a l'estrès tèrmic. El sistema de cultiu amb incorporació d'adob verd té una activitat més alta durant tot el període controlat i presenta també més termoresistència (85-65 %).

Posteriorment en un estudi similar Bandick i Dick (1999) assagen 11 activitats enzimàtiques i la mesura de FDA amb l'objectiu d'estudiar la seva sensibilitat per discriminar diferents sistemes de cultiu i deduir la seva capacitat com a indicadors de qualitat del sòl. Obtenen valors de les 4 principals glicosidases i la β -glucosidasa destaca com a la dominant. Aquesta activitat resulta especialment sensible als tractaments agronòmics (aport de matèria vegetal) és més alta quant més alt és l'aportació de carboni amb la subseqüent estimulació de l'activitat microbiana. A més a més presenta una resposta més ràpida que d'altres paràmetres generals com el contingut en C.

Knight i Dick (2004) revisen les característiques de la β -glucosidasa estudiant la potencialitat que el valor de l'activitat, els seus components i les característiques cinètiques poden tenir com a indicadors de qualitat per a discriminar efectes del maneig agrícola. Concretament estudien sòls (entre 1-4 % de C) amb tres tipus de cultiu (blat, raygrass i forestal) davant els respectius sòls naturals. Per investigar el component estabilitzat de l'activitat fan servir la irradiació amb microones de mostres assecades (suposa reducció 80 % de la biomassa) mesurant l'activitat abans i després d'aquest tractament. Troben que aquest procediment és adequat per a valorar el component de l'activitat de la β -glucosidasa no associada a microorganismes; es basen en el que el C de biomassa està correlacionat amb el descens de l'activitat i en canvi no ho està amb l'activitat que queda. Aquests autors troben que el cultiu fa reduir en tots els casos l'activitat total i l'estabilitzada. L'efecte negatiu sobre l'activitat total és més gran quan el cultiu té caràcter poc intensiu, en canvi quan més intensiu és el cultiu, la pèrdua del component estabilitzat és la més acusada. La proporció d'activitat estabilitzada respecte de la total oscil·la entre 35-75 % en funció del sòl i del maneig al que s'ha sotmès. Com a conclusió proposen un mecanisme que explicaria la sensibilitat de la β -glucosidasa al maneig agrícola, basat no tant en l'existència de diferents isoenzims sinó en la quantitat d'enzim present i més acusada en el component enzimàtic estabilitzat que en l'associada a la població microbiana.

Secundàriament, també hem d'esmentar les propietats de la β -glucosidasa que s'han deduït a través de la mesura de l'activitat en extractes i de la preparació d'enzims immobilitzats així com de la determinació de l'activitat en diferents grandàries de partícula del sòl. Diferents autors han estudiat les propietats de la β -glucosidasa com

enzim estabilitzat (Batistic et al., 1980; Sakar i Burns, 1984; Sakar et al., 1989; Busto et al., 1997; Busto i Pérez-Mateos, 2000) i han deduït que es pot trobar l'enzim associat a complexos enzim-carbohidrat i enzim-humus. Respecte de les característiques de localització de l'activitat β -glucosidasa en el sòl els autors Busto i Pérez-Mateos (2000) dedueixen que la major part de l'activitat es troba en la grandària de partícula que correspon a la MO més humificada i que es pot diferenciar més d'un enzim o formes (isoenzim) que catalitzen la mateixa reacció. A més a més, pel diferent comportament davant el pH i les característiques cinètiques, es pot deduir que l'activitat extreta en les diferents fraccions és heterogènia és a dir que conté més d'un enzim o isoenzim amb diferent afinitat/selectivitat. Els autors interpreten aquesta característica com a estratègia del sòl per poder actuar en condicions de baixa/alta concentració de substrat.

Respecte de la **influència del pretractament** de les mostres de sòl sobre el valor d'aquestes activitats en els primers estudis (Eivazi i Tabatabai, 1990) s'afirma que l'assecat incrementa les activitats de les 4 glicosidases; la β -glucosidasa és la que més augmenta (entre 1,5 i 2 vegades) i la β -galactosidasa s'altera molt poc. Els autors ho atribueixen a que la rehidratació de la mostra assecada que té lloc durant l'assaig trenca els agregats i augmenta l'accessibilitat dels enzims pels substrats. En els treballs de Bandick i Dick (1999) també es determinen les activitats en les mostres humides i assecades i troben que ambdós pretractaments mantenen les diferències entre sòls en el cas de α i β -glucosidasa, amidasa, ureasa i FDA. En estudis de sòls naturals Zornoza et al. (2006) troben per mostres de sòls mediterranis que l'activitat de la β -glucosidasa no s'afecta per l'assecat i que els valors trobats en mostres assecades a l'aire són representatius dels valors de mostres de camp. Com a alternativa al pretractament assagen la rehidratació de mostres assecades a través d'incubació a 23 °C durant 12 dies; troben fluctuacions per l'efecte de la rehidratació que depenen de l'enzim i de la mostra però afirmen que la β -glucosidasa és la més estable durant la incubació i que els valors és corresponen amb els obtinguts amb mostres humides. En estudis de sòls afectats per contaminació, Hinojosa et al. (2004) també estudien la influència del pretractament (mostres humides i assecades-rehidratades). En aquest cas dels sis enzims mesurats tots presenten activitats superiors en mostres rehidratades, excepte la β -glucosidasa que no presenta diferència entre valors de mostres humides i rehidratades (21 °C i 7 dies). Es consideren vàlids aquests pretractaments i es destaca la potencialitat de la β -glucosidasa (activitat que forma part del principal factor discriminant junt amb arilsulfatasa i fosfatasa) com a indicador perquè a partir dels valors d'activitat amb les mostres rehidratades millora la discriminació entre mostres de sòls afectades en diferent grau per la contaminació per metalls pesants.

Pel que fa específicament a l'estudi de **sòls naturals** constatem que és molt freqüent incloure l'estudi d'aquestes activitats enzimàtiques com expliquem en la revisió bibliogràfica del capítol 3 de qualitat bioquímica de sòls naturals. Aquí només destaquem el treball de Turner et al. (2002) que considerem important com a base de dades ja que es centra exclusivament en l'activitat enzimàtica β -glucosidasa. En aquest treball s'estudia la relació de l'enzim β -glucosidasa amb propietats biològiques (C i N de la biomassa) i característiques generals (C, N orgànic, pH i textura) d'una col·lecció de 30 sòls d'ús semblant (de pastura amb 2-8 % de C) a Anglaterra i Gal·les. Els autors troben com a valor d'activitat mitjana 2,54 $\mu\text{mol pNF/gh}$ amb un coeficient de variació del 41 %. Per una banda troben correlacions de l'activitat amb paràmetres pròpiament microbiològics (C biomassa i C biomassa/C) la qual cosa

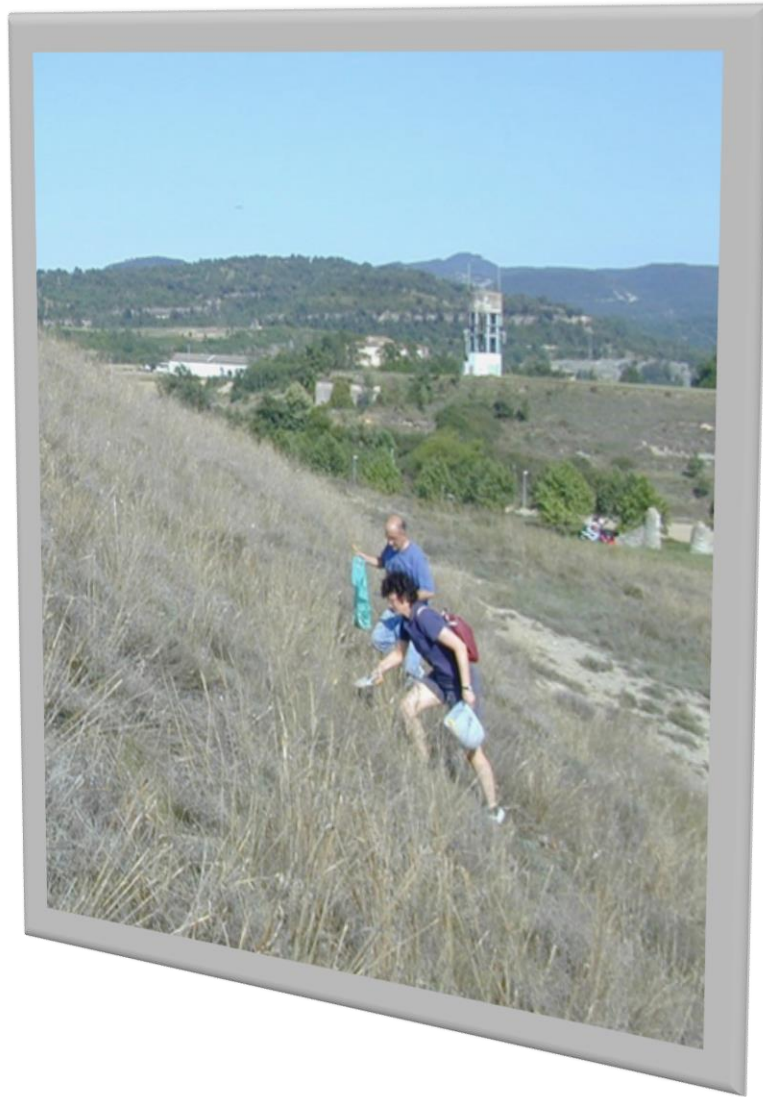
indicaria que el nivell d'activitat és un reflex de l'activitat microbiana que sintetitza aquest enzim davant la presència de substrat (per tant semblaria indicar que la contribució dels enzims extracel·lulars immobilitzats seria poc important). Per altra banda, però, la forta correlació trobada amb el percentatge d'argila pot indicar contràriament que l'activitat enzimàtica extracel·lular pot ser important donat el paper de l'argila com a estabilitzador dels enzims extracel·lulars. Els autors interpreten aquesta duplicitat de resultats suggerint que l'activitat β -glucosidasa pot ser una mesura integrada de l'activitat biològica i dels factors generals del sòl que la protegeixen com el contingut d'argila. D'aquí conclouen que té un fort potencial com a índex de qualitat en sòls.

Per altra banda a la bibliografia consultada també hem trobat moltes referències sobre el comportament de l'activitat β -glucosidasa, junt amb altres paràmetres, en diferents estudis d'ús del sòl en diversitat de situacions que podem agrupar sota el terme d'ús del sòl (*land use*) com els treballs de: Ajwa et al. (1999) Boerner et al. (2000) Monreal i Bergstrom (2000) Badiane et al. (2001) Acosta-Martínez et al. (2007) i Sotomayor-Ramírez et al. (2009). Del conjunt de resultats es pot dir que l'activitat β -glucosidasa resulta ser una l'activitat sensible a l'impacte del tipus de vegetació, al contingut en MO i amb capacitat per indicar diferències entre els tractaments estudiats.

Pel que fa a l'enzim **β -galactosidasa**, el conjunt de publicacions sobre qualitat del sòl posa de manifest que aquesta activitat es determina en sòls amb molta menys freqüència que la β -glucosidasa. Els resultats de la β -galactosidasa corresponen generalment a estudis on s'assagen o bé el conjunt de les 4 glicosidasas o bé un elevat nombre d'activitats enzimàtiques (Curci et al., 1997; Bandick i Dick, 1999; Ekenler i Tabatabai, 2003).

Dels resultats de Curci et al. (1997) podem destacar que les activitats β -galactosidasa i α -glucosidasa són les activitats que sembla que millor prediuen la població i l'activitat microbiana. En el treball de Martínez i Tabatabai (1997) es fan assaigs d'incubació in vitro de barreges de tres sòls amb 12 diferents subproductes provinents de processos biotecnològics industrials com a possibles esmenes orgàniques. A partir dels resultats de les activitats enzimàtiques en els subproductes i en les barreges sòl-subproducte podem deduir que l'activitat β -galactosidasa està més relacionada que la β -glucosidasa amb la presència de microorganismes.

Per altra banda, trobem treballs que relacionen la mesura de l'activitat β -galactosidasa, directament o bé indirecta, amb bioassaigs i per la seva sensibilitat amb la presència de contaminants en el sòl (Martínez-Íñigo et al., 2003 i 2009). Carbonell et al. (2000) determinen aquesta activitat en el sòl, com a indicador de la inhibició, per la presència de contaminants, de l'activitat microbiana del sòl; aquests autors es basen en què l'activitat d'aquest enzim ha estat proposada com a mesura de l'activitat microbiana indígena en sediments. Brohon et al. (2001) troben relació entre la presència en el sòl de metalls pesants, hidrocarburs i herbicides i la inhibició de l'activitat β -galactosidasa en el bioassaig utilitzat.



3

Paràmetres de Qualitat Bioquímica en Sòls Naturals de Catalunya

Foto: Presa de mostra a la Plana de Vic

3 PARÀMETRES DE QUALITAT BIOQUÍMICA EN SÒLS NATURALS DE CATALUNYA

3.1 ANTECEDENTS: L'ESTUDI DE LA QUALITAT BIOQUÍMICA EN SÒLS NATURALS

Tal com hem vist en la introducció general, l'estudi dels sòls naturals deriva de la perspectiva de la qualitat del sòl i té el doble interès de contribuir a la recerca bàsica sobre els paràmetres de qualitat i a la seva interpretació per a la consideració de sòls de referència. En general s'assumeix que els sòls naturals, com a sòls gens o poc pertorbats que es desenvolupen sota vegetació clímax i que gaudeixen d'un equilibri estable i sostenible amb les condicions ambientals, poden ser considerats com a sòls d'alta qualitat. A la vegada també s'assumeix que quan un sòl s'afecta per alguna pertorbació aquesta pot desviar l'ecosistema de l'estat d'equilibri cap a uns estats més regressius que queden expressats com a canvis en les seves propietats físiques químiques i biològiques determinants de la qualitat d'aquell sòl.

De cara a seleccionar i estructurar la informació del gran nombre d'articles científics sobre qualitat biològica/bioquímica en sòls naturals hem tingut presents les següents consideracions:

- a. Hem prioritzat els treballs que estudien les propietats en sòls naturals davant els que, amb altres objectius, inclouen el comportament dels sòls naturals com a referència comparativa.
- b. D'acord a la revisió bibliogràfica de Bastida et al. (2008c) sobre el component biològic de qualitat de sòls no agrícoles (veure l'apartat 2.1.2) destaquen dos països com a nuclis centrals en la recerca sobre aquest tema: Espanya i Itàlia.
- c. Part del nostre treball s'ha fet en col·laboració amb el *Grupo Español de Enzimología de Suelos*.

D'acord amb aquestes consideracions hem estructurat la revisió bibliogràfica en dues parts: l'estudi dels sòls naturals per part dels grups espanyols i la contribució dels grups italians.

3.1.1 La recerca d'autors espanyols

Per a la confecció dels antecedents sobre estudi de sòls naturals a nivell espanyol hem seleccionat els treballs que més s'apropen a l'enfocament de la tesi i per tant ens hem concentrat especialment en aquells que es fixen en el mateix tipus de paràmetres. Aquest criteri ens ha portat a comentar principalment els resultats dels grups que treballen a Galícia (Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galícia, IAG-CSIC i Facultad de Farmàcia, Universidad de Santiago de Compostela), a Alacant (Universidad Miguel Hernández, Elche) i a Múrcia (Centro d'Edafologia y Biología Aplicada del Segura, CEBAS-CSIC).

L'estudi de la qualitat de sòls naturals s'inicia amb els grups de Galícia i Múrcia fa més de 15 anys (García i Hernández, 2000). La diferència principal entre aquests dos nuclis és òbviament el tipus de sòls naturals estudiats. A Galícia l'estudi dels sòls naturals es centra en Umbrisols (alt contingut de MO), amb vegetació clímax de roureda atlàntica i clima humit. En canvi Múrcia compren un territori més heterogeni, amb molta

variabilitat en condicions climàtiques i de vegetació, sota clima mediterrani semiàrid (precipitació mitjana anual, 250-300 mm i T 16-18 °C) i amb zones amb risc de desertificació; en aquest cas es pren com a sòls òptims de referència sòls forestals de pins i alzina (que porten molts anys sense explotació o de programes de revegetació). En els estudis dels sòls gallecs es dóna més èmfasi als sòls naturals com a sòls de referència de màxima qualitat i es desenvolupa un índex de qualitat sense fixar valors de referència sinó com a expressió d'equilibri entre el conjunt de propietats existents en aquests sòls. Els estudis portats a terme a Múrcia prioritzen la utilitat dels índexs de qualitat (de tipus numèric i autointerpretable) per a reflectir l'estat de degradació. El grup d'Alacant s'incorpora posteriorment i té en comú amb el grup de Múrcia el tipus de sòls naturals i en canvi l'enfocament s'apropa més al del grup de Galícia.

A continuació presentem com a antecedents un resum dels principals estudis i resultats obtinguts per aquests tres grups elaborat a partir de les seves principals publicacions. Les característiques generals així com el que hem extret com a trets més singulars de cadascun d'ells queden resumides a la Taula 3.1 Val a dir que aquests autors també han fet una important aportació amb les revisions bibliogràfiques sobre la utilització d'aquests indicadors de qualitat així com les noves perspectives (Gil-Sotres et al., 2005; Bastida et al., 2008c; Zornoza et al., 2008b).

Taula 3.1. Característiques generals i singularitats dels treballs en sòls naturals dels diferents grups espanyols.

Galícia	<ul style="list-style-type: none"> • Proposta i aplicació d'un índex de qualitat a través del N • Confecció d'una àmplia base de dades • Contrast sòls naturals - diferent usos del sòl • Estudi de factors de variabilitat: horitzons i estacionals • Diversitat d'activitats enzimàtiques • Paràmetres termodinàmics • Importància de la metodologia analítica i de pretractament
Alacant	<ul style="list-style-type: none"> • Proposta de diferents índexs de qualitat a través del N i del C • Validació i aplicació d'aquests índexs • Incorporació del factor climàtic • Incorporació d'altres paràmetres: C-soluble • Importància dels pretractaments de la mostra
Múrcia	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterització de sòls de zones semiàrides • Estudi de l'abandonament de sòls agrícoles i de la pèrdua de vegetació • Proposta d'un índex de degradació sensible als diferents nivells • Influència de la vegetació • Variabilitat estacional • Incorporació d'altres paràmetres: C-soluble, carbohidrats, polifenols i substàncies húmiques

3.1.1.1 Estudis del grup de Galícia

En els estudis del grup de Galícia podem diferenciar tres fases. Primer treballen sobre la proposta d'un índex de qualitat a través del N orgànic; en treballs posteriors confeccionen una àmplia base de dades sobre característiques bioquímiques generals i específiques d'un gran nombre de mostres de sòls naturals i més recentment utilitzen aquestes dades de cara a l'estudi de la incidència de diferents usos de sòls (agrícoles, reforestats o bé afectats per contaminació) sobre la qualitat.

En els primers treballs (Trasar-Cepeda et al., 1998; Leirós, et al., 1999; Trasar-Cepeda et al., 2000b) s'estudien sòls naturals de tres zones climàtiques diferents, a dues profunditats i diferent estació de l'any i s'observa gran variabilitat; malgrat aquesta variabilitat les correlacions que presenten els paràmetres estudiats amb els continguts en C i/o N els hi permet proposar una equació algebraica que expressa la relació entre una selecció de variables bioquímiques i el contingut en N del sòl que explica el 97 % de la variància observada. Aquesta equació té l'expressió següent:

$$\text{Total N (\%)} = m \cdot \text{MBC} + n \cdot \text{N-mineralitzable} + f \cdot \text{FOSF} + g \cdot \text{GLC} + u \cdot \text{UR}$$

MBC (C de biomassa) en mg/kg i N-mineralizable en mg/kg

FOSF (fosfomonoesterasa), GLC (β -glucosidasa) i UR (ureasa) en μmol de producte alliberat per g i h
 $m=0,38 \cdot 10^{-3}$; $n= 1,4 \cdot 10^{-3}$; $f= 13,6 \cdot 10^{-3}$; $g=8,9 \cdot 10^{-3}$; $u=1,6 \cdot 10^{-3}$

(Trasar-Cepeda et al., 1998)

Aquesta relació resulta ser vàlida per dos horitzons (O i Ah) de sòls naturals de Galícia amb un contingut de C oscil·la entre 6-41 % en diferents condicions climàtiques i diferents èpoques de l'any. Els autors interpreten aquesta expressió com l'existència d'un balanç entre la MO d'aquests sòls d'alta qualitat i les seves propietats biològiques i bioquímiques. Proposen, doncs, el quocient $N_c \times 100/N_k$ (on N_c deriva de l'equació i N_k és el % N obtingut per l'anàlisi Kjeldhal) com a índex de qualitat amb la idea que un agent que causi alteració de la qualitat afectarà a aquest equilibri. La validesa de l'índex proposat es confirmada a través de la sensibilitat en altres tipus de sòls alterats (agrícoles, contaminats o degradats per explotació mines) on no es compleix aquest balanç i el N_c difereix de N real (N_k) i per tant l'índex és diferent de 100. Si és major de 100 vol dir que hi ha alta activitat biològica normalment associada a aplicació de fertilitzants o augment de coberta vegetal. La disminució de l'índex és indicatiu de descens en l'activitat per pèrdua de MO o bé per inhibició causada per contaminants.

En treballs publicats posteriorment (Trasar-Cepeda et al., 2000b; Leirós et al., 2000) es presenta un estudi molt exhaustiu de tota la regió (40 mostres) amb mostreig de dos horitzons (O i Ah) i a la tardor, perquè saben, per estudis previs, que és quan més s'acosta a la mitjana anual. Per una banda determinen propietats bioquímiques generals (C i N de biomassa microbiana, respiració, ATP, N mineralitzable i les activitats deshidrogenasa i catalasa i la capacitat d'amonificació d'arginina) i per una altra banda 9 activitats enzimàtiques característiques del cicle del C, N, P i S. El conjunt de dades (propietats físiques, químiques i bioquímiques generals i específiques) sumen 29 variables que analitzen a través de correlacions i d'anàlisi de components principals (ACP). Les correlacions que presenten suggereixen que el

número i l'activitat dels microorganismes estan directament relacionades amb la matèria orgànica i la disponibilitat de nutrients. També veuen que els dos horitzons tenen el mateix comportament bioquímic. Respecte de les activitats enzimàtiques, troben valors molt variables però similars als rangs indicats per bibliografia en sòls semblants d'altres regions i que estan molt correlacionades. Dedueixen cinc factors principals dels quals els tres més importants (76 % variància explicada) són: l'activitat microbiana i la seva dependència de la disponibilitat de nutrients, l'acumulació de MO i el procés de mineralització.

Dins d'aquest tipus d'estudi de confecció de base de dades podem incloure també els treballs dels mateixos autors sobre i) paràmetres termodinàmics (E_a i Q_{10}) de les nou activitats enzimàtiques que habitualment solen determinar (Trasar-Cepeda et al., 2007), i ii) propietats bioquímiques en sòls naturals de muntanya amb d'altres condicions ambientals com el clima mediterrani del sud de la península (Miralles et al., 2007).

Ja més recentment, i estudiant les activitats enzimàtiques com indicadors de qualitat del sòl, apliquen el coneixement dels sòls naturals estudiats per a la comparació amb d'altres usos dels sòls (Trasar-Cepeda et al., 2008a; Trasar-Cepeda et al., 2008b). Primer presenten la comparació amb 45 sòls agrícoles amb un sistema de rotació tradicional i troben per aquests, valors més baixos pels dos tipus de paràmetres (bioquímics generals-biomassa, respiració, N mineralitzat, catalasa i deshidrogenasa- i bioquímics específics on inclouen les activitats enzimàtiques) i pèrdua del grau de correlació entre ells i amb les propietats generals del sòl. Destaquen, però, que en els sòls agrícoles les activitats específiques tendeixen a presentar valors superiors. Proposen com a hipòtesi que en els sòls cultivats la MO es perd més ràpidament que els enzims la qual cosa provoca un increment relatiu de l'activitat enzimàtica de la MO; consideren que la MO més làbil és la que s'ha perdut i la que queda és la més estabilitzada. Aquesta hipòtesi està d'acord amb la pèrdua del grau de correlació observat (respecte als sòls naturals) entre diferents tipus de paràmetres i també amb els resultats i la interpretació dels factors de l'anàlisi per components principals. En els sòls naturals troben que existeix una gran agrupació de les propietats bioquímiques (generals i específiques) i així interpreten que hi ha un lligam entre la magnitud i l'activitat de la biomassa, la MO acumulada i la seva mineralització. Contràriament en els sòls agrícoles hi ha una dissociació d'aquestes propietats: per una banda hi ha la MO més estabilitzada i per una altra l'activitat microbiana. Aquesta dissociació suggereix que el sistema agrícola està pertorbat en tant en quant amb l'empobriment de MO làbil s'ha perdut la connexió entre els diferents cicles biogeoquímics i el paper de la MO com a substrat per l'activitat microbiana.

Posteriorment, en un estudi més ampli comparen 235 sòls que responen a diferents usos (vinya, cereal, prat, forestals) amb els mateixos 40 sòls naturals considerats de referència en estudis anteriors. Troben que, contràriament al que s'assumeix en general, l'ús del sòl no necessàriament comporta una disminució de les activitats si no que dependrà de l'enzim i de l'ús; troben valors que poden ser inferiors, iguals o fins i tot superiors als dels sòls naturals de referència. Les diferències observades es poden (a vegades) justificar a través de la incidència de la fertilització (la inorgànica provoca inhibició i l'orgànica estimulació). Degut a què l'ús del sòl porta implícit la pèrdua de MO, proposen estudiar l'efecte a través de la comparació de les activitats específiques i constaten que la pèrdua va acompanyada d'un increment en l'activitat per unitat de carboni. A més a més comproven que això també s'observa quan els sòls d'un mateix

ús s'agrupen per rangs de continguts de carboni contràriament al que passa en els sòls naturals on les activitats específiques són molt semblants en els diferents rangs de contingut en carboni (excepte per invertasa i arilsulfatasa). Aquest procés d'enriquiment de les activitats (no per totes, és important per les proteases, però per arilsulfatasa no es dona) és tant més gran quan més gran és la pèrdua de MO. D'acord amb les propietats biològiques determinades, els autors no creuen que aquest fenomen es pugui explicar a través d'una resposta d'acceleració del metabolisme com a conseqüència de l'estrès; creuen que es pot pensar que és degut a que els enzims poden estar més estabilitzats ja que el que es perd és MO làbil.

3.1.1.2 Estudis del grup d'Alacant

Els treballs del grup d'Alacant (Zornoza et al., 2007a; Zornoza et al., 2007b; Zornoza et al., 2008a) tenen un enfoc molt semblant als del grup anterior però en aquest cas constaten que sòls naturals amb característiques diferents presenten un equilibri diferent entre les seves propietats i això els obliga a treballar amb el desenvolupament de més d'un índex. Inicialment caracteritzen quatre sòls forestals (120 mostres) amb mínima acció antròpica amb l'objectiu d'aconseguir, a través del model de regressió lineal múltiple, una fórmula de combinació d'un conjunt de propietats físiques, químiques i bioquímiques per a les variables de predicció C, N i/o biomassa. Treballen amb carboni, carboni soluble en sulfat potàssic, biomassa, respiració i les activitats enzimàtiques fosfatasa, ureasa i β -glucosidasa. Per anàlisi de components principals, troben un factor (55 % de variabilitat explicada) constituït pel contingut de MO i la seva activitat metabòlica, que separa un sòl (l'Entisol) dels altres tres (tres Mollisols, amb valors superiors) i un segon factor (17 %) -que inclou la fracció làbil de C, el contingut en nutrients i l'activitat bioquímica- que no contribueix a la diferenciació de les 4 zones. Dedueixen dues expressions, una pel N (pels 3 Mollisols) i una altra pel C (per l'Entisol); l'equació del N és similar a la deduïda per Trasar-Cepeda et al. (1998) ja que fa servir les mateixes variables (en lloc de N mineralitzable inclou P assimilable i afegeix la capacitat de retenció d'aigua) i en l'equació del C només inclouen P assimilable i les activitats ureàsica i β -glucosidasa. Comproven que els dos índexs proposats són vàlids ja que permeten marcar diferències quan s'apliquen als sòls degradats de la zona.

Posteriorment segueixen l'estudi (desdoblant una zona en dos) considerant la influència de les condicions climàtiques. Quan inclouen les dades de precipitació i temperatures mitjanes (Pm i Tm) en les correlacions, constaten la seva importància i les incorporen com a variable explicativa; això és el que els hi permet trobar un sol índex, amb el contingut de C com a variable de predicció per tots cinc sòls. L'índex de qualitat (SQI) proposat és la diferència entre el contingut en C calculat a través del model (SOCc) i el C real trobat al laboratori (SOCa); el SOCc té dos variants de càlcul ja que s'adapta a les condicions climàtiques diferents i que inclou les variables següents: estabilitat dels agregats, capacitat de retenció d'aigua, conductivitat elèctrica, capacitat de bescanvi catiònic, fòsfor assimilable, fosfatasa, β -glucosidasa i ureasa. En un model l'índex de qualitat (SQI2) inclou tres activitats enzimàtiques junt amb paràmetres generals i pretén ser indicador de resposta sensible ràpida a l'agent d'alteració; en canvi l'altre model (SQI1) inclou també paràmetres físics i es formula com a indicador de degradació més severa que arriba a afectar a nivell d'estructura. Com a conclusió els autors verifiquen que existeix un balanç entre la MO i les diferents propietats físiques, químiques i bioquímiques en els sòls forestals del SE d'Espanya.

Finalment fan estudis de validació dels índexs proposats en sis zones forestals més i alhora fan la comprovació de la seva utilitat per posar de manifest els cultius com a causa d'alteració de qualitat. Inclouen mostres de sòls de terrenys cultivats i agrícoles abandonats de les mateixes zones. En aquests dos casos, els índexs prenen valors positius ($SQI > 0$, que vol dir valors de carboni orgànic experimentals inferiors als predits) sempre més acusat en els sòls cultivats. Interpreten la menor desviació de l'equilibri natural pels terrenys abandonats com a indicador de recuperació de la qualitat a causa de la protecció de la erosió per l'increment de la coberta vegetal deguda a la colonització d'espècies de l'entorn.

3.1.1.3 Estudi del grup de Múrcia

Respecte del grup de Múrcia hem de destacar els primers treballs (García et al., 1994; García i Hernández, 1997c) de caracterització bioquímica i microbiològica de sòls degradats per manca de vegetació (12 zones diferents; $C < 1\%$) i la seva posterior comparació amb sòls sense alterar que tenen entre 3 i 6 cops més MO (amb vegetació pròpia de la zona i o bé reforestats amb pins) que els hi permet formular una equació per predir el contingut en MO. Troben que són sòls pobres bioquímicament i microbiològicament ja que tots els valors són inferiors als bibliogràfics, que la baixa activitat biològica és més baixa quan més degradació hi ha i que en aquestes regions àrides amb baix contingut en MO, és també baixa la capacitat per a ser mineralitzada. A més a més també detecten: i) correlació negativa entre les propietats bioquímiques i la conductivitat elèctrica; ii) alta correlació entre les variables estudiades (enzimàtiques i microbiològics), fet que els hi permet afirmar que totes queden afectades per igual; iii) l'activitat deshidrogenasa resulta ser un bon indicador de l'activitat microbiològica, i iv) els dos enzims més afectats i més relacionats amb els canvis i pèrdua de la MO en el procés de degradació del sòl són β -glucosidasa i arilsulfatasa.

Paral·lelament aquest grup també estudia l'efecte de la pèrdua de vegetació en parcel·les experimentals -comparant amb un sòl natural a García et al., (1997b)- i l'efecte de l'abandonament de sòls agrícoles (entre 3-45 anys) prenent en aquest cas com a referència un sòl cultivat i un sòl natural (García et al., 1997a). En el primer cas comproven que la manca de vegetació significa al cap de 7 anys una davallada de qualitat biològica (baixen els valors de C i les seves fraccions, CH-solubles, biomassa i les activitats enzimàtiques) i el paràmetre que menys es veu afectat és la MO més humificada. Respecte de les activitats enzimàtiques, la proteolítica de BAA no s'afecta i GLC s'afecta molt clarament per l'absència de vegetació. L'estudi de correlacions els hi permet confirmar que en regions àrides sotmeses a pèrdua de vegetació els enzims es troben estabilitzats possiblement al complex húmic. Pel que fa al procés de recuperació d'un sol agrícola després del seu abandonament troben que, després de 15 anys, quan apareix vegetació espontània s'arriben a igualar els valors la MO i les seves fraccions als del sòl natural; contràriament les activitats enzimàtiques presenten un desequilibri ja que són superiors en els sòls abandonats que en el sòl natural (les oxidoreductases ho són des de l'inici i les hidrolases a l'augmentar el temps d'abandonament).

Posteriorment a García et al. (2002) amplien l'estudi de sòls amb risc de degradació a altres zones de clima mediterrani (Sierra Guadarrama, Madrid). En aquest cas estudien l'estat de degradació, atenent al percentatge de recobriment vegetal, en dos tipus de substrat (calcar i granític). La majoria dels paràmetres (C, C-soluble, CH-solubles, biomassa i activitat microbiana) experimenten una disminució d'acord amb la

del recobriment vegetal pels dos tipus de sòls. Les activitats enzimàtiques segueixen aquesta pauta en els sòls calcaris, però, en els sòls àcids, i especialment per les activitats relacionades amb el cicle del N (ureasa i BAA), té més influència el tipus de vegetació.

Treballs més recents d'aquest grup responen a la necessitat de trobar un índex de qualitat dels sòls que identifiqui el nivell de degradació. En el treball de Bastida et al. (2006) es consideren tres zones que permet diferenciar entre tres i quatre àrees amb diferent grau i tipus de vegetació de sòls agrícoles abandonats (>40 anys) i reforestats amb pins (aquests sòls forestals no són naturals però es consideren vàlids com a patró de comparació de la zona ja que tenen el nivell desitjat de qualitat per sòls d'aquesta regió i per tant se'ls hi assigna nivell nul de degradació). Els continguts de C, C-soluble i CH-solubles en aigua presenten una alta correlació amb paràmetres microbiològics i bioquímics. A més els autors troben que hi ha correspondència entre el grau de recobriment vegetal i les tres formes de C i també per biomassa i les activitats enzimàtiques, i que es presenten sempre valors superiors en els sòls forestals. Així consideren que els paràmetres resulten ser doncs, adients per desenvolupar l'índex ja que reflecteixen diferent grau de recobriment i contingut i activitat microbiana. Partint del total de 11 paràmetres seleccionen els cinc que componen el primer factor (que explica el 59 % de variabilitat) i amb ells desenvolupen una expressió matemàtica (anàlisi multivariant) del que anomenen *Microbiological Degradation Índex* MDI i la seva escala d'interpretació. L'expressió polinòmica és la següent:

Microbiological Degradation Índex (MDI)
$MDI = 0,89 \cdot DH + 0,86 \cdot WSCh + 0,84 \cdot UR + 0,75 \cdot WSC + 0,72 \cdot BR$
DH (deshidrogenasa), WSCh (carbohidrats solubles en aigua), UR (ureasa), WSC (Carboni soluble en aigua) i BR (respiració basal) són els valors de les variables normalitzades d'acord a l'equació $Y=1/(1+(x/x_0)^{-2,5})$. x és el valor de la variable i x0 pren el valor promig de R ² de les respectives corbes de normalització
Escala d'interpretació pel valor de MDI: < 0,65 molt alt 0,66-1,54 alt 1,55-3,08 baix > 3,09 nul

(Bastida et al., 2006)

En un altre treball Bastida et al. (2008a) analitzen la capacitat de resposta dels paràmetres bioquímics davant de tres factors condicionants (l'orientació, el recobriment i tipus de vegetació i la variabilitat estacional) de sòls naturals (amb valors de C: 0,3-1 %). Troben que la respiració basal i tres activitats enzimàtiques (β -glucosidasa, proteolítica de BAA i fosfatasa) són determinants en el factor que explica el 71 % de la variabilitat. La separació per orientació és clara i és la nord la que afavoreix més la biomassa i la seva activitat. El tipus de vegetació afecta molt les propietats bioquímiques i microbiològiques en la cara sud i en canvi en la nord depèn de l'estació o sigui que és més sensible als canvis estacionals.

En una visió global del treball de grups espanyols hem de tenir present també els estudis fet a les illes Canàries (Armas et al., 2007) amb sòls naturals volcànics (andisòls i aridisòls) afectats per desforestació. Els autors fan també una proposta d'índex de qualitat BQI (*Biological Quality Índex*) com a quocient entre els valors de C

experimental i el calculat a través de paràmetres bioquímics (C-soluble, respiració, i els enzims deshidrogenasa, β -glucosidasa i carboximetilcel·lulasa); en aquest cas també la distància al valor 1 resulta estar d'acord amb el nivell de degradació.

3.1.2 La recerca d'autors italians

Els autors italians centren l'estudi dels sòls naturals com a sòls de referència especialment en treballs sobre la incidència de les pràctiques agrícoles. Respecte dels paràmetres triats per aquests grups destaquen, a més a més dels que ja hem vist en l'apartat anterior, la incorporació de la hidròlisi de FDA i l'estudi amb més profunditat de les activitats enzimàtiques (l'activitat en extractes) i de la MO amb el fraccionament i la piròlisi. A més a més estudien el comportament de diferents índexs de qualitat (els simples i els basats en activitats enzimàtiques HC, MPI, BIF i EAN) que hem vist en l'apartat 2.1.3.

Ceccanti i Pezzarossa (1993), Masciandaro et al. (1998) i Masciandaro i Ceccanti (1999) estudien l'afectació de les propietats bioquímiques comparativament en sòls agrícoles i naturals de dues zones geogràficament allunyades (Pisa i Salamanca) però ambdues de clima mediterrani temperat. Troben que l'ús agrícola del sòl implica una davallada de la majoria dels paràmetres, però, no troben diferències entre els dos ecosistemes. També constaten que en el sòl agrícola el grau de correlació entre variables és inferior, d'on dedueixen que la pèrdua de la MO làbil afecta també a la dinàmica de la mineralització. És de destacar que si bé les activitats enzimàtiques en els sòls naturals són superiors, quan es calculen les activitats específiques resulten ser semblants; els autors constaten que els sòls, amb diferents usos, són capaços de preservar l'activitat dels complexos humus-Enzim i que aquests poden representar la base de la resiliència dels sòls. Per altra banda els paràmetres bioquímics informen sobre la recuperació de l'ecosistema ja que indiquen que els sòls agrícoles abandonats evolucionen cap a un sòl natural ja que amb el temps recuperen l'activitat metabòlica. Proposen el quocient activitat deshidrogenasa dividida pel contingut en C-soluble, ($MPI=DH/WSOC$, índex de potencial metabòlic) com el millor indicador d'aquesta recuperació.

En el mateix grup d'autors podem incloure l'estudi de Caravaca et al. (2002) on comparen també quatre tipus de sòls agrícoles amb un sòl natural adjacent. D'aquest estudi hem de ressaltar la utilització de l'índex de sensibilitat que defineixen d'acord a Biederbeck et al. (1998) com el quocient entre el valor de la propietat en el sòl natural i el valor en el sòl afectat. D'acord amb la comparació estadística d'aquests índexs, els més sensibles són les activitats deshidrogenasa, ureasa i fosfatasa (valors del quocient que oscil·len entre 6,4 i 4,3) davant de C i lees fraccions solubles i les activitats GLC i BAA (on pren valors entre 1,8 i 3,0).

Els treballs de Riffaldi et al. (1994), Saviozzi et al. (2001) i Riffaldi et al. (2002) tenen plantejaments semblants als anteriors però es centren en sòls italians i com a sòls no pertorbats de referència consideren un prat natural i també un sòl forestal. Troben que el cultiu intensiu suposa una important davallada de tots els paràmetres respecte als sòls naturals. Troben que el prat presenta valors més alts de qualitat que el bosc i ho atribueixen a que el forestal té menys incorporació de residus vegetals. Els paràmetres més responsables en posar de manifest l'efecte del cultiu i que diferencien millor alhora també els dos sistemes no pertorbats resulten ser: respiració, C, CH solubles en aigua, proteasa i GLC, i entre els diferents índexs calculats destaca la sensibilitat del coeficient hidrolític (HC) basat en la mesura de la hidròlisi de FDA

proposat per Perucci (1992). Com hem vist en l'apartat 2.1.3 també és significatiu el treball de Puglisi et al. (2006) on els autors dedueixen tres índexs de qualitat basats únicament en activitats enzimàtiques però en aquest cas la comparació dels sòls pertorbats es fa amb un sòl adjacent no afectat, no amb un sòl natural

3.2 OBJECTIUS

Els objectius específics d'aquest capítol deriven de l'**objectiu general A** (Capítol 1) i són:

- 1r. Obtenir resultats sobre els paràmetres bioquímics carbohidrats totals i carbohidrats extractables i de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa en sòls naturals de Catalunya en anys diferents.
- 2n. Estudiar el comportament dels paràmetres bioquímics anteriors com a diferenciadors dels sòls naturals.
- 3r. Relacionar els resultats entre si, amb d'altres paràmetres bioquímics i amb les característiques físic-químiques i de localització d'aquests sòls.
- 4t. Avaluar la influència del pretractament d'assecat de les mostres de sòl (mostra humida *versus* mostra assecada a l'aire) en la determinació de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa del sòl.

3.3 MATERIAL I MÈTODES

L'experiència que correspon a aquest capítol forma part d'una de les activitats de recerca del *Grupo Español de Enzimologia de Suelos*, grup format per sis equips de treball d'Universitats i Centres de Recerca a nivell d'Espanya. Aquest projecte té per objectiu constituir una base de dades sobre paràmetres bioquímics de sòls naturals de diferents llocs de la Península Ibèrica utilitzant metodologia analítica prèviament estandarditzada pel grup (García et al., 2003). L'experiència es va portar a terme simultàniament durant tres anys i en cadascuna de les sis àrees corresponents al subgrups de treball espanyols: Múrcia, Galícia, Madrid, Burgos, València i Catalunya. Els paràmetres generals dels sòls van ser determinats conjuntament els diferents grups de treball i cada grup, amb les mostres de la seva zona, va analitzar pels paràmetres bioquímics prèviament acordats.

3.3.1 Disseny experimental

Aquesta experiència va consistir en el mostreig, durant tres anys consecutius, de sòls de 10 perfils representatius de Catalunya que poguessin ser considerats com a sòls naturals per la seva mínima acció antròpica (el terme sòl natural equival a sòl poc pertorbat). El mostreig es va realitzar a la primavera dels anys 2004, 2005 i 2006. El criteri seguit per la selecció dels 10 sòls naturals de Catalunya va ser abastar (amb els condicionants del nombre de mostres i de temps) la variabilitat litològica, climàtica i de vegetació del territori. Es va buscar una proporció entre sòls carbonatats i no carbonatats que fos reflex de les condicions reals de la coberta edàfica catalana. Respecte de la vegetació ens vàrem centrar en sòls naturals amb vegetació autòctona o bé tan a prop com fos possible de la vegetació potencial (on no havia hagut influència antròpica durant cert nombre de dècades).

Les deu localitzacions triades per fer el mostreig varen ser: Serra Litoral (LT), Serra del Corredor (CR), Serra del Montnegre (MN), Plana de Vic (VC), Serra de l'Ordal (OR), Conca d'Òdena a Igualada (IG), La Panadella (PN), Serres dels Camps a Balaguer (BL), Serra de la Picarda a La Granja d'Escarp (LG) i la plana al·luvial del

Segre (SG). Les característiques principals de les deu zones mostrejades es resumeixen en la Taula 3.2 numerades seguint l'ordre en que vàrem efectuar la presa de mostra. En la Figura 3.1 podem veure la seva distribució geogràfica. La presa de mostra es va fer de l'horitzó superior del perfil (0-10 cm), agafant una mostra composta d'unes 20-25 submostres (entre 4-5 kg) en una àrea aproximada d'uns 100 m².

Taula 3.2. Identificació de les mostres i localització de les zones de mostreig.

Número de mostra	Nom de la mostra	Llegenda	Localització	Coordenades UTM	Altitud (m,s.n.m)
1	Litoral	LT	Serra del Litoral	0438318N 4595988E	200
2	Corredor	CR	Serra del Corredor	0468852N 4613285E	600
3	Montnegre	MN	Serra del Montnegre	0469095N 4614800E	400
4	Vic	VC	Plana de Vic	0441966N 4447214E	460
5	Ordal	OR	Serra de L'Ordal	0402038N 4582681E	385
6	Igualada	IG	Conca d'Òdena Igualada	0388992N 4603432E	321
7	Panadella	PN	La Panadella	0367168N 4606839E	773
8	Balaguer	BL	Serra dels Camps Balaguer	0321063N 4629917E	259
9	La Granja	LG	Serra de la Picarda La Granja d'Escarp	0279887N 4588362E	177
10	Segre	SG	Segre, plana al·luvial	0281854N 4590988E	90

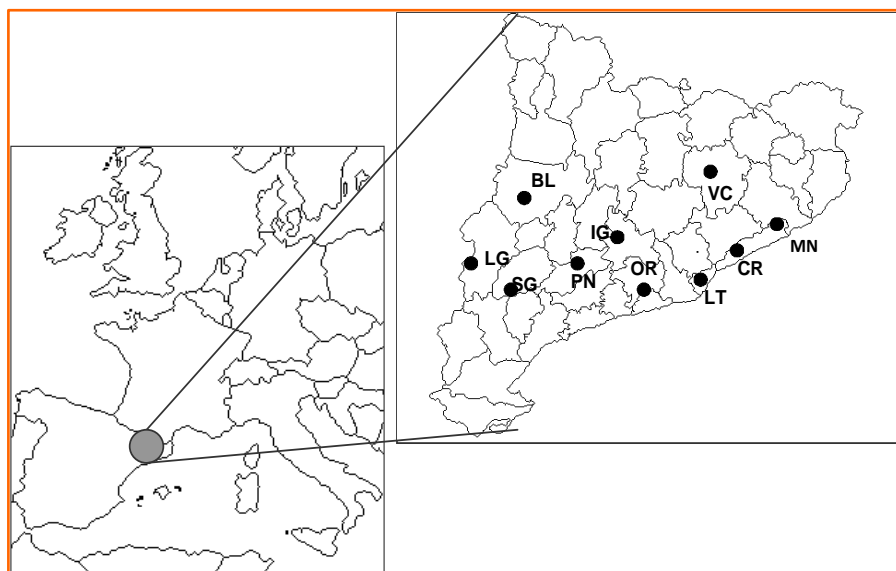


Figura 3.1 Distribució geogràfica de les 10 zones de mostreig dels sòls naturals.

3.3.2 Materials

3.3.2.1 Característiques de camp i dades climàtiques

En la Taula 3.3 resumim les característiques de camp de les 10 zones d'on provenen les mostres.

Taula 3.3. Característiques generals de les zones de mostreig.

Número	Llegenda	Localització	Roca mare	Tipus de sòl *	Tipus de habitat**	Tipus d'ús	Pendent mitjana (%)
1	LT	Litoral	Granodiorita	Cambisol	MF Qi	forestal	33
2	CR	Corredor	Pissarres	Ràncer	MF Qs	forestal	65
3	MN	Montnegre	Granodiorita	Ràncer	MF Qs	forestal	55
4	VC	Vic	Margues	Cambisol	AG	prat	37
5	OR	Ordal	Calcari	Luvisol	MF Pf	forestal	9
6	IG	Igalada	Margues	Cambisol	DG	agrícola abandonat	7
7	PN	Panadella	Calcari	Xerosol	MF Qi	forestal	10
8	BL	Balaguer	Guix	Xerosol	RGa	prat	27
9	LG	La Granja	Margues	Cambisol	DG	estepa	25
10	SG	Segre	Dipòsit al·luvial	Fluvisol	RP	forestal	0

* Classificació FAO-UNESCO (1974) (HNPC, 1985)

** MF: Bosc Mediterrani; Qi: Alzinars de terra baixa; Qs: Suredes; AG: Joncetes (prats submediterranis); Pf: Pinedes de pi blanc; DG: Prats basòfils secs de terra baixa/muntanya mitjana; RGa: Brolles dominades per romaní; RP: Alberedes i altres boscos de ribera mediterranis. European Biodiversity CHM (2005).

Del conjunt de característiques veiem que podem agrupar els 10 sòls en 2 subgrups: els tres primers sobre roca mare no carbonatada (Litoral, que és sòl de pissarres i, Montnegre i Corredor, que són de granodiorita) i els altres set sobre roca mare carbonatada. D'entre els darrers diferenciem: Ordal i Panadella sòls descarbonatats sobre calcàries; Vic i Igualada sobre margues blaves, Balaguer amb guix, La Granja amb sals solubles i la mostra del Segre amb característiques al·luvials. Respecte de l'habitat tant les zones de bosc com les zones de cultiu abandonat estaven distribuïdes en un paisatge en mosaic. Els sòls eren no alterats o bé molt poc alterats i corresponien a sòls forestals, terrenys agrícoles abandonats i prats secs. Pel que fa a la variabilitat climàtica hi han quedat incloses les àrees més càlides i seques i excloses les àrees més humides i fredes de Catalunya.

Atenent a la divisió climàtica de Catalunya segons els criteris termopluriomètrics tenim 6 mostres dins el clima tipus Mediterrani Continental (la mostra de Vic amb el sub-tipus Humit i les mostres d'Igalada, Panadella, Balaguer, La Granja i Segre amb sub-tipus Sec) i 4 mostres dins el tipus Mediterrani Litoral (el sub-tipus Sud per Ordal i el Central per Litoral, Montnegre i Corredor) (Martí-Vide, 1992).

En la Figura 3.2 es resumeixen les característiques climàtiques de les 10 zones d'on procedeixen les mostres dels períodes de primavera (abril, maig i juny) dels anys

2004, 2005 i 2006, així com les mitjanes anuals. La variabilitat climàtica interanual en els tres mesos de primavera indica un progressiu descens de la precipitació acumulada durant els tres anys de mostreig. Podem destacar especialment l'any 2004 per una pluviositat més alta i temperatura mitjana inferior en el registre de primavera. Respecte de comportament global anual es diferencia el darrer any de mostreig com el més càlid i especialment sec.

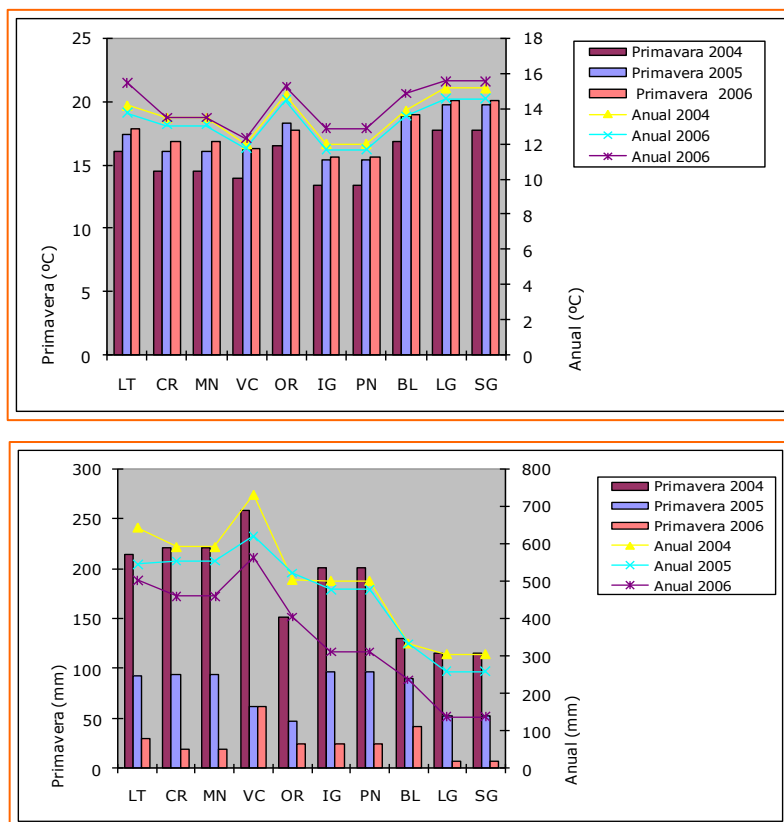


Figura 3.2 Temperatura mitjana i precipitació (pels períodes de primavera i anual) en les 10 localitzacions estudiades en els tres anys de mostreig.

3.3.2.2 Característiques físico-químiques

En les taules 3.4 i 3.5 resumim els valors dels principals paràmetres de caracterització general de les 10 mostres de sòl pels tres anys de mostreig.

Taula 3.4. Paràmetres generals de les 10 mostres de sòls (any 2004).

Mostra	Elements Grollers %	Terra Fina %	Textura (USDA) (%)			Classe textural	CaCO ₃
			sorra	l·lim	argila		g 100 g ⁻¹
LT	34	65	85,8	5,7	8,5	areno-franca	—
CR	72	28	37,7	38,9	23,3	franca	—
MN	59	41	63,9	21,7	14,4	franco-arenosa	—
VC	33	67	48,5	28,1	23,4	franca	37
OR	58	42	3,7	34,0	62,3	argilosa	< 0,3
IG	25	75	28,6	33,6	37,8	franco-argilosa	64
PN	18	82	45,2	19,9	34,9	franco-argilo-	<0,3
BL	40	60	60,1	33,2	6,6	franco-arenosa	12
LG	29	71	36,4	29,9	33,7	franco-argilosa	35
SG	0	100	72,2	15,5	12,4	franco-arenosa	33

La metodologia emprada en aquestes determinacions va ser l'habitual en cadascun dels centres participants en el projecte. Aquests paràmetres es van determinar a partir de la fracció de terra fina assecada a l'aire a excepció dels continguts en carbonats i N orgànic que van ser determinats en mostra molturada amb el molí d'àgata. La humitat de les mostres de camp i la de la terra fina assecada a l'aire (humitat higroscòpica) es va mesurar gravimètricament (105 °C 24 hores; a excepció de la mostra de Balaguer que degut al seu contingut en guix es va haver de fer a 60 °C fins a pes constant). Per la textura es va seguir el mètode Bouyoucos (Gee i Bauder, 1986) un cop dispersada la mostra i per la determinació del contingut en carbonats es va fer servir l'analitzador TOC-V-Series SSM 5000A de SHIMADZU. La conductivitat elèctrica es va mesurar en l'extracte aquós 1/5 i els pH real i potencial en la suspensió 1/2,5 amb aigua i KCl 1 M respectivament. Pel contingut en N orgànic es va seguir mètode Kjeldhal (Stevenson, 1982) i els valors de matèria orgànica (MO) s'han calculat multiplicant pel factor 1,724 el contingut en carboni oxidable determinat segons el mètode Walkley-Black aplicant el factor de recuperació 1,30 (Nelson i Sommers, 1982; España, 1993). Pel que fa altres elements assimilables el contingut en òxids de ferro i alumini es va fer mitjançant una extracció amb tampó pH=3 oxàlic/oxalat 0,2 M (McKeague i Day, 1965) i posterior quantificació per absorció atòmica i pel fòsfor Olsen i per calci, magnesi, sodi i potassi d'acord als mètodes oficials del Ministeri (Espanya, 1993).

Els valors dels paràmetres generals estan d'acord amb les característiques dels sòls ja descrites; així podem agrupar les tres primeres mostres (Litoral, Montnegre i Corredor) dins els sòls àcids, no carbonatats i d'entre la resta de sòls carbonatats diferenciem les mostres de Ordal i Panadella com a descarbonatades. La majoria de mostres tenen una textura franca i situen en els extrems les mostres de Litoral per l'alta proporció de sorra i la mostra de Ordal per l'alta proporció d'argila. Els alts valors de conductivitat elèctrica confirmen les característiques particulars de les mostres de Balaguer i La Granja, riques en guix i sals solubles respectivament. També podem veure que els valors més alts de contingut de MO, Nitrogen orgànic i fracció de nutrients assimilables (P, Fe, Al i Mg) corresponen en general a les mostres de Panadella i Corredor i/o Montnegre i els més baixos a les mostres de Balaguer i La Granja. Aquesta tendència s'inverteix pel cas del contingut en calci d'acord amb les característiques de la roca mare d'on provenen les mostres.

La variabilitat interanual pels paràmetres generals dins de cada mostra es presenta en la Taula 3.6 De la comparació del conjunt de coeficients de variació (CV) interanuals per a cada mostra podem veure que la mostra de Panadella manté valors més constants (presenta en conjunt CV inferiors) la qual cosa es pot atribuir a les seves especials característiques d'horitzó orgànic, morfològicament més diferenciat i per tant més fàcilment diferenciable en camp. També podem assenyalar que els pHs són els paràmetres que es mantenen més estables amb el temps, que la conductivitat elèctrica i el contingut en sodi són els més fluctuants i que la resta de paràmetres es situen en una posició intermèdia.

Taula 3.5. Paràmetres generals de les 10 mostres de sòls per a cada any de mostreig.

Sòl	Any	Humitat	Humitat	C.E	pH		Nitrogen orgànic	Matèria orgànica	Elements assimilables						
		camp	mostra seca	1:5	1:2,5				Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	P	Ca	Mg	Na	K
		g 100g ⁻¹	g 100g ⁻¹	dS m ⁻¹	H ₂ O	KCl			g 100 g ⁻¹	g 100g ⁻¹	g 100 g ⁻¹	mg Kg ⁻¹	cmol càrrega Kg ⁻¹		
LT	2004	8,3	0,7	0,051	.	.	0,16	2,9	0,08	0,08	10	6,9	1,5	0,1	0,3
	2005	8,2	1,6	0,059	6,10	4,95	0,21	5,1	0,09	0,09	7	10,2	2,2	0,1	0,3
	2006	3,1	2,1	0,064	6,95	5,49	0,16	5,3	0,11	0,10	11	8,0	2,1	0,1	0,4
CR	2004	12,8	2,8	0,097	.	.	0,29	11,1	0,47	0,37	16	13,6	4,1	0,3	0,8
	2005	14,2	4,8	0,067	5,64	4,10	0,39	10,1	.	0,33	11	15,2	5,2	0,2	0,6
	2006	8,2	4,6	0,129	6,46	4,96	0,37	10,7	0,48	0,33	17	12,0	3,9	0,2	1,0
MN	2004	7,4	2,0	0,083	.	.	0,29	9,8	0,13	0,17	14	13,5	2,9	0,1	0,5
	2005	21,3	3,1	0,059	5,69	4,46	0,36	11,7	0,11	0,19	17	14,8	3,4	0,1	0,4
	2006	6,0	4,2	0,092	6,44	5,21	0,54	12,5	0,14	0,16	35	14,4	3,6	0,2	0,7
VC	2004	5,6	1,5	0,127	.	.	0,26	8,0	0,06	0,14	11	22,5	0,7	n.d	0,3
	2005	6,0	2,4	0,127	8,08	7,47	0,35	6,2	0,05	0,14	10	23,9	0,8	n.d	0,3
	2006	6,2	2,0	0,163	8,49	7,51	0,32	7,2	0,06	0,12	10	18,4	0,9	0,1	0,3
OR	2004	11,0	3,1	0,127	.	.	0,21	7,5	0,22	0,43	9	38,8	1,7	n.d	1,1
	2005	11,9	7,2	0,135	7,97	6,94	0,27	9,2	0,17	0,41	7	35,2	1,9	0,1	0,8
	2006	8,6	6,5	0,191	8,01	7,00	0,35	13,5	0,21	0,45	6	32,1	2,5	0,1	1,0
IG	2004	5,7	1,2	0,128	.	.	0,24	2,9	0,05	0,09	12	22,5	1,2	n.d	0,6
	2005	5,2	3,4	0,114	8,36	7,58	0,21	3,0	0,05	0,09	12	23,3	1,4	n.d	0,5
	2006	2,5	2,4	0,159	8,49	7,51	0,17	4,0	0,07	0,08	18	18,7	1,3	0,1	0,5
PN	2004	16,7	4,2	0,179	.	.	0,48	16,1	0,18	0,28	17	41,7	2,4	0,1	0,7
	2005	19,4	9,1	0,203	7,50	6,75	0,64	20,6	0,18	0,24	30	46,8	2,8	0,1	0,7
	2006	16,2	7,9	0,243	7,81	6,91	0,94	18,5	0,18	0,24	22	35,5	3,3	0,1	0,7
BL	2004	0,5	0,5	2,205	.	.	0,10	1,1	0,07	0,02	3	.	0,5	n.d	0,1
	2005	1,0	0,5	2,112	7,83	7,53	0,18	2,3	0,06	0,04	2	68,3	0,2	n.d	0,2
	2006	0,5	0,7	2,000	8,14	7,65	0,11	2,1	0,09	0,04	0	72,6	0,4	n.d	0,2
LG	2004	2,5	1,1	1,970	.	.	0,13	1,3	0,04	0,04	4	.	0,3	n.d	0,2
	2005	1,1	1,4	1,672	7,97	7,65	0,13	1,2	0,05	0,03	5	43,1	0,5	n.d	0,2
	2006	1,2	1,4	1,377	8,38	7,80	0,08	1,5	0,06	0,05	4	21,0	1,0	0,1	0,2
SG	2004	7,5	1,0	0,164	.	.	0,21	3,8	0,14	0,05	18	17,6	2,2	0,3	0,7
	2005	0,8	0,9	0,097	8,47	7,84	0,15	1,8	0,10	0,04	17	13,8	1,1	n.d	0,3
	2006	0,9	1,0	0,121	8,63	7,83	0,11	3,1	0,13	0,04	19	14,1	1,3	0,1	0,3

C.E, conductivitat elèctrica

Taula 3.6. Variabilitat interanual dels paràmetres generals per a cada mostra (mitjana de 3 anys, excepte pH mitjana de 2 anys).

Sòl		Humitat	C.E 1:5	pH 1:2,5		N org.	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	P	Ca	Mg	Na	K
		g 100 g ⁻¹	dS m ⁻¹	H ₂ O	KCl	g 100 g ⁻¹	g 100 g ⁻¹	mg Kg ⁻¹	cmolcàrrega Kg ⁻¹				
LT	mitjana	6,53	0,06	6,53	5,22	0,18	0,09	0,09	9,33	8,35	1,93	0,07	0,31
	d.e	2,97	0,01	0,60	0,38	0,03	0,02	0,01	2,08	1,71	0,38	0,01	0,07
	CV	45,48	11,31	9,21	7,31	16,34	17,54	12,87	22,30	20,44	19,44	8,66	20,77
CR	mitjana	11,73	0,10	6,07	4,53	0,35	0,48	0,34	14,67	13,60	4,37	0,23	0,78
	d.e	3,13	0,03	0,58	0,61	0,05	0,01	0,02	3,21	1,64	0,69	0,07	0,21
	CV	26,70	31,75	9,58	13,42	15,12	1,64	6,07	21,92	12,02	15,74	30,10	26,49
MN	mitjana	11,56	0,08	6,07	4,84	0,40	0,13	0,18	22,00	14,25	3,28	0,15	0,55
	d.e	8,47	0,02	0,53	0,53	0,13	0,02	0,02	11,36	0,66	0,34	0,03	0,17
	CV	73,27	21,87	8,74	10,97	32,51	11,89	8,84	51,63	4,66	10,37	20,96	31,54
VC	mitjana	5,90	0,14	8,29	7,49	0,31	0,06	0,13	10,33	21,60	0,81	0,03	0,34
	d.e	0,30	0,02	0,29	0,03	0,05	0,01	0,01	0,58	2,88	0,10	0,03	0,01
	CV	5,11	14,95	3,50	0,38	14,78	12,30	10,08	5,59	13,34	12,42	88,19	1,71
OR	mitjana	10,49	0,15	7,99	6,97	0,28	0,20	0,43	7,33	35,33	2,03	0,07	0,96
	d.e	1,69	0,03	0,03	0,04	0,07	0,03	0,02	1,53	3,33	0,41	0,05	0,14
	CV	16,12	23,09	0,35	0,61	25,39	13,09	4,31	20,83	9,44	20,26	69,98	14,42
IG	mitjana	4,43	0,13	8,43	7,55	0,21	0,06	0,09	14,00	21,52	1,32	0,05	0,56
	d.e	1,73	0,02	0,09	0,05	0,04	0,01	0,01	3,46	2,43	0,09	0,03	0,06
	CV	39,12	17,23	1,09	0,66	16,99	13,47	9,26	24,74	11,29	6,73	53,93	11,41
PN	mitjana	17,42	0,21	7,66	6,83	0,69	0,18	0,25	23,00	41,35	2,83	0,09	0,67
	d.e	1,76	0,03	0,22	0,11	0,23	0,00	0,02	6,56	5,66	0,49	0,04	0,01
	CV	10,08	15,52	2,86	1,66	34,01	1,78	7,16	28,51	13,69	17,33	40,06	1,73
BL	mitjana	0,82	2,11	7,99	7,59	0,13	0,07	0,04	2,00	70,42	0,39	0,04	0,17
	d.e	0,32	0,10	0,22	0,08	0,04	0,02	0,01	1,00	3,01	0,15	0,01	0,05
	CV	38,75	4,87	2,75	1,12	33,53	20,78	34,76	50,00	4,28	38,16	31,49	26,96
LG	mitjana	1,60	1,67	8,09	7,73	0,11	0,05	0,04	4,33	32,05	0,59	0,05	0,18
	d.e	0,80	0,30	0,42	0,11	0,03	0,01	0,01	0,58	15,63	0,34	0,03	0,01
	CV	50,15	17,72	5,16	1,37	25,47	26,92	20,53	13,32	48,79	57,83	53,93	5,56
SG	mitjana	3,07	0,13	8,55	7,84	0,16	0,12	0,04	18,00	15,16	1,54	0,12	0,40
	d.e	3,85	0,03	0,11	0,01	0,05	0,02	0,01	1,00	2,10	0,63	0,13	0,22
	CV	125,12	26,66	1,32	0,09	32,13	14,95	18,60	5,56	13,84	40,95	115,10	55,12
	CV (mitjana)	42,99	18,50	4,46	3,76	24,63	13,44	13,25	24,44	15,18	23,92	51,24	19,57

C.E, conductivitat elèctrica; d.e, desviació estàndard; CV, coeficient de variació

3.3.2.3 Valors dels paràmetres bioquímics complementaris

A través del projecte on s'emmarca la tesi, disposem de valors d'altres paràmetres bioquímics per les mostres de sòls naturals estudiats. Aquests resultats els hem inclòs ja que complementen els resultats dels principals paràmetres bioquímics en que hem centrat el nostre estudi. En la Taula 3.7 presentem els valors de biomassa microbiana (Marando et al. (2011); Marando (2013)). En l'apartat de resultats, la Taula 3.14 conté els valors de les activitats enzimàtiques ureàsica i proteolítica de BAA.

Taula 3.7. Valors de biomassa microbiana (mitjana i d.e) en les mostres de sòls naturals (any 2006) (Marando 2013).

Sòl	LT	CR	MN	VC	OR	IG	PN	BL	LG	SG
Biomassa (mg C·kg ⁻¹)	439	946	1344	802	592	741	2170	415	338	343
d.e	58	128	60	35	89	129	212	91	139	61

La metodologia emprada per aquestes determinacions bioquímiques va ser la que prèviament havia estat estandarditzada pel grup (García et al., 2003) i es van realitzar a partir de la fracció de terra fina i sobre la mostra humida. Per l'activitat ureàsica es va seguir el mètode de Tabatabai i Bremner (1972) modificat per Nannipieri et al. (1978b). S'agiten 2 g de sòl amb 8 mL de tampó fosfat de pH 7 (90 min a 37 °C) amb 2 mL de solució d'urea 6,4 %; la separació es fa per filtració i la quantificació d'amoni alliberat amb l'elèctrode selectiu d'amoníac. Per l'activitat de BAA (N-benzoil-L-argininamida) es va seguir el mètode de Ladd i Butler (1972) modificat per Bonmatí et al. (1998). S'agiten 3 g de sòl amb 6 mL de tampó fosfat de pH 7,1 (1 hora a 40°C) amb 2 mL de solució de BAA 0.03 M i s'atura la reacció amb HCl 5 M; la separació es fa per filtració i la quantificació de l'amoni alliberat amb l'elèctrode selectiu d'amoníac. L'anàlisi de biomassa microbiana es va fer per fumigació-extracció (Vance et al., 1987). Per l'anàlisi de biomassa es parteix de mostra humida (portada al 60 % capacitat de camp i preincubada 7 dies a 28 °C). La meitat de la mostra es fumiga amb cloroform (24 h a les fosques i a 25 °C) (i l'altra meitat es deixa sense fumigar) i posteriorment es fa l'extracció del contingut citoplasmàtic alliberat amb K₂SO₄ 0,5 M; la quantificació del carboni orgànic de l'extracte es fa mitjançant oxidació K₂Cr₂O₇-H₂SO₄ i valoració per retrocés amb sal ferrosa; la diferència en C extractable en la mostra fumigada i no fumigada és el que correspon al carboni de biomassa microbiana.

3.3.3 Mètodes d'anàlisi

Les mostres de camp varen ser homogeneïtzades i garbellades per obtenir la fracció de terra fina (<2 mm) al laboratori. Una part es va guardar a la nevera (4 °C) durant un màxim de dues setmanes per a la realització de les determinacions bioquímiques. Una altra part va ser asseçada a l'aire durant una setmana i emmagatzemada a temperatura ambient. A partir d'aquesta mostra es varen fer les determinacions de paràmetres generals descrits anteriorment i també les determinacions de les activitats enzimàtiques β-glucosidasa i β-galactosidasa en l'assaig d'influència del pretractament d'assecat.

Pel que fa a la metodologia analítica (capítols 5), la determinació del contingut en carbohidrats totals de les mostres de sòls es va fer a través de la doble hidròlisi amb

àcid sulfúric establerta a Cheshire (1979) i la determinació de la fracció de carbohidrats extractables és va fer servir com a reactiu extractant el K_2SO_4 0,5 M seguint els estudis de Badaluco et al. (1992). Per a la quantificació vam fer servir el mètode colorimètric de l'antrona (Brink et al., 1960). Les mesures de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa es basen en la determinació colorimètrica del producte de la hidròlisi de paranitrofenilglucòsids (Tabatabai, 1982; Eivazi i Tabatabai, 1988); el protocol analític és fruit del treball de posada a punt que es descriu al capítol 5 i que estan publicats a Jiménez i Bonmatí (2003).

3.3.4 Tractament estadístic de dades

Per a cadascuna de les mostres de 10 sòls disposem d'un conjunt de dades que dividim en dues categories:

- Variables principals: són les variables centrals de la tesi i inclou les cinc variables carboni orgànic (C), carbohidrats extractables (CHE), carbohidrats totals (CHT), activitat β -glucosidasa (GLC) i activitat β -galactosidasa (GAL).
- Altres variables: són les que formen part de la caracterització de les mostres i que s'han presentat en l'apartat de materials. Aquesta categoria inclou tant les característiques generals o fisico-químiques (FQ) dels sòls com les tres variables bioquímiques: carboni de biomassa microbiana (BMC), i activitats ureàsica (UR) i proteolítica de BAA (BAA).

La distribució de les determinacions d'aquestes variables en els diferents anys de mostreig no és uniforme. Només per tres variables (C, GLC, UR) i per les característiques generals disposem de valors per cadascun dels tres anys de mostreig; per la resta de variables disposem de valors de 2 anys (BAA) o bé d'un sol any de mostreig (CHE, CHT, GAL i BMC). Amb aquesta limitació del número de dades i d'acord amb els objectius de la tesi hem fet els tractaments de dades que s'indica a les Taules 3.8 i 3.9 identificats del I al V especificant les variables que s'han considerat per cadascun d'ells.

Taula 3.8. Correspondència entre tipus de tractament de dades i les variables estudiades.

Tractament de dades			Variables								
Nº	Tipus	Anys	Principals					Altres			
			C	CHE	CHT	GLC	GAL	UR	BAA	BMC	FQ
I	ANOVA Efecte sòl	2006	x	x	x	x	x	x	x		
II	ANOVA Efecte sòl i any	2004	x			x		x			
		2005	x			x		x	x		
		2006	x			x		x	x		
III	Correlació lineal	2006	x	x	x	x	x	x	x	x	x
IV	ANOVA Efecte assecat	2005				x					
		2006				x	x				
V	Correlació lineal	2006	x	x	x	x*	x*	x	x	x	x

FQ, variables fisicoquímiques; BMC, carboni de biomassa microbiana X* valor obtingut a partir de mostra seca

Taula 3.9. Correspondència entre els objectius i els tractaments estadístics de dades.

1r. Objectiu: estudi dels valors dels paràmetres bioquímics dels deu sòls naturals anys diferents
2n. Objectiu: estudi del comportament dels paràmetres bioquímics com a diferenciadors dels sòls naturals
Tractament I.- ANOVA efecte sòl
Amb les dades del tercer any de mostreig (any 2006) i per avaluar l'efecte sòl s'ha fet una ANOVA d'un factor (sòl) i la separació de les mitjanes d'acord amb el test SNK ($\alpha=0,05$). Els resultats d'aquest tractament ens permeten fer un estudi puntual en el temps però global del conjunt de tots els paràmetres.
Tractament II.- ANOVA efecte sòl i any
Amb les dades dels paràmetres controlats en 2 o 3 anys i per avaluar conjuntament l'efecte sòl i any de mostreig s'ha fet una ANOVA de dos factors on el factor sòl és factor fix i el factor any és aleatori i tenint present la interacció sòl-any; la separació de les mitjanes per cada sòl, considerant els tres anys, s'ha fet pel test de Tukey ($\alpha=0,05$). Els resultats d'aquest segon tractament ens permeten obtenir, si bé només per alguns dels paràmetres, les diferències entre sòls recollint la variabilitat deguda al factor any de mostreig.
3r. Objectiu: estudi de les relacions entre el conjunt de paràmetres dels sòls naturals
Tractament III.- Correlació lineal de les variables
Amb les mitjanes de cada sòl pel conjunt de dades del tercer any de mostreig i per estudiar la correlacions entre tots els paràmetres s'han calculat els coeficients de correlació de Pearson. S'han fet també correlacions parcials a carboni constant i a biomassa constant.
4t. Objectiu: estudi de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa a través de l'efecte d'assecat de la mostra
Tractament IV.- ANOVA efecte pretractament d'assecat
Amb les dades de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa obtingudes a partir de la mostra humida i la mostra assecada i per avaluar l'efecte pretractament (assecat de la mostra) s'ha fet una ANOVA de dos factors fixes (sòl i pretractament) amb interacció (sòl x pretractament) i la separació de les mitjanes d'acord amb el test SNK($\alpha=0,05$). S'ha fet l'estudi separatament per dos anys
Tractament V.- Correlació lineal de variables
Amb els valors de les dues activitats enzimàtiques GLC i GAL obtinguts a partir de la mostra assecada s'ha fet l'estudi de correlacions amb l'objectiu d'esbrinar alguna característica sobre les components de les activitats enzimàtiques determinades.

Les dades van ser analitzades utilitzant Statistics Analysis System software i el procediment GLM utilitzant el test de la variància (SAS, 1990). Tots els tractaments inclouen l'estudi de les variables anomenades directes o absolutes (expressades per g de sòl) assenyalades a la Taula 3.8 així com les variables calculades. Les variables calculades són:

- Variables relatives al contingut de MO del sòl: valors corresponents a les variables directes però expressades per g de carboni. Treballem amb el continguts relatius en carbohidrats (CHE/C, CHT/C) i les activitats enzimàtiques específiques (GLC/C, GAL/C, UR/C i BAA/C).
- Relació entre les variables: valors derivats del quocients entre variables. Treballem amb la relació entre els dos tipus de carbohidrats (CHE/CHT).

3.4 RESULTATS

Els resultats els presentem ordenats d'acord al tractament estadístic de dades especificats en l'apartat anterior.

3.4.1 Visió de conjunt dels paràmetres a través dels resultats del tercer any de mostreig

Per tal de fer l'anàlisi global dels resultats pel conjunt dels sòls i pel conjunt de paràmetres, en primer lloc presentem els resultats de l'estadística descriptiva de les mitjanes dels valors per les 10 mostres de sòls. La Taula 3.10 inclou, el valor (mitjana \pm d.e), el rang (màxim i mínim i la relació màxim/mínim) i la dispersió (coeficient de variació) pels diferents paràmetres absoluts i relatius al carboni.

Taula 3.10. Mitjana, rang i dispersió pels paràmetres (absoluts i relatius al carboni) en el conjunt de sòls naturals.

	Unitats	Mitjana \pm d.e	Mínim	Màxim	Màx/ Mín	CV (%)
C	g 100 g ⁻¹	4,54 \pm 3,31	0,85	10,74	12,6	73
CHE	mg glucosa g ⁻¹	0,442 \pm 0,420	0,107	1,500	14,0	95
CHT		7,307 \pm 6,757	0,990	22,992	23,2	93
CHE/CHT	g 100 g ⁻¹	6,8 \pm 2,0	4,2	10,8	2,6	29
GLC	μ mol pNF g ⁻¹ h ⁻¹	1,71 \pm 1,07	0,39	3,83	9,8	62
GAL		0,35 \pm 0,34	0,03	0,98	32,7	97
UR	μ mol N g ⁻¹ h ⁻¹	2,56 \pm 1,88	0,71	6,21	9,0	73
BAA		2,70 \pm 2,15	0,45	5,65	13,0	80
CHE/C	g C-glucosa 100 g ⁻¹ C	0,39 \pm 0,12	0,24	0,56	2,3	30
CHT/C		5,89 \pm 1,08	4,68	8,57	1,8	18
GLC/C	μ mol pNF g ⁻¹ C h ⁻¹	42,32 \pm 9,57	22,15	58,46	2,6	23
GAL/C		7,34 \pm 4,31	2,11	14,87	7,0	57
UR/C	μ mol N g ⁻¹ C h ⁻¹	65,45 \pm 26,15	20,91	95,96	5,0	40
BAA/C		63,93 \pm 27,47	10,44	114,58	11,0	43

d.e, desviació estàndard; CV, coeficient de variació

El conjunt de sòls representen un ampli ventall de valors de contingut en carboni i per aquest motiu el rang de valors que trobem pels paràmetres bioquímics també és molt ampli. Els rangs (valor màxim/valor mínim) més amplis són pels valors de CHT i GAL i els rangs més estrets corresponen a les variables calculades. Tres activitats enzimàtiques GLC, UR i BAA presenten una amplitud del rang semblant, però la disminució del rang en considerar el corresponent a les activitats específiques és més acusada per la GLC.

El valor del CV del conjunt de mostres segueix la gradació: GAL \approx CHE \approx CHT>BAA>UR=C>GLC. La dispersió dels paràmetres relatius al C sempre és inferior a la del paràmetre absolut corresponent i en aquest cas el valor del CV segueix la tendència: GAL/C>BAA/C \approx UR/C>CHE/C>GLC/C \approx CHT/C. La relació entre el CV de cadascun dels paràmetres i el CV del mateix paràmetre, però relatiu al C, pren valors entre 5,0 i 1,7 i segueix l'ordenació: CHT>CHE \approx GLC>GAL \approx UR \approx BAA.

Els resultats de l'ANOVA (factor sòl) (tractament estadístic I) es presenten en la Taula 3.11 a través del valor de F i la seva significativitat. La Taula 3.11 inclou també el número de grups de sòls desconnectats resultants de la separació de mitjanes d'acord amb el test SNK; entenem com grups desconnectats aquells que no intersequen.

Taula 3.11. Resultats de l'ANOVA (factor sòl) i de la separació de mitjanes (any 2006).

Paràmetre	Valor de F	Nº de grups desconnectats
C	3835***	10
CHE	2685***	8
CHT	1688***	9
UR	888***	7
GLC	717***	9
BAA	601***	6
GAL	473***	7
GAL/C	221***	5
GLC/C	144***	6
CHE/C	131***	6
CHE/CHT	125***	6
UR/C	74***	5
CHT/C	63***	3
BAA/C	62***	5

(***) < 0,001)

D'acord amb el resultat de l'ANOVA (Taula 3.11) el factor sòl és significatiu per a tots els paràmetres i els alts valors de F els interpretem com un reflex de la important variabilitat deguda als diferents sòls respecte de la variabilitat analítica. Hem de tenir present que els valors promig dels CV analítics (oscil·len entre 3-5 % i són superiors per la BAA 7 % i per GAL 9 %, d'acord als resultats de la Taula 3.12) indiquen que l'error analític es pot considerar baix. Si comparem els valors de F dels paràmetres directes podem dir que la capacitat discriminant del C i dels CHE i CHT és superior a la de les activitats enzimàtiques. Si considerem, però, la capacitat discriminant de les magnituds relatives al C, veiem que sempre presenten un valor de F inferior a la corresponent variable absoluta, i que les activitats enzimàtiques específiques GAL/C i GLC/C junt amb CHE/C, passen a ser les que tenen els valors més alts. Pel que fa a la diferenciació de sòls derivats de la separació de mitjanes, trobem que és molt alta pel cas del C, amb una diferenciació completa de les 10 mostres i la més baixa correspon a BAA, que diferencia sis grups, i amb les variables relatives destaca la baixa diferenciació entre sòls a través de les mitjanes de CHT/C.

Com a resum sobre el comportament dels paràmetres, veiem que l'activitat β -glucosidasa absoluta i específica (GLC i GLC/C) és el paràmetre que presenta menys dispersió i l'activitat β -galactosidasa absoluta i l'específica (GAL i GAL/C) es troba entre els que presenten més dispersió junt amb els carbohidrats (CHT i CHE). Les variacions en els valors de carbohidrats (especialment els CHT) i de l'activitat β -glucosidasa (GLC) s'expliquen més pel contingut en C dels sòls que no pas les de les activitats GAL, UR i BAA. Globalment podem dir que els sòls naturals mostrejats es poden diferenciar més a través del seu contingut en C i Carbohidrats (CHT i CHE) que pels seus valors d'activitats enzimàtiques; si traiem, però, la influència del contingut en MO, es diferencien pels valors d'activitats específiques, especialment GLC/C i GAL/C i per la proporció en CHE (CHE/C i CHE/CHT).

Les Taules 3.12 i 3.13 i 3.14 inclouen per a cada mostra de sòl el valor de la mitjana i de dispersió de les rèpliques analítiques (desviació estàndard) i el resultat de la separació de mitjanes (diferències entre sòls) per cadascun dels paràmetres, pels seus valors relatius al carboni i per la relació CHE/CHT.

Taula 3.12. Resultats del contingut en carboni orgànic, carbohidrats totals i extractables en les mostres de sòls naturals (any 2006).

Sòl		C		CHE		CHT		CHE/C		CHT/C		CHE/CHT	
	unitats	g 100 g ⁻¹		mg glucosa g ⁻¹				g C-glucosa 100 g ⁻¹ C				g 100 g ⁻¹	
LT	mitjana d.e	3,07 0,08	F F	0,218 0,015	F F	4,133 0,176	E E	0,284 0,019	F F	5,377 0,229	DE DE	5,3 F	F F
CR	mitjana d.e	6,20 0,10	D D	0,569 0,015	C C	8,590 0,540	C C	0,368 0,010	DE DE	5,547 0,346	CD CD	6,6 D	D D
MN	mitjana d.e	7,23 0,16	C C	0,694 0,025	B B	11,870 0,394	B B	0,384 0,014	DE DE	6,568 0,218	B B	5,8 E	E E
VC	mitjana d.e	4,15 0,06	E E	0,251 0,004	E E	5,194 0,174	D D	0,242 0,003	G G	5,003 0,167	EF EF	4,8 F	F F
OR	mitjana d.e	7,81 0,11	B B	0,485 0,008	D D	11,640 0,363	B B	0,248 0,004	G G	5,961 0,186	CD CD	4,2 G	G G
IG	mitjana d.e	2,32 0,03	G G	0,270 0,021	E E	3,330 0,213	F F	0,467 0,036	C C	5,762 0,368	CD CD	8,1 C	C C
PN	mitjana d.e	10,74 0,05	A A	1,500 0,029	A A	22,998 0,523	A A	0,559 0,011	A A	8,566 0,195	A A	6,5 D	D D
BL	mitjana d.e	1,21 0,11	I I	0,166 0,012	G G	1,810 0,070	H H	0,548 0,040	A A	5,991 0,232	CD CD	9,2 B	B B
LG	mitjana d.e	0,85 0,10	J J	0,107 0,004	H H	0,992 0,039	I I	0,502 0,019	B B	4,675 0,188	F F	10,8 A	A A
SG	mitjana d.e	1,82 0,04	H H	0,156 0,008	G G	2,510 0,167	G G	0,344 0,017	E E	5,522 0,367	CD CD	6,2 DE	DE DE

Dins d'una columna, valors seguits de la mateixa lletra indica que no hi ha diferència significativa entre sòls.

Tal com hem vist, la separació dels sòls atenent al seu contingut en C és completa ja que les 10 mitjanes són totes significativament diferents entre sí (Taula 3.11). Quatre sòls (**PN, MN, CR i OR**), dels sis sòls forestals mostrejats, són els més rics en carboni orgànic i són els que tenen un contingut més alt dels tipus de carbohidrats (Taula 3.12). D'aquests 4 sòls destaca especialment el **PN** com aquell on els continguts en CHE i CHT i els relatius al C (CHE/C i CHT/C) són els més alts. Respecte de la resta de mostres destaquem **VC** com sòl amb contingut en C orgànic força alt però baixa proporció dels dos tipus de carbohidrats (CHE/C i CHT/C) i **BL**, pel contrari, mostra un baix contingut en C orgànic i en canvi important proporció en els dos tipus de carbohidrats.

Taula 3.13. Resultats de les activitats β -glucosidasa i β -galactosidas en les mostres de sòls naturals (any 2006).

Sòl	Activitat	β -glucosidasa		β -galactosidasa			
		Total	Específica	Total	Específica		
	Unitats	$\mu\text{mol pNF}$		$\mu\text{mol pNF}$			
		$\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{g}^{-1} \text{C h}^{-1}$	$\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{g}^{-1} \text{C h}^{-1}$		
LT	mitjana d.e	1,34 0,01	F 43,55 0,23	C	0,34 0,04	D 10,85 1,17	B
CR	mitjana d.e	2,37 0,07	C 38,30 1,67	D	0,89 0,02	B 14,87 0,36	A
MN	mitjana d.e	2,84 0,11	B 39,30 1,46	D	0,98 0,03	A 13,58 0,48	A
VC	mitjana d.e	1,89 0,10	D 45,42 2,36	C	0,24 0,02	E 5,83 0,40	DE
OR	mitjana d.e	1,73 0,10	E 22,15 1,22	F	0,16 0,01	F 2,11 0,16	G
IG	mitjana d.e	1,15 0,05	G 49,94 2,37	B	0,16 0,00	F 6,99 0,18	CD
PN	mitjana d.e	3,83 0,00	A 35,64 0,03	E	0,56 0,08	C 5,20 0,75	E
BL	mitjana d.e	0,53 0,01	H 43,98 1,06	C	0,05 0,01	G 4,28 0,73	F
LG	mitjana d.e	0,39 0,02	I 46,41 1,76	C	0,03 0,01	G 3,71 0,60	F
SG	mitjana d.e	1,06 0,02	G 58,46 1,33	A	0,12 0,00	F 6,43 0,27	CD

Dins d'una columna, valors seguits de la mateixa lletra indica que no hi ha diferència significativa entre sòls.

Hi ha una important correspondència entre els *rankings* de sòls feta a partir de la separació de mitjanes de C i a través dels valors de β -glucosidasa (Taula 3.12 i 3.13). Donada aquesta correspondència podem dir doncs que en general els sòls amb més alt contingut de C (PN, CR, MN, OR i VC) són també els que tenen l'activitat β -glucosidasa superior. En general també es pot dir però que aquests són els de menor activitat específica GLC/C. Les mostres amb més alta l'activitat β -galactosidasa (MN, CR i PN) es troben entre les mostres amb més alt contingut en C però hi ha menys correspondència entre els valors d'aquesta activitat enzimàtica i el contingut en C (com es pot deduir del ranking de valors d'activitat específica GAL/C). Les mostres que presenten més alta l'activitat β -galactosidasa específica (**MN, CR i LT**) tenen en comú el fet de ser mostres de sòls forestals de substrat no carbonatat (pH més àcid). Per aquestes tres mostres (LT, CR i MN) també es pot observar que la relació GAL/GLC té un valor d'entre 0,25-0,38 que és superior a la resta de mostres on aquesta relació és molt similar i oscil·la entre 0,15-0,25.

Taula 3.14. Resultats de les activitats ureàsica i proteolítica de BAA en les mostres de sòls naturals (any 2006).

Sòl	Activitat	Ureasa		Proteolítica BAA	
		Total	Específica	Total	Específica
	unitats	µmol N		µmol N	
		g ⁻¹ h ⁻¹	g ⁻¹ C h ⁻¹	g ⁻¹ h ⁻¹	g ⁻¹ C h ⁻¹
LT	mitjana d.e	1,96 E 0,07	63,92 B 2,41	3,52 B 0,46	114,58 A 15,06
CR	mitjana d.e	5,20 B 0,15	83,91 A 2,36	5,46 A 0,06	88,16 B 1,03
MN	mitjana d.e	6,21 A 0,09	85,84 A 1,26	5,52 A 0,12	76,37 C 1,72
VC	mitjana d.e	2,18 D 0,05	52,51 C 1,29	2,25 C 0,17	54,20 D 4,03
OR	mitjana d.e	1,63 F 0,12	20,91 E 0,15	0,82 E 0,08	10,44 E 1,03
IG	mitjana d.e	2,07 D 0,15	89,36 A 6,68	1,64 D 0,07	70,92 C 2,87
PN	mitjana d.e	3,72 C 0,13	34,64 D 1,21	5,65 A 0,13	52,56 D 1,24
BL	mitjana d.e	1,16 G 0,10	95,96 A 8,50	0,83 E 0,04	68,65 C 3,61
LG	mitjana d.e	0,71 H 0,09	83,40 A 10,74	0,45 E 0,09	53,47 D 10,53
SG	mitjana d.e	0,80 H 0,05	43,92 C 2,89	0,90 E 0,04	49,75 D 2,38

Dins d'una columna, valors seguits de la mateixa lletra indica que no hi ha diferència significativa entre sòls.

Si analitzem els valors les activitats UR i BAA en les 10 mostres de sòl (Taula 3.14) veiem que les mostres amb més alt contingut de C (i també LT, només per BAA) són també les que tenen valors més alts d'aquestes activitats, amb l'excepció d'una d'elles (mostra **OR** que té les activitats enzimàtiques més baixes). Anàlogament a l'activitat específica GAL/C, els valors més alts d'activitat proteolítica específica BAA/C també corresponen al grup dels tres sòls LT, CR i MN.

3.4.2 Incidència de l'any de mostreig

3.4.2.1 Resultats obtinguts en el primer i segon any de mostreig i contrast amb els resultats del tercer any de mostreig

En les taules 3.15 i 3.16 resumim els resultats dels anys 2004 i 2005. Els resultats de l'estadística descriptiva de les mitjanes dels valors per les 10 mostres de sòls corresponents als anys 2004 i 2005 es presenten en la Taula 3.17 detallant el valor (mitjana \pm d.e), el rang (màxim i mínim i la relació màxim/mínim) i la dispersió (coeficient de variació) dels diferents paràmetres absoluts i relatius al carboni separatament per cada any.

Taula 3.15. Resultats de Carboni i de les activitats β -glucosidasa i ureasa en les mostres de sòls naturals (any 2004).

Sòl	Activitat	Carboni	β -glucosidasa		Ureasa	
			Total	Específica	Total	Específica
	Unitats	$\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	$\mu\text{mol pNF}$		$\mu\text{mol N}$	
			$\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$\text{g}^{-1} \text{ C h}^{-1}$	$\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$\text{g}^{-1} \text{ C h}^{-1}$
LT	mitjana	1,67	0,89	53,38	2,45	146,71
	d.e	0,06	0,05	2,73	0,25	15,20
CR	mitjana	6,43	2,58	40,06	11,64	181,12
	d.e	0,25	0,15	2,29	0,40	6,15
MN	mitjana	5,69	2,30	40,44	7,78	136,66
	d.e	0,20	0,08	1,39	1,02	17,93
VC	mitjana	4,64	3,77	81,29	4,48	96,59
	d.e	0,09	0,11	2,33	0,62	13,36
OR	mitjana	4,33	1,36	31,40	2,38	55,02
	d.e	0,07	0,05	1,12	0,13	2,92
IG	mitjana	1,67	1,55	93,16	4,45	267,07
	d.e	0,14	0,05	2,72	0,02	1,20
PN	mitjana	9,31	3,71	39,82	6,12	65,77
	d.e	0,16	0,18	1,96	0,05	0,49
BL	mitjana	0,62	0,26	42,09	1,30	206,76
	d.e	0,06	0,02	2,35	0,03	4,87
LG	mitjana	0,76	0,48	62,33	1,13	147,69
	d.e	0,04	0,03	4,31	0,21	27,80
SG	mitjana	2,23	2,57	115,11	3,43	153,78
	d.e	0,06	0,08	3,76	0,17	7,82

Taula 3.16. Resultats de Carboni i de les activitats β -glucosidasa , ureasa i proteolítica de BAA en les mostres de sòls naturals (any 2005).

Sòl	Activitat	Carboni	β -glucosidasa		Ureasa		Proteolítica BAA	
			Total	Específica	Total	Específica	Total	Específica
	Unitats	$g\ 100\ g^{-1}$	$\mu mol\ pNF$		$\mu mol\ N$		$\mu mol\ N$	
			$g^{-1}\ h^{-1}$	$g^{-1}\ C\ h^{-1}$	$g^{-1}\ h$	$g^{-1}\ C\ h^{-1}$	$g^{-1}\ h^{-1}$	$g^{-1}\ C\ h^{-1}$
LT	mitjana	2,97	1,46	49,29	2,24	75,26	3,73	125,55
	d.e	0,07	0,03	0,98	1,17	39,28	0,19	6,49
CR	mitjana	5,86	4,36	74,49	8,96	153,00	3,81	65,06
	d.e	0,12	0,15	2,49	0,53	8,99	0,18	3,08
MN	mitjana	6,76	5,47	80,96	3,80	56,17	4,25	62,87
	d.e	0,10	0,38	5,62	0,57	8,40	0,15	2,26
VC	mitjana	3,62	2,59	71,51	3,49	96,29	2,47	68,09
	d.e	0,09	0,05	1,47	1,05	29,10	0,07	1,81
OR	mitjana	5,33	2,72	50,87	4,16	77,97	0,64	11,99
	d.e	0,20	0,15	2,74	0,40	7,49	0,22	4,13
IG	mitjana	1,77	1,55	88,00	3,66	207,77	0,85	48,10
	d.e	0,11	0,07	3,94	1,05	59,72	0,08	4,71
PN	mitjana	11,95	6,36	53,28	9,66	80,90	2,03	16,97
	d.e	0,15	0,39	3,27	2,82	23,58	0,35	2,90
BL	mitjana	1,33	0,80	60,27	3,66	274,61	1,33	99,85
	d.e	0,04	0,02	1,38	1,71	128,53	0,19	14,32
LG	mitjana	0,71	0,69	98,52	2,00	283,90	1,58	224,46
	d.e	0,04	0,03	3,98	0,43	61,24	0,21	29,28
SG	mitjana	1,07	1,01	94,10	3,09	288,01	1,38	128,32
	d.e	0,10	0,03	2,91	0,93	86,70	0,38	35,81

Taula 3.17. Mitjana, rang i dispersió de valors dels paràmetres en el conjunt de sòls naturals (anys 2004 i 2005).

Any	2004					2005				
	mitjana \pm d.e	mínim	màxim	màx/ mín	CV %	mitjana \pm d.e	mínim	màxim	màx/ mín	CV %
C	3,74 \pm 2,84	0,62	9,31	15	76	4,14 \pm 3,48	0,71	11,96	17	84
GLC	1,95 \pm 1,24	0,26	3,77	15	63	2,7 \pm 2,03	0,69	6,36	9	75
UR	4,52 \pm 3,26	1,13	11,64	10	72	4,47 \pm 2,65	2,00	9,66	5	59
BAA						2,21 \pm 1,30	0,64	4,25	7	59
GLC/C	59,91 \pm 27,82	31,40	115,11	4	45	72,25 \pm 18,37	49,29	98,52	2	25
UR/C	145,72 \pm 63,85	55,02	267,07	5	43	159,72 \pm 96,07	56,17	288,01	5	60
BAA/C						85,32 \pm 63,35	11,99	224,46	18	74

Unitats: C en $g\ 100\ g^{-1}$; GLC en $\mu mol\ pNF\ g^{-1}\ h^{-1}$ i UR i BAA $\mu mol\ N\ g^{-1}\ h^{-1}$ GLC/C en $\mu mol\ pNF\ g^{-1}\ C\ h^{-1}$ i UR/C i BAA/C en $\mu mol\ N\ g^{-1}\ C\ h^{-1}$

Les característiques generals de les mitjanes, rang de valors i dispersió són semblants a les de l'any 2006 i les resumim en tres punts:

- i. Les mostres presenten un ampli ventall de valors de contingut de C i conseqüentment també dels paràmetres bioquímics estudiats.
- ii. El valor del CV del conjunt de mostres per la GLC és sempre inferior al que presenten els valors de C.
- iii. Per l'activitat GLC la disminució del rang de valors i del CV, respecte del seu corresponent paràmetre relatiu al C, és molt més acusada que per les activitats UR i BAA.

El contrast dels resultats de l'estadística descriptiva entre els tres anys de mostreig ens permet destacar que:

- i. L'any 2005 hi ha un augment de l'amplitud del rang de valors de C i GLC per la banda alta que es tradueix en valors de la mitjana i del CV més elevats.
- ii. Els dos primers anys de mostreig l'activitat UR presenta valors superiors als de l'any 2006.

3.4.2.2 Resultats globals dels tres anys de mostreig

L'anàlisi global de les diferències entre sòls recollint la variabilitat deguda a l'any de mostreig es presenta a través del resultat de l'ANOVA (tractament de dades II) per cadascun dels factors (sòl/fix i any/aleatori) i per la interacció (sòl x any) per cadascun dels paràmetres en la Taula 3.18. La Taula 3.19 conté la separació de les mitjanes per cada sòl, considerant la mitjana dels tres anys de mostreig, d'acord al test de Tukey.

Taula 3.18. Resultats de l'ANOVA: Valor de F i la seva significativitat per cada factor i per la interacció.

	C	GLC	GLC/C	UR	UR/C	BAA	BAA/C
Factor sòl	48,5***	7,4***	5,0**	7,6***	3,3*	5,7**	1,5 ns
Factor any	2,6 ns	3,7*	12,1***	5,6*	9,7**	1,3 ns	1,3 ns
Sòl x any	148,4***	150,0***	94,8***	10,8***	6,3***	78,1***	42,4***

(***<0,001 **<0,010 *<0,050 i ns no significatiu)

A partir dels valors de F podem veure que, considerant els tres anys de mostreig, per tots els paràmetres, excepte per l'activitat proteolítica BAA específica, el factor sòl és significatiu. El valor de F més alt segueix sent pel contingut de C. Podem veure també que no són significatives les diferències entre les mitjanes de C pels 10 sòls degudes a l'any de mostreig ni tampoc pel cas de l'activitat BAA i BAA/C (encara que en aquest cas s'ha de tenir en compte que només hi ha valors de dos anys). La combinació sòl x any és sempre significativa (per tots els paràmetres) per tant podem dir que la incidència de l'any de mostreig no és homogènia sobre els diferents sòls.

Taula 3.19. Resultats de carboni i de les activitats β -glucosidasa, ureasa i proteolítica de BAA considerant les mitjanes dels tres anys de mostreig.

Sòl	Carboni		β -glucosidasa		Ureasa		Proteolítica BAA							
	g 100 g ⁻¹		Total g ⁻¹ h ⁻¹	Específica g ⁻¹ C h ⁻¹	Total g ⁻¹ h ⁻¹	Específica g ⁻¹ C h ⁻¹	Total g ⁻¹ h ⁻¹	Específica g ⁻¹ C h ⁻¹						
LT	2,57	DE	1,23	BC	48,79	BC	2,22	BCD	95,39	A	3,63	AV	120,14	A
CR	6,16	BC	3,10	AV	50,93	BC	8,60	A	139,29	A	4,64	AV	76,57	A
MN	6,56	B	3,54	AV	53,57	ABC	5,93	ABC	92,89	A	4,89	A	69,61	A
VC	4,14	CD	2,75	ABC	66,09	ABC	3,38	BCD	81,83	A	2,36	AV	61,18	A
OR	5,83	BC	1,94	BC	34,80	C	2,73	BCD	51,29	A	0,73	B	11,21	A
IG	1,92	DE	1,42	BC	77,04	AV	3,39	BCD	188,02	A	1,24	AV	59,59	A
PN	10,66	A	4,63	A	42,88	BC	6,50	AV	60,39	A	3,84	AV	34,75	A
BL	1,06	E	0,53	C	48,80	BC	2,04	CD	192,56	A	1,08	AV	84,39	A
LG	0,77	E	0,52	C	69,38	ABC	1,28	D	172,49	A	1,02	AV	139,65	A
SG	1,70	E	1,55	BC	89,30	A	2,44	BCD	162,15	A	1,14	AV	89,17	A

Dins d'una columna, valors seguits de la mateixa lletra indica que no hi ha diferència significativa entre sòls.

Observant les mitjanes dels tres anys de mostreig (Taula 3.19) veiem que el conjunt dels 10 sòls naturals estudiats es poden considerar bioquímicament molt semblants i que en el cas de les activitats UR/C i BAA i BAA/C no es poden diferenciar estadísticament els seus valors. Pel que fa al seu contingut en C, tenen la mateixa ordenació trobada l'any 2006 encara que estadísticament només es manté la singularitat de la mostra **PN**. La mostra **PN** presenta, pel que fa a activitat GLC, també els valors més alts i significativament diferents de les mostres **BL** i **LG**, i a través de l'activitat específica GLC/C podem diferenciar **SG** d'OR, que presenta el valor mínim. A través de l'activitat UR diferenciem significativament el màxim de la mostra **CR** només amb el mínim del sòl **LG**.

3.4.3 Correlacions entre paràmetres

L'estudi de correlacions entre variables l'hem realitzat d'acord al tractament de dades III respecte del qual cal fer les següents puntualitzacions:

- Els valors dels coeficients de correlació són els que s'obtenen entre les mitjanes de només nou de les deu mostres ja que els resultats anteriors han posat de manifest el comportament singular de la mostra PN i ens ha obligat a eliminar-la. Tal com hem dit en l'apartat anterior, la mostra PN presenta l'anomalia de tenir un alt contingut en C, CHT i CHE que no es correspon amb els valors baixos d'activitats GAL i UR. Hem comprovat que la inclusió d'aquesta mostra per una banda intensifica i força les correlacions de C i carbohidrats i en canvi impedeix la visualització de les correlacions d'aquestes dues activitats enzimàtiques.
- Només especificuem el valor del coeficient de correlació per les que són significatius (**<0,001 **<0,010 *<0,050).

Els coeficients de correlació que presenten les variables bioquímiques entre si i amb els paràmetres generals dels sòls s'especifiquen conjuntament en la Taula 3.20. La consistència de les correlacions que presenten els paràmetres bioquímics entre si l'estudiem a través de les correlacions parcials. En la Taula 3.21 indiquen si les correlacions anteriors es mantenen o no a carboni constant i a biomassa constant, i s'especifica el valor del coeficient de correlació en cas afirmatiu.

Taula 3.20. Coeficients de correlació lineal (valor de R) entre paràmetres bioquímics i entre paràmetres bioquímics i paràmetres generals.

	C	CHE	CHT	GLC	GAL	UR	BAA	
C		0,919***	0,991***	0,878**	0,685*	0,701*		
BMC	0,717*	0,873**	0,741*	0,898***	0,863**	0,933***	0,799**	
	CHT	GLC	GAL	UR	BAA			
CHE	0,940***	0,910***	0,968**	0,896***	0,757*			
CHT		0,870**	0,700*	0,723*				
GLC			0,884**	0,893***	0,836**			
GAL				0,983***	0,965***			
UR					0,935***			
	BMC	C	CHE	CHT	GLC	GAL	UR	BAA
Humitat		0,933***	0,800**	0,881**	0,816**			
C.E					-0,688*			
pH (H ₂ O)			-0,747*		-0,705*	-0,894***	-0,844**	-0,914***
pH (KCl)			-0,749*		-0,752*	-0,892***	-0,837**	-0,933***
N	0,915***	0,919***	0,942***	0,928***	0,956***	0,822**	0,863**	0,728*
Fe								
Al		0,859**	0,698*	0,817**				
P	0,764*				0,717*	0,747*	0,754*	0,692*
Ca								
Mg	0,706*	0,816**	0,903***	0,821**	0,839**	0,896***	0,854**	0,832**
Na	0,718*	0,765*	0,893***	0,765*	0,779*	0,880**	0,860**	0,776*
K		0,915***	0,876**	0,900***	0,752*			

C.E, conductivitat elèctrica (***) < 0,001 ** < 0,01 * < 0,05)

Tots els paràmetres bioquímics estudiats estan molt positivament correlacionats entre ells així com amb el C i la BMC, a excepció de BAA, que no presenta correlació significativa amb C ni amb CHT. Totes les activitats enzimàtiques estan més correlacionades amb la BMC que amb el C i en canvi pels carbohidrats és a l'inrevés. El grau de correlació de les activitats enzimàtiques amb la BMC segueix la tendència: UR>GLC>GAL>BAA i amb el C segueix la tendència: GLC>UR>GAL. D'ambdós tipus de carbohidrats, els CHE estan més altament correlacionats amb la BMC i amb les activitats enzimàtiques que els CHT.

Taula 3.21. Resultat de l'estudi de les correlacions parcials a carboni (C) i biomassa (BMC) constant. Entre parèntesis el valor de R i la seva significativitat.

Correlació entre el parell de variables:	Es manté a C constant?	Es manté a BMC constant?
CHE - CHT	no	si (0,896**)
GLC - CHE	no	no
GLC - CHT	no	no
GLC - GAL	si (0,810*)	no
GLC - UR	si (0,812*)	no
GLC - BAA	si (0,830*)	no
GAL - CHT	no	no
GAL - CHE	si (0,829*)	no
GAL - UR	si (0,968***)	si (0,977***)
GAL - BAA	si (0,955***)	si (0,906***)
UR - CHT	no	no
UR - CHE	si (0,896**)	no
UR - BAA	si (0,910**)	si (0,882**)
BAA - CHE	no	no

(***<0,001 **<0,01 *<0,05)

Podem veure que les úniques correlacions que no s'expliquen a través del carboni ni de la biomassa són: GAL-UR, GAL-BAA i UR-BAA. L'activitat GLC es correlaciona amb aquestes tres activitats a través de la biomassa i no a través del carboni. Totes quatre activitats enzimàtiques es relacionen amb els CHT i CHE a través del carboni i/o a través de la biomassa.

Per una altra banda també estudiem les correlacions que presenten les activitats enzimàtiques específiques i constatem que aquests paràmetres relatius presenten moltes menys correlacions entre sí que els absoluts. La Taula 3.22 mostra les correlacions totals i parcials significatives. Podem veure que l'activitat β -glucosidasa específica està negativament correlacionada amb el carboni i amb CHT i l'activitat β -galactosidasa específica resulta ser l'única activitat que apareix correlacionada amb la corresponent activitat absoluta. Aquestes tres correlacions no s'expliquen a través de la biomassa (si no que a biomassa constant dues es fan més significatives).

Taula 3.22. Resultat de l'estudi de correlacions totals i parcials a biomassa constant entre paràmetres bioquímics absoluts i relatius a carboni. Valor de R i la seva significativitat.

Paràmetres correlacionats	Correlació total	Correlació parcial a BMC constant
GLC/C - C	-0,772*	-0,837**
GLC/C - CHT	-0,759*	-0,838**
GAL/C - GAL	0,899***	0,858**

(***<0,001 **<0,01 *<0,05)

Respecte de les correlacions entre els paràmetres bioquímics i els paràmetres generals (Taula 3.20) podem observar que el C i els carbohidrats estan principalment correlacionats amb humitat, N orgànic i els elements Al, Mg, Na i K i les activitats enzimàtiques ho estan en general amb els continguts de N orgànic, P i amb el Mg. En particular, la GLC ho està també amb la humitat i els altres tres enzims GAL, UR i BAA presenten una important correlació negativa amb el pH (real i potencial). D'entre aquestes correlacions sis es poden considerar com a més autèntiques ja que es mantenen tant a carboni constant com a biomassa constant (Taula 3.23).

Taula 3.23. Resultat de l'estudi de correlacions parcials a carboni (C) constant i a biomassa (BMC) constant entre paràmetres bioquímics i propietats generals dels sòls. Valor de R i la seva significativitat.

Paràmetres correlacionats	Correlació parcial a C constant	Correlació parcial a BMC constant
CHT-humitat	0,933 ^{***}	0,794 [*]
GLC-N orgànic	0,791 [*]	0,757 [*]
GAL-pH	-0,830 ^{**}	-0,894 ^{**}
UR-pH	-0,742 [*]	-0,916 ^{***}
BAA-pH	-0,867 ^{**}	-0,879 ^{**}
GAL-Mg	0,799 [*]	0,800 [*]

(^{***}<0,001 ^{**}<0,01 ^{*}<0,05)

Del conjunt de correlacions entre paràmetres podem dir que en els sòls naturals estudiats:

- i. L'activitat GLC és, d'entre les activitats enzimàtiques estudiades, la més directament relacionada amb el contingut total de MO (de C i també amb el N orgànic) del sòl.
- ii. Les altres tres activitats GAL, UR i BAA tenen una correlació alta entre si i que no s'explica a través del contingut en carboni ni en biomassa del sòl sinó més aviat d'una MO o biomassa característica determinada pel pH del sòl (àcid) i especialment determinant per l'activitat GAL.
- iii. La correlació entre l'activitat GLC i les altres tres activitats GAL, UR i BAA queda explicada per la biomassa i no pel contingut en MO.
- iv. De les quatre activitats enzimàtiques, només dues (GAL i UR) estan directament relacionades amb el contingut en carbohidrats i només amb els CHE.

3.4.4 Efecte dels pretractament de la mostra

3.4.4.1 Efecte del pretractament d'assecat a l'aire de la mostra sobre les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa

Els resultats de l'assaig de la influència del pretractament d'assecat de la mostra sobre les activitats enzimàtiques totals GLC i GAL i específiques GLC/C i GAL/C es presenten d'acord amb els resultats de l'ANOVA (tractament de dades IV) a la Taula 3.24 i en les taules 3.25 i 3.26 es presenta el resultat de la separació de mitjanes.

Taula 3.24. Resultat de l'ANOVA: Valor de F i la seva significació per cadascun dels dos factors i per la interacció.

Any	2005		2006			
	GLC	GLC/C	GLC	GLC/C	GAL	GAL/C
Factor sòl	905***	275***	983***	202***	1087***	442***
Factor pretractament	25***	14***	66***	113***	49***	55***
Sòl x pretractament	23***	25***	17***	13***	17***	10***

(***) < 0,001)

Taula 3.25. Efecte pretractament de mostra sobre les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa ($\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Activitat	β -glucosidasa				β -galactosidasa			
	2005		2006		2006			
	Mostra		Mostra		Mostra			
Sòl	humida	assecada	humida	assecada	humida	assecada	humida	assecada
LT	1,46 Ea	1,06 Fb	1,34 Eb	1,59 Da	0,34 Da	0,29 Dv		
CR	4,36 Ca	3,57 CV	2,37 Ca	2,26 Ca	0,89 Va	0,76 Bb		
MN	5,47 Va	3,97 Bb	2,84 Bb	3,55 Va	0,98 Av	1,05 Aa		
VC	2,59 Dv	3,10 Da	1,89 Dv	2,20 Ca	0,24 Ea	0,20 Eb		
OR	2,72 Da	2,03 Eb	1,73 Da	1,60 Dv	0,16 Fa	0,18 Ea		
IG	1,55 Eb	1,82 Ea	1,15 Fb	1,55 Da	0,16 Fa	0,10 Fb		
PN	6,36 Av	6,84 Aa	3,83 Aa	3,83 Aa	0,56 Ca	0,33 CV		
BL	0,80 Fa	0,82 FEa	0,53 Ga	0,55 Fa	0,05 Ga	0,05 FGa		
LG	0,69 Fa	0,65 Ea	0,39 Ga	0,46 Fa	0,03 Ga	0,03 Ga		
SG	1,01 Fa	1,04 Fa	1,06 Fb	1,25 Ea	0,12 Fa	0,10 Fa		

Dins d'una columna, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre sòls. Per un sòl i any, valors dins d'una mateixa fila seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa deguda al pretractament.

Taula 3.26. Efecte pretractament de mostra sobre les activitats específiques β -glucosidasa i β -galactosidasa ($\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{C h}^{-1}$).

Activitat	β -glucosidasa específica				β -galactosidasa específica	
	2005		2006		2006	
	Mostra		Mostra		Mostra	
Sòl	humida	assecada	humida	assecada	humida	assecada
LT	49,29 F	35,83 E	43,55 C	51,83 BC	10,85 C	9,29 C
CR	74,49 D	60,90 D	38,30 D	36,51 E	14,87 A	12,28 B
MN	80,96 C	58,76 D	39,30 D	49,08 C	13,58 B	14,47 A
VC	71,51 D	85,49 C	45,42 C	52,94 B	5,83 EF	4,76 DE
OR	50,87 F	37,99 E	22,15 F	20,42 F	2,11 H	2,34 F
IG	88,00 B	103,42 A	49,94 B	67,06 A	6,99 D	4,34 E
PN	53,28 F	57,25 D	35,64 D	35,65 E	5,20 F	3,04 F
BL	60,27 E	61,79 D	43,98 C	44,99 D	4,28 G	4,33 E
LG	98,52 A	92,72 B	46,41 C	54,36 B	3,71 G	4,01 E
SG	94,10 A	97,22 B	58,46 A	68,90 A	6,43 DE	5,27 D

Dins d'una columna valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica no hi ha diferència significativa entre sòls.

Els resultats indiquen que l'efecte de l'assecat de la mostra és significatiu per les dues variables estudiades i que és un efecte que està subjecte al tipus de sòl. Només per entre tres i quatre mostres de sòl no trobem diferències degudes al pretractament; per tant podem dir que en general l'activitat GLC i GAL de sòls determinada a partir de la mostra humida és diferent de la que es troba fent l'assaig a partir de la mostra de sòl assecada a l'aire. Depenent de les característiques de la mostra de sòl, l'efecte de l'assecat sobre l'activitat GLC pot causar increment o davallada i en canvi per la GAL podem dir que, (a excepció d'una mostra) causa una pèrdua en el valor de l'activitat.

Si comparem l'efecte del pretractament sobre la GLC en els dos anys assajats veiem que només per 5 (VC, OR, IG, BL i LG) dels 10 sòls es reproduïx l'efecte en el mateix sentit; per tant la duplicació de l'assaig per la GLC permet comprovar que l'efecte de l'assecat sobre aquesta activitat no només depèn de la mostra sinó també de les condicions en què es troba a l'hora de realitzar-se el mostreig. En aquest sentit, si considerem la influència que pugui tenir els valors de la humitat de camp de les mostres (Taula 3.5) podem constatar que:

- i. Si la mostra té una humitat de camp superior al 6 % és més probable que es mantingui l'activitat GLC o que es perdi en part; però si és baixa (inferior al 6 %) és molt més probable que o bé no s'alteri o bé s'incrementi.
- ii. Quan més alta sigui la relació entre la humitat de camp i la higroscòpica més fàcil és que es produeixi pèrdua d'activitat GLC amb l'assecat.

Si comparem l'efecte pretractament de l'any 2006 sobre les dues activitats GLC i GAL observem que no segueix el mateix patró per a les dues activitats enzimàtiques ja que només tres mostres (MN, BL i LG) segueixen la mateixa pauta en ambdues activitats.

Si comparem la separació de mitjanes dels valors de les activitats obtingudes a partir de la mostra humida i assecada veiem que es manté la gradació de la diferenciació entre mostres però no pas la composició de grups. Respecte de les activitats específiques l'assecat modifica més el *ranking* de la separació de mitjanes de les 10 mostres que les activitats totals (la modificació és acusada per GLC/C en el primer any i per GAL/C el segon any).

3.4.4.2 Correlacions de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa determinades a partir de la mostra assecada a l'aire

Els resultats de l'assaig de la influència del pretractament d'assecat de la mostra sobre les activitats enzimàtiques totals i específiques GLC i GAL els estudiem també des d'un segon punt de vista: a través del d'estudi de les correlacions que mantenen els valors de les mostres assecades amb la resta de variables (tractament de dades V) ja que poden permetre esbrinar alguna característica diferenciadora sobre els components de les dues activitats enzimàtiques determinades.

La Taula 3.27 presenta comparativament les correlacions que presenten els valors d'ambdues activitats obtinguts a partir de la mostra humida i la mostra assecada amb la resta de paràmetres. El resultat de l'estudi de correlacions que presenten les activitats GLC i GAL amb la mostra assecada que es mantenen a C constant es presenta en la Taula 3.28.

Taula 3.27. Valor del coeficient de correlació entre les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa determinades sobre mostra humida i sobre mostra assecada a l'aire i la resta de paràmetres.

Activitat	GLC		GAL	
	humida	assecada	humida	assecada
C	0,878**	0,769*	0,685*	0,706*
BMC	0,898***	0,930***	0,863**	0,878**
CHE	0,910***	0,844**	0,868**	0,888**
CHT	0,870**	0,782*	0,700*	0,737*
GLC			0,884**	0,876**
UR	0,893***	0,884**	0,983***	0,979***
BAA	0,836**	0,828**	0,965***	0,939***
Humitat	0,816**			
C.E	-0,688*			
pH (H ₂ O)	-0,705*	-0,689*	-0,894***	-0,883**
pH (KCl)	-0,752*	-0,699*	-0,892***	-0,865**
N	0,956***	0,920***	0,822**	0,853**
P	0,717*	0,827**	0,747*	0,772*
Mg	0,839**	0,749*	0,896***	0,880**
Na	0,779*	0,673*	0,880**	0,867**
K	0,752*			

(*** <0,001 ** <0,01 * <0,05)

Taula 3.28. Resultat de l'estudi de les correlacions parcials a carboni (C) constant de les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa determinades sobre mostra assecada: valor de R i la seva significativitat.

Paràmetres correlacionats	Correlació parcial a C constant
GLC-GAL	0,736*
GLC-UR	0,756*
GLC-BAA	0,729*
GLC-N orgànic	0,844**
GLC-P	0,853**
GAL-CHE	0,853**
GAL-UR	0,958***
GAL-BAA	0,904**
GAL-pH	-0,811*
GAL-pH potencial	-0,761*
GAL-Mg	0,743*
GAL-Na	0,715*

(*** <0,001 ** <0,01 * <0,05)

Les activitats GLC i GAL obtingudes a partir de la mostra assecada mantenen la majoria de les correlacions respecte a les de la mostra humida; només disminueix el nivell de significativitat en els casos de: GLC-C, GLC-CHT, GLC-CHE, i GLC-UR i GAL-PH real, potencial i tant GLC-Mg com GAL-Mg i es guanya pel cas GLC-P.

Amb els valors sobre mostra seca, ambdues activitats segueixen estant correlacionades entre sí; l'activitat GLC segueix presentant més alta correlació amb la BMC però ara ambdues activitats tenen correlacions similars amb el C. A C constant les correlacions d'ambdues activitats determinats sobre mostra assecada presenten un comportament molt similar a les determinades sobre mostra humida. Pel que fa a les tres correlacions que presenten les activitats específiques determinades sobre mostra humida es conserven només dues (GLC/C-C -0,693^{*}; GAL/C-GAL 0,931^{***}) quan es determinen sobre mostra assecada a l'aire.

3.5 DISCUSSIÓ

3.5.1 Comportament dels paràmetres

A partir dels resultats sobre la dispersió, la capacitat discriminant i les correlacions fem una discussió general i una discussió detallada dels resultats ordenada per paràmetres.

Els rangs de valors trobats en els sòls naturals catalans estudiats són similars als descrits en la bibliografia per a sòls naturals de la zona del Mediterrani. Els valors són més semblants quan es comparen sòls naturals amb el nivell de C similar (Miralles et al., 2007; Zornoza et al., 2007b; Zornoza et al., 2008a) i superiors als treballs de sòls naturals de zones més àrides i amb poca vegetació (García et al., 1994; García et al., 1997a, 1997b, 1997c; García et al., 2000; García et al., 2002, Bastida et al., 2006; Bastida et al., 2008b). En comparació als descrits com a sòls naturals de referència a Galícia, els sòls estudiats tenen molta menys matèria orgànica i els valors màxims trobats són més baixos especialment per l'activitat ureàsica i BAA (Trasar-Cepeda et al., 2000b; Trasar-Cepeda et al., 2008b).

Respecte de **la dispersió dels valors**, els coeficients de variació obtinguts són, a grans trets, superiors als que s'obtenen en altres estudis sobre sòls naturals donat que habitualment es comparen un conjunt de sòls naturals amb menor rang de valors de MO i de característiques generals més similars. L'alt grau de dispersió és conseqüència, doncs, de considerar com a un únic grup de sòls naturals la diversitat de tipus com sòls forestals, de prat i de zones més àrides amb baix grau de cobertura vegetal (Miralles et al., 2007). Cal tenir present que altres autors en estudis de qualitat de sòls naturals (en general prat, agrícola abandonat i forestal) detecten pels paràmetres bioquímics diferències entre ells (Saviozzi et al., 2001; Trasar-Cepeda et al., 2008b; Zornoza et al., 2008a). El fet d'estudiar sòls naturals de contingut en MO tan heterogeni ens ha portat a la necessitat d'estudiar també els valors relatius dels diferents paràmetres, expressats per unitat de C i constatar una disminució del rang de variació en tots els casos. La interpretació a partir de paràmetres relatius es recomana a la bibliografia, especialment per les activitats enzimàtiques (Nannipieri, 1994; Gil-Sotres, 2005) i tot i que és adoptat per alguns autors (Miralles et al., 2007; Trasar-Cepeda et al., 2008b) és més aviat poc freqüent la seva inclusió en estudis similars al nostre.

Respecte de **la capacitat diferenciadora** de les variables, globalment podem dir que els sòls naturals mostrejats es poden diferenciar més a través del seu contingut en C i carbohidrats (CHT i CHE) que pels seus valors d'activitats enzimàtiques; si traiem, però, la influència del contingut en MO, es diferencien pels valors d'activitats específiques, especialment GLC/C i GAL/C i per la proporció en CHE (CHE/C i CHE/CHT). El primer dels resultats estaria d'acord amb Zornoza et al. (2007a) on troben que el contingut en MO total dels sòls estudiats pesa molt a l'hora de deduir un únic índex de qualitat i ho resolen obtenint dos models diferents per dos grups de sòls atenent als dos nivells de C diferents. Per altra banda Zornoza et al. (2007b) també obtenen major capacitat discriminant pels continguts en C total i C-soluble en aigua d'entre la resta dels paràmetres bioquímics estudiats. La segona apreciació posaria de manifest que en els sòls estudiats, tot i tenir en comú les característiques de sòl natural, el fet de tenir nivells molts diferents de MO fa que a més a més es diferencien pel tipus de MO especialment la proporció de MO làbil relacionada amb l'aport de restes vegetals, o sigui amb el grau i tipus de recobriment vegetal.

Com a **comportament general** dels paràmetres bioquímics estudiats podem dir que presenten correlacions altes i positives entre sí i alhora una gran dependència del contingut en MO del sòl així com del contingut en biomassa. Aquesta relació entre paràmetres és un resultat esperable ja que molts estudis de sòls naturals també troben aquestes correlacions (García et al., 1994; García i Hernández, 1997c; Trasar-Cepeda et al., 1998; Trasar-Cepeda et al., 2000b; Bastida et al., 2006, Miralles et al., 2007; Zornoza et al., 2007b). Aquest resultat està d'acord amb el lligam que existeix entre el contingut en MO del sòl i les transformacions bioquímiques i biològiques que s'hi donen i respon al concepte d'equilibri entre propietats que és la base de la construcció dels índexs de qualitat multiparamètrics. En contrast amb aquest resultat alhora trobem resultats d'altres treballs on es detecta, en sòls que han sofert algun tipus d'alteració, pèrdua del grau de correlació entre els paràmetres i que s'interpreta com una mostra de desequilibri entre el conjunt de propietats (Ceccanti i Pezzarosa, 1994; García et al., 1997b; Gianfreda et al., 2005; Trasar-Cepeda et al., 2008a).

Respecte de **les correlacions** detectades recordem que en general el contingut en carbohidrats apareix més correlacionat amb els continguts de C i N orgànic del sòl i les activitats enzimàtiques més amb la biomassa i el N orgànic que amb el C; a més a més, no totes les activitats enzimàtiques estan igual de lligades al contingut en MO però totes quatre estan més lligades a la fracció làbil (CHE) que a la total (CHT). Hem de considerar aquest resultat com a esperable si pensem que els carbohidrats són un component important de la MO del sòl i que els enzims són sintetitzats per la biomassa i com a tals formen part de la fracció més activa de la MO del sòl. Per una altra banda, és un resultat coincident amb el de Zornoza et al. (2007b) que també troba millor correlació de les activitats GLC i UR amb la fracció soluble de carboni que amb la total i ho atribueix a què les activitats enzimàtiques estan involucrades en la conversió d'uns components específics de la MO més que amb la MO total. En un treball nostre (Jiménez et al., 2012) on estudiem els resultats dels deu sòls naturals a través de l'anàlisi clúster, trobem que les variables C, CHE, CHT, GLC i BMC pertanyen a un mateix grup a l'hora d'explicar les característiques bioquímiques.

El contingut en carboni orgànic és un paràmetre bàsic de caracterització dels sòls i alhora un paràmetre de qualitat també bàsic i important (Gregorich et al., 1997) i així hem pogut constatar que s'inclou de forma sistemàtica en els estudis de sòls naturals. En el nostre cas els continguts de C oscil·len entre 0,8 i 10 %; és un rang ampli

d'acord a la varietat sòls catalans (Alcañiz et al., 2005) i representa un rang de valor normal segons altres estudis de sòls naturals de la zona mediterrània, si exceptuem els valors més extrems per la banda alta. Com a paràmetre de qualitat trobem que es caracteritza per no ser dels més dispersos i per presentar una alta capacitat discriminant. En els estudis de Zornoza et al. (2007a i 2007b) també apareix com a paràmetre amb alta capacitat discriminant.

El contingut en carbohidrats totals entra en el rang general de valors de carbohidrats totals en sòls que pot oscil·lar entre 1 i 20 % (Folsom et al., 1974; Chershire, 1979; Lowe, 1978). Respecte a altres estudis semblants la comparació és difícil ja que, a pesar de tenir la consideració d'indicador de qualitat biològica del sòl d'acord a Gregorich et al. (1997), és poc freqüent la determinació del contingut total. Ha resultat ser el paràmetre més lligat al contingut en C del sòl i aquesta dependència comporta que la proporció CHT/C sigui molt semblant (4,7-8,6 %) entre els diferents sòls. Aquest tret és característic d'aquest paràmetre i a més hem comprovat que com a conseqüència, la variable relativa (CHT/C) té molt poca capacitat discriminant. De fet la bibliografia assenyala que el contingut en carbohidrats de sòls diferents és poc variable i ho és més el perfil de composició en monosacàrids (Chershire, 1979; Lowe, 1978). Podríem dir que és un paràmetre que aporta poca informació donat que el valor absolut està molt d'acord amb el de C i en conseqüència el valor relatiu aporta molt poques diferències. La correlació directa trobada entre humitat i CHT podria estar relacionada amb el caràcter hidròfil dels carbohidrats i/o amb el seu paper d'estabilitzador dels agregats (Lowe, 1978; Martens i Frankerberger, 1991 i 1992; Martens, 2000).

El contingut en carbohidrats extractables presenta nivells superiors als valors que la bibliografia aporta en estudis de sòls de contingut semblant en MO; cal però tenir en compte que en la majoria d'estudis és més freqüent determinar els carbohidrats solubles en aigua (García et al., 1997b; Saviozzi et al., 2001; Caravaca et al., 2002; García et al., 2002; Bastida et al., 2006). El diferent contingut en CHE respon a les diferències en contingut en MO dels sòls, però alhora també amb el contingut en biomassa. Aquest fet està d'acord amb el significat d'aquest paràmetre com a indicador de C fàcilment disponible pels microorganismes que condicionen la biomassa i/o l'activitat microbiana (Badalucco et al., 1990; Badalucco et al., 1992; DeLuca i Keeney, 1993; Joergensen et al., 1996; García et al., 2000).

El contingut en CHE relatiu al C (CHE/C) és un valor molt baix (només representa 0,39 %) és més variable que el quocient CHT/C i resulta ser dels paràmetres relatius amb més capacitat discriminant. Aquest resultat indica que els sòls naturals es diferencien, a més de pel seu contingut en MO total, per la proporció present en MO làbil, la qual cosa estaria relacionada amb el diferent recobriment vegetal dels sòls mostrejats (García et al., 1997a). La proporció CHE/C és més alta quan més baix és el contingut en MO (BL, LG i IG amb l'excepció de la singularitat de la mostra PN); aquest efecte de concentració dels carbohidrats extractables en la MO estaria relacionada amb la necessitat de supervivència de la biomassa i d'un mínim d'activitat microbiana en sòls de baix contingut en MO. Marando et al. (2012) troben també, per les mateixes mostres, que en els sòls de més baix contingut en MO la proporció de carboni orgànic extraïble és significativament superior. També trobem que la correlació entre les dues variables CHT i CHE s'explica a través del C la qual cosa fa que el quocient CHE/CHT tingui un comportament molt similar al CHE/C.

Resumint veiem que CHT evidencia una característica de similitud entre sòls naturals i en canvi CHE és més útil per posar de manifest diferències entre ells. Aquest fet estaria d'acord en la freqüència més alta en que el paràmetre CHE (junt amb el C-soluble) és inclòs en estudis de qualitat de sòls (Ghani et al., 2003; Bongiovanni et al., 2006).

No totes les **activitats enzimàtiques** estan igual de lligades al contingut en MO, si que ho estan, però, en grau semblant a la biomassa i totes quatre estan més lligades a la fracció làbil de CHE que a la total CHT, resultats que són semblants a d'altres treballs similars (García et al., 1997b, Trasar-Cepeda et al., 1998, Zornoza et al., 2007b). Existeix un conjunt format per les tres activitats GAL, UR i BAA que estan molt relacionades entre sí i es relacionen amb l'activitat GLC a través de la biomassa i no a través del carboni; aquest resultat fa pensar que aquestes tres activitats podrien actuar sinèrgicament en certs ecosistemes on existís una biomassa o una MO específica.

L'activitat enzimàtica β -glucosidasa és l'activitat més directament relacionada amb el contingut total de MO i alhora presenta alta correlació amb la biomassa. Ambdós resultats estan d'acord amb l'associació d'aquesta activitat amb el cicle del carboni i en la seva funció de proporcionar sucres de baix pes molecular com a font d'energia pels microorganismes (Tabatabai, 1982; Eivazi i Tabatabai, 1988). Alhora està d'acord també amb el fet que aquesta activitat intervingui en la confecció dels índexs de qualitat del sòl on la variable de predicció és el contingut en carboni orgànic del sòl (Zornoza et al., 2007a, Zornoza et al., 2007b). García et al. (1994) també troben aquesta correspondència entre contingut en MO i l'activitat GLC i interpreten que en sòls amb baix contingut en MO (sòls de zona àrida amb excés de sals o amb guix) un valor baix d'activitat GLC indicaria menys capacitat de mineralització i una reducció del cicle del C.

Tanmateix, a través de l'estudi de GLC/C, hem constatat que l'augment en MO no suposa augment proporcional de la MO amb activitat GLC. Els resultats indiquen que l'activitat β -glucosidasa d'un sòl va lligada al contingut en MO encara que en augmentar el contingut de MO aquesta perd activitat enzimàtica β -glucosidasa. L'activitat GLC és indicadora del potencial de descomposició de la MO del sòl i proporcionalment sembla més alta en els sòls amb menys MO. Això podria estar relacionat amb el fet que sòls pobres en MO son capaços de mantenir aquesta capacitat de mineralització, en el seu paper crític pel manteniment de l'activitat microbiana o el seu paper clau de l'activitat GLC de proporcionar sucres per a l'activitat biomassa. Aquest resultat és coherent amb el mateix comportament que el paràmetre CHE/C que també presenta relació inversa amb la MO.

Ceccanti i Pezzarossa (1993) i Masciandaro i Ceccanti (1999) troben un comportament semblant quan comparen les activitats específiques de sòls agrícoles i naturals i ho atribueixen al fet que són els sòls amb menys MO són capaços de preservar l'activitat dels complexos humus-Enzim que representen la base de la resiliència dels sòls.

De la mateixa manera hem de tenir present el treball de Trasar-Cepeda et al. (2008b) on fan una exposició en profunditat de la relació entre l'activitat específica GLC/C i el contingut en C tant en sòls naturals com en altres grups de sòls afectats per activitat antròpica. Aquests autors no troben relació inversa entre aquestes variables si comparen només els sòls naturals de Galícia, molt semblants entre ells i d'alt contingut en carboni orgànic. Si que detecten, però, aquesta relació inversa en altres tipus de sòls no naturals amb menys MO. La hipòtesi dels autors (un cop descartada

l'opció d'una resposta d'acceleració del metabolisme dels microorganismes estressats) es centra en l'existència en aquests sòls d'un mecanisme ecològic per mantenir l'activitat metabòlica del sòl, com l'estabilització dels enzims.

L'activitat β -glucosidasa absoluta i específica és el paràmetre que presenta menys dispersió i és la que més permet diferenciar els sòls o sigui que és poc dispers però té alta capacitat discriminant. En altres treballs també destaca com l'activitat enzimàtica amb menys dispersió (Trasar-Cepeda et al., 2000b, Trasar-Cepeda et al., 2008b, Zornoza et al., 2007b). Respecte de la capacitat discriminant hem de fer referència a diferents estudis que han trobat en la β -glucosidasa una activitat especialment sensible per detectar diferències entre tractaments (Miller i Dick, 1995; Bandick i Dick, 1999; Monreal i Bergstrom, 2000; Badiane et al., 2001; Knight i Dick, 2004).

Respecte del comportament de l'activitat β -glucosidasa a través de l'estudi d'assecat, podem considerar que l'activitat enzimàtica està en gran part estabilitzada ja que es mantenen la majoria de les correlacions que en la mostra humida. Això estaria d'acord amb diversos resultats bibliogràfics que consideren la β -glucosidasa un enzim amb un important component d'activitat extracel·lular (Hayano i Katami, 1977; Knight i Dick, 2004; Trasar-Cepeda et al., 2007).

L'estudi de correlacions indica per una banda que la relació entre l'activitat GLC i els carbohidrats (CHT i CHE) és indirecta ja que s'explica a través dels continguts en carboni i biomassa. En aquest sentit a la bibliografia trobem que i) Turner (2002) considera que la síntesi de l'enzim estaria induïda pels productes de la degradació de la cel·lulosa, i ii) García et al. (1997b) argumenten que la MO làbil actua com a subministradora de components energètics pels microorganismes per a què puguin sintetitzar els enzims. Per altra banda, la relació entre GLC i les altres activitats és també indirecta, en aquest cas a través de la biomassa. Pel que fa a les activitats UR i BAA, aquest és un resultat esperable, ja que actuen sobre substrats diferents a l'estar involucrades en el cicle del N. Si les activitats GLC i GAL estan correlacionades a través de la biomassa i no a través del carboni això significa que hi ha d'haver un cert tipus de biomassa per a la qual a més activitat GLC, més activitat GAL; podem pensar doncs que l'activitat GAL podria ser que depengués més d'un substrat específic més lligat a un tipus de MO o de biomassa tal com apuntem més endavant.

Els resultats de **l'activitat enzimàtica β -galactosidasa** estan d'acord amb els dels autors Eivazi i Tabatabai, (1988) i Bandick i Dick (1999) que determinen el conjunt de glicosidases en els sòls i troben valors d'activitat GLC són sempre superiors als de l'activitat GAL. El comportament de l'activitat GAL indica que està relacionada, més que amb el total de MO, amb un tipus de MO d'acord a la correlació positiva entre els paràmetres GAL i GAL/C. Les mostres on l'activitat GAL/C pren els valors més elevats corresponen a les tres mostres de sòls forestals de pH àcid (MN, CR i LT) i aquests valors extrems són els que expliquen els alts valors de dispersió d'aquest paràmetre. Aquest resultat està d'acord amb els que troben Jolivet et al. (2006) on la proporció de galactosa és més elevada en sòls forestals àcids que en sòls de tipus prat. Per altra banda, l'activitat GAL presenta una relació directa amb altres activitats UR i BAA (que no s'explica pel C ni per la biomassa), fet que pot ser indicatiu de que actuen sinèrgicament sobre un mateix substrat, anàlogament al que suggereixen alguns autors en altres casos (Sinsabaugh, 1994 i 2002; Trasar-Cepeda et al., 2000b). Els dos resultats anteriors semblen indicar que en aquests sòls forestals de pH àcid pot ser important la proporció d'una MO, i/o una comunitat microbiana singular, que es caracteritzaria per la presència de galactosa en components mixtes polisacàrid-peptid

o proteïna. En aquest sentit Joergensen et al. (1996) afirmen que la matèria orgànica de sòls àcids presenta material vegetal poc descomponible i on pot ser important l'excreció de polisacàrids extracel·lulars. Els dos punts següents reforcen la nostra hipòtesi: i) els carbohidrats procedents de microorganismes tenen una composició més complexa que els d'origen vegetal, i són més rics en compostos com les glicoproteïnes on la galactosa, junt amb hexosamines i àcids urònics, és un dels seus components, i ii) les glomalines són un tipus de glicoproteïnes dels fongs micorízics (Nichols i Wright, 2004).

Igual que per l'activitat GLC, la relació entre l'activitat GAL i els carbohidrats és indirecta a través del contingut en MO i de biomassa i no per l'efecte directe substrat-activitat. La correlació entre l'activitat GAL i Mg podria explicar-se pel paper del Mg com a cofactor o activador, encara que la bibliografia només ho assenjala per a l'enzim α -galactosidasa. De la mateixa manera que l'activitat GLC el comportament de l'activitat GAL amb l'assecat del sòl és indicatiu que es tracta d'un enzim amb un important component d'enzim estabilitzat; que hi hagi major número de mostres on es detecta pèrdua d'activitat GAL amb l'assecat està d'acord amb els resultats de Klose i Tabatabai (2002) ja que afirmen que l'activitat GAL presenta més dificultat per l'estabilització.

Pel que fa a les **activitats enzimàtiques ureàsica i proteolítica de BAA** els resultats indiquen que trobem menys diferències entre sòls en base a aquestes dues activitats respecte d'altres paràmetres. Podríem dir que existeix més diferències en la capacitat de degradació en l'etapa final dels compostos de carboni que no pas en el procés de degradació de molècules nitrogenades amb baix pes molecular. Aquest resultat és coincident amb el de Trasar-Cepeda et al. (2000b) on les activitats UR i BAA expliquen un percentatge de variabilitat entre sòls naturals molt petit. L'activitat UR és l'activitat enzimàtica més relacionada amb la biomassa i l'activitat proteolítica de BAA la menys lligada al contingut total de MO.

En general la vegetació fa incrementar les activitats enzimàtiques i aquestes disminueixen en paral·lel a la degradació de la coberta vegetal (Bastida et al., 2006); d'acord però, als estudis de García et al. (1997b i 2002), les activitats BAA i UR són més dependents del tipus de vegetació que no pas del grau de recobriment vegetal. Els autors afirmen també que l'activitat BAA està menys correlacionada amb la resta de paràmetres i a més és la que menys s'afecta per la devegetació.

Pel que fa a l'activitat BAA igual que l'activitat GAL, sembla relacionada amb el tipus de MO dels sòls forestals de pH àcid i estaria implicada de la mateixa forma que s'ha indicat anteriorment.

Les variacions interanuals dels paràmetres són globalment més acusades per les activitats enzimàtiques GLC i UR que pel contingut de carboni i l'activitat BAA és la que menys acusa l'efecte any de mostreig. Aquest resultat corrobora que les activitats són més sensibles als canvis temporals (i també locals donada la significativitat de la interacció any x sòl) àmpliament assenyalada a la bibliografia (Dick, 1994; Nannipieri, 1994; Bastida, 2006 i 2008a). Tant el C com els enzims perden capacitat diferenciadora en considerar els anys de mostreig, però així com el C manté l'alta capacitat discriminant que es troba en el mostreig d'un sol any, l'activitat GLC la perd i s'igualava a la dels altres enzims. Bastida et al. (2006) estudien les variacions temporals de diversos paràmetres en sòls naturals i també troben major variabilitat estacional en les activitats enzimàtiques respecte al contingut en MO i els hi atribueixen l'avantatge de tenir més capacitat per detectar els canvis. El comportament de l'activitat BAA, que

presenta menys variabilitat temporal, es podria atribuir al seu major grau d'estabilització en el sòl, la qual cosa estaria d'acord a la importància del component extracel·lular que assenyala la bibliografia per aquest enzim (Dick, 1994; Ladd, 2003).

3.5.2 Diferències bioquímiques entre els sòls naturals

En aquest apartat relacionem els resultats de la separació de mitjanes dels paràmetres bioquímics amb les característiques generals de les mostres derivades de la seva localització.

Els resultats indiquen que el factor sòl estudiat surt sempre molt significatiu en l'anàlisi de la variància i que per la separació de mitjanes trobem entre 10 i 6 sòls diferents (grups desconnectats o sense intersecció) a través dels paràmetres absoluts i d'entre 6 i 3 grups a través dels paràmetres relatius al contingut en C. Aquest fet creiem que és conseqüència del tipus de mostreig realitzat que segueix com a objectiu d'abastar la gran heterogeneïtat dels sòls de Catalunya.

Per a la interpretació de les diferències entre sòls, considerem primer les condicions externes que determinen el nivell de MO dels sòls. Així podem fer una classificació en 3 nivells de C: Un grup de 5 sòls (LG, BL, SG, IG i LT) amb un contingut en C com a molt del 3 %, un segon grup de 4 sòls (VC, OR, CR i MN) amb valors entre 3-8 % i una sola mostra (PN) que destaca de la resta per tenir el valor més alt (10 %). Més en detall i considerant la descripció de les mostres podem dir:

- a. En el grup de mostres de baix contingut en MO, trobem els sòls BL, LG i IG que són carbonatats localitzats en la Depressió Central i la zona més àrida; a més destaca el sòl BL pel contingut en guix i el sòl LG com a sòl ric en sals solubles. A aquest grup també pertanyen la mostra LT que és un sòl forestal però en el qual l'alt percentatge d'arena ha limitat el contingut de MO i el sòl SG que també és forestal però de ribera i sotmès a oscil·lacions del règim fluvial.
- b. En el grup de mostres amb els valors més alts en MO, trobem cinc mostres que corresponen a sòls forestals i el sòl VC que tot i ser de tipus prat, s'ha desenvolupat sota condicions climàtiques corresponents a la zona més humida.
- c. Finalment cal destacar les característiques singulars de la mostra de sòl forestal (PN) de roca calcària però descarbonatada en una zona seca i plana, però amb un microclima humit que ha permès desenvolupar un horitzó orgànic.

Considerant el diferent nivell de MO en els sòls naturals i l'alta correlació trobada entre les variables bioquímiques i el contingut en C orgànic, hem d'esperar que un alt contingut en MO es relacioni amb alt contingut en CHT i CHE i alta activitat enzimàtica i a l'inrevés. Tanmateix l'estudi de les característiques bioquímiques ha permès diferenciar alguns sòls com s'exposa a Jiménez et al. (2012) d'acord als resultats de l'anàlisi clúster i que resumim en els següents punts:

- 1r. La relació directa entre MO i el contingut en carbohidrats (CHT i CHE) es dona en les mostres de sòls forestals i amb un alt contingut de C orgànic (superior al 3 %) (**PN, CR, MN i OR**). D'entre aquestes 4 mostres trobem que i) en el cas del sòl forestal **PN** es posa de manifest la singularitat d'aquesta mostra relacionada amb el desenvolupament d'un horitzó orgànic, i ii) pels sòls **PN i MN** els valors significativament més alts de la relació CHT/C poden indicar que es tracta de sòls amb aportacions importants de material vegetal o bé de condicions ambientals de

poca descomposició causada per la seva situació en zones fredes (Lowe 1978) o bé per l'associació íntima amb una grandària de partícula fora de l'abast de la descomposició microbiana (Sanger et al., 1997; Marando et al., 2012).

2n. Dins del grup de sòls forestals constatem que el grau d'activitat enzimàtica està influenciat pel tipus de vegetació i per les característiques de la roca mare, ambdós factors poden incidir en el perfil d'activitats enzimàtiques i així destaquem:

- a. En la mostra de sòl forestal **OR** -desenvolupat sobre roca calcària descarbonatada- el tipus de vegetació (bosc de pins) rica de material més lignificat que comporta manca de substrat degradable, justifica els valors baixos d'activitats enzimàtiques especialment l'activitat GLC/C. Aquests resultats estan d'acord amb diferents autors sobre incidència del tipus de vegetació en l'activitat enzimàtica del sòl i en el contingut i velocitat de degradació dels carbohidrats (Folsom et al., 1974; Martens i Loeffelmann, 2002; Miralles et al., 2007; Bastida et al., 2008a).
- b. El sòls **MN, CR i LT**, que són els sòls forestals desenvolupats en material no calcari, presenten una especificitat bioquímica que es caracteritza per un alta activitat GAL/C i BAA/C que podrien estar involucrades en la degradació de substrats complexos carbohidrat-proteïna.

3r. La MO dels sòls amb continguts més baixos de MO (**BL, SG i LG**) es caracteritza per l'alta proporció de carbohidrats extractables (MO làbil) i també més alta activitat específica GLC/C. Aquests resultats estan d'acord amb els valors més alts de les relacions BMC/C, C-extraïble/C i qCO_2 per les del grup **BL, SG i LG** i els valors més baixos en les mostres **PN, CR, MN i OR** de Marando et al. (2012) i Jiménez et al. (2012) sobre els mateixos sòls.

Considerant el conjunt de valors dels tres anys de mostreig es dilueixen molt les diferències entre sòls detectades a través dels resultats d'un sol mostreig la qual cosa posa de manifest l'existència d'una homogeneïtat real entre els 10 sòls naturals pel que fa als paràmetres bioquímics estudiats. Aquest resultat es pot interpretar d'acord a les consideracions dels sòls naturals com a sòl clímax, sòls on a llarg termini s'assoleix un equilibri amb les seves condicions pròpies de clima i vegetació (Dick, 1994; Trasar-Cepeda et al., 1998; Gil-Sotres et al., 2005; Miralles et al., 2007).

Pel conjunt de mostres, les variacions anuals de les dues activitats enzimàtiques GLC i UR presenten la mateixa tendència, ambdues activitats presenten disminució del rang i dels valors l'últim any. Aquest fet, d'acord amb els resultats de Sardans i Peñuelas (2005), podria estar relacionat amb les dades del clima on observem una tendència a ser progressivament més càlid i sec entre els anys 2004 i 2006.

3.5.3 Efecte pretractament de la mostra

L'efecte del pretractament d'assecat globalment manté el *ranking* entre mostres, per tant la diferenciació de mostres de sòls naturals a través de les activitats enzimàtiques GLU i GAL es pot fer tant a partir de mostra humida com a partir de mostra assecada; aquest resultat està d'acord amb els resultats d'altres autors (Bandick i Dick, 1999, Zornoza et al., 2006). Si tenim present que l'activitat mesurada a partir de mostra

assecada es correspon a l'activitat més estabilitzada -ja que l'associada a la biomassa existent i als enzims lliures es perd pràcticament del tot en l'assecat (Dick, 1994; Bonmatí et al., 2003) - podem afirmar que majoritàriament l'activitat associada a la biomassa és poc important. En el mateix sentit interpretem que la disminució del grau de correlació entre l'activitat GLC i les variables C i CHT associada a l'assecat, podria indicar que l'activitat GLC més estabilitzada està menys relacionada amb el contingut total de MO. Pel que fa a l'activitat GAL probablement està menys protegida que GLC i està d'acord amb l'estudi de Marando (2013); aquest treball situa els sòls VC, IG, PN i SG, on l'assecat a l'aire va disminuir significativament l'activitat GAL, entre els que van manifestar el pols més alt de CO₂ i per tant els que presenten MO més degradable.

L'anàlisi detallada de la influència de l'assecat permet veure que ha resultat poc uniforme ja que no és igual per les dues activitats, i que, si es dona, pot ser positiva o negativa depenent del sòl i de l'any de mostreig. Aquesta variabilitat està d'acord amb el diferent grau d'estabilització en els dos enzims segons Klose i Tabatabai (2002) i Knight i Dick (2004) que troben que el percentatge de component estabilitzat de l'activitat enzimàtica GLC depèn del sòl.

Contràriament, Eivazi i Tabatabai (1990) troben que l'assecat incrementa les activitats de les 4 glicosidases; aquests autors atribueixen l'increment a què la rehidratació de la mostra assecada que té lloc en la incubació trenca els agregats i augmenta l'accessibilitat dels enzims pels substrats. En aquest sentit creiem que els resultats de Zornoza et al. (2007c), on detecten increment en els valors de carboni soluble en mostres assecades, podrien justificar l'increment de l'activitat β -glucosidasa per l'augment de substrat disponible. També Tate III (2002) adverteix de la importància de l'alteració de les propietats físiques del sòl que poden comportar inducció de l'activitat del sòl per augment de l'accessibilitat de la MO. Per altra banda, els treballs de Bustos i Pérez-Mateos (2000) i Marx et al. (2005) posen de manifest la desigual distribució de l'activitat GLC en funció de la grandària de partícula.

Respecte de la variabilitat introduïda per l'any de mostreig en l'efecte de l'assecat, que hem relacionat amb la humitat de camp de la mostra, sembla ser coherent si tenim en compte que en l'activitat mesurada a partir de mostra humida influeix el component de l'activitat associada a la biomassa, que depèn de factors temporals propis de cada mostra. Aquest resultat el podem relacionar amb els de Zornoza et al. (2007c); aquests autors estudien l'efecte de l'assecat en la biomassa, la respiració i el carboni soluble i detecten que els efectes són menors en les mostres que corresponen amb un clima és més càlid.

En aquest sentit podríem postular que com més alt sigui el valor de la humitat de la mostra en el moment de sotmetre-la a l'assecat, major seria la pèrdua de l'activitat GLC ja que major importància tindria el component lligada a l'activitat de la biomassa. Pensem que aquest resultat podria estar relacionat amb el mecanisme de resistència de l'activitat enzimàtica β -glucosidasa apuntat anteriorment o bé amb els resultats de Zhang et al. (2011) sobre la sensibilitat de l'activitat β -glucosidasa i dels paràmetres cinètics en diferents règims d'humitat.

3.6 CONCLUSIONS

- I. Els valors dels paràmetres bioquímics, carbohidrats extractables i carbohidrats totals i de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa, en els sòls naturals de Catalunya estudiats, són similars als d'altres sòls naturals de zones de clima mediterrani.
- II. Els valors de carbohidrats extractables i carbohidrats totals i de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa en els sòls naturals de Catalunya estudiats estan altament correlacionats i presenten una variabilitat que és molt dependent del contingut de matèria orgànica del sòl. D'entre les activitats enzimàtiques, l'activitat β -glucosidasa és la més dependent del contingut total de matèria orgànica i l'activitat proteolítica de BAA la que menys.
- III. Certes característiques dels sòls naturals com el tipus de sòl, de vegetació o de roca mare condicionen algunes propietats bioquímiques de la matèria orgànica.
- IV. Els paràmetres que han resultat ser més útils per a la diferenciació entre els sòls naturals han estat el contingut en carbohidrats extractables i l'activitat β -glucosidasa, així com els seus respectius valors relatius al contingut en carboni orgànic.
- V. Les diferències en les activitats enzimàtiques entre els sòls naturals detectades per un mostreig minven quan es consideren els mostreigs en anys consecutius.
- VI. Les diferències entre els sòls naturals en funció de les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa també es pot esbrinar si aquestes activitats enzimàtiques es determinen a partir de la mostra de sòl assecada a l'aire.



4

**Caracterització Bioquímica de Mostres Sòl-Fang
Procedents de L'experimentació en Lisímetres i en
Parcel·les**



4 CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA DE MOSTRES SÒL-FANG PROCEDENTS DE L'EXPERIMENTACIÓ EN LISÍMETRES I EN PARCEL·LES

4.1 ANTECEDENTS: EFECTES DE L'APLICACIÓ DE FANGS DE DEPURADORA SOBRE LA QUALITAT BIOQUÍMICA DEL SÒL

Tal com hem vist a la introducció, en general podem dir que les activitats enzimàtiques del sòl, així com l'activitat microbiana, augmenten amb l'aplicació al sòl de residus orgànics com els fangs de depuradora degut a l'increment de MO i de la disponibilitat de nutrients (Martens et al., 1992; Dick, 1994; Singh i Agrawal, 2008). D'acord amb Nannipieri (1994), però, hem de tenir present les puntualitzacions següents: i) l'increment de l'activitat dels enzims del sòl es dona encara que els materials continguin contaminants com metalls pesants o tòxics orgànics en concentracions inhibidores; ii) els resultats són contradictoris en el sentit que l'efecte en un enzim i en un sòl no és el mateix en un altre sòl, i iii) quan hi ha addicions successives l'efecte ja no és tan acusat ja que les activitats o bé poden quedar inhibides per mecanisme feed-back, o bé la presència d'enzims immobilitzats fa que els microorganismes no necessitin sintetitzar més enzims. Les primeres experiències respecte de la influència de l'aplicació de fangs de depuradora sobre les activitats enzimàtiques del sòl són dels anys 80 (Frankerberger i Dick, 1983; Bonmatí et al., 1985). Actualment la bibliografia recull una gran diversitat d'experiències donada la multiplicitat d'aplicacions al sòl dels diferents tipus de materials rics en matèria orgànica; aquests assaigs generen un ampli espectre de resultats sobre múltiples activitats enzimàtiques i d'altres paràmetres bioquímics.

Per a confeccionar aquest apartat d'antecedents, el criteri de selecció ha estat triar els resultats d'experiències sobre l'efecte de l'aplicació bàsicament de fangs de depuradora, i també de compost de RSU, i sobre els paràmetres que són del nostre interès (activitats enzimàtiques i carbohidrats) i dividim els resultats separatament per experiències de proves in vitro i proves de camp. Indiquem per cada experiència la dosi assajada i el període controlat; val a dir que, en el repàs bibliogràfic, hem constatat que la dosi de material orgànic aplicat sovint no s'especifica amb unes unitats prou clares, i això ens ha impedit obtenir una visió prou acurada dels resultats.

4.1.1 Resultats de proves in vitro: experiències d'incubacions sòl-fang en condicions controlades

➤ Les primeres experiències in vitro sobre efectes de l'aplicació de fangs posen un especial èmfasi en la incidència dels metalls pesants sobre els paràmetres bioquímics

Bonmatí et al. (1985) estudien l'efecte de fang aeròbic i anaeròbic (dosi de l'1 %, equivalent a 50 t m.s/ha, i 112 dies) sobre les activitats enzimàtiques ureasa i fosfatasa. Comproven que la inhibició per metalls, atribuïda en estudis anteriors pels dos enzims, queda emmascarada per l'aportació de nutrients i MO. Conclouen que els fangs són un bon material per augmentar el contingut en C i N total i P extractable del sòl i, en el cas de fang anaeròbic, el nivell de les activitats enzimàtiques.

Pel que fa a la influència dels fangs en l'activitat β -glucosidasa Eivazi i Zacaria (1993) estudien, a escala reduïda (1-10 % m.s=5-100 t/ha i 30 dies), l'efecte de l'augment de la dosi de fang sobre aquesta activitat. Aquests autors treballen amb dos fangs de composició diferent, amb nivells alt i baix de metalls pesants i amb tres sòls de característiques diferents. La inhibició de l'activitat s'observa a dosis baixes i, depenent del sòl i del fang, oscil·la entre 17 % i 66 %; és més alta pel fang que conté més metalls i pel sòl amb menys argila. A altes dosis s'incrementa l'activitat enzimàtica entre 1-4 vegades respecte del control i els valors màxims d'activitat s'assoleixen als 7 dies i pel sòl més ric en MO i argila. Els autors atribueixen l'increment a l'alta activitat microbiana en el fang, més que a l'aport d'enzim, i afirmen que quan s'apliquen altes quantitats de fang al sòl el subministrament addicional de nutrients i matèria orgànica del fang pot emascarar l'efecte inhibitor dels metalls pesants; a més a més, també consideren que un sòl amb substàncies húmiques i alt contingut d'argila i capacitat de bescanvi, pot representar un efecte protector en la reducció dels efectes adversos dels metalls sobre l'activitat β -glucosidasa.

Moreno et al. (1999) fan un seguiment de barreges sòl-fang (dos fangs anaerobis compostats, dues dosis 20 i 80 Mg/ha i 120 dies) per avaluar l'efecte de les concentracions diferents en Cd (2-815 mg/Kg). Controlen el C i C-soluble, 4 activitats enzimàtiques (β -glucosidasa, proteolítica-BAA, fosfatasa i ureasa) biomassa i respiració. En general, l'aplicació de fang, independentment del nivell de Cd, incrementa el C i les substàncies húmiques i àcids fúlvics del sòl. L'efecte del Cd sobre les activitats és diferent segons l'enzim considerat: la deshidrogenasa s'afecta negativament, la β -glucosidasa i proteolítica-BAA sembla que no s'afectin i la ureasa i fosfatasa són estimulades. L'activitat β -glucosidasa a dosis altes de fang és més alta que el control fins al final de l'experiència i independent del nivell de Cd; a dosis baixes l'efecte inhibitor del Cd es posa de manifest pel nivell alt de Cd i al final de període controlat. Per altra banda també es detecta que el Cd causa estímulo (estrès) en l'activitat microbiana ja que els valors de qCO_2 són superiors als del control.

➤ Alhora trobem també a la bibliografia, experiències similars que es centren en la cinètica de mineralització de residus amb diferent grau de maduresa de la matèria orgànica aportada

Hattori i Mukai (1986) i Hattori (1988) es centren en el procés de mineralització i el relacionen amb la composició de la MO dels fangs. Estudien el procés de descomposició de la matèria orgànica en barreges sòl-fang amb cinc tipus de fang (dosi 1-5 % m.s de fang i 60 dies). Controlen el procés de mineralització del C i del N, diverses activitats enzimàtiques i la població microbiana. Pel que fa als resultats del percentatge de mineralització del C, oscil·la entre 20-44 % depenent del tipus de fang i en la dosi alta és lleugerament superior; la mineralització del N no varia tant entre fangs i oscil·la entre 15-28 %. A través de l'estudi de correlacions afirmen que el contingut en matèria mineral i lignina del fang dificulta la seva descomposició. La mineralització del N es correlaciona positivament amb les relacions proteïna/MO i amb N-orgànic/MO i negativament amb la relació C/N del fang. La mineralització arriba al màxim als 3 dies i després baixa ràpidament; durant la incubació baixen les fraccions majoritàries (proteïna, lignina i lípids) i també hemicel·lulosa i creix la proporció de sucres solubles i cel·lulosa. Totes les activitats enzimàtiques augmenten amb l'aplicació dels fangs i el grau d'increment depèn de les característiques del fang. Afirmen que el rol de les activitats enzimàtiques en la descomposició de la MO dels

fangs no queda clar excepte per l'activitat proteolítica que assoleix el màxim entre els 3-7 dies i decreix molt ràpidament igual que la càrrega bacteriana. Conclouen que els bacteris que produeixen activitat proteolítica tenen un paper important en els primers estadis de descomposició i que es dona una successió ja que atribueixen als fongs un paper més important en la descomposició gradual en la segona fase, que assoleix un màxim al cap de 2-3 setmanes i es manté estable.

Pascual et al. (1998) descriuen dues etapes per la respiració d'un sòl amb incorporació de residus frescos (RSU i fang) i compostats, una inicial ràpida i una segona lenta; detecten més mineralització en el cas dels materials frescos que en els dels madurs i a l'augmentar la dosi.

Bernal et al. (1998) fan un seguiment d'incubacions amb diferents tipus de residus orgànics (mostres procedents de cocompostatge, 3 de les quals amb fangs, dosi 48 t/ha i 70 dies) i alhora amb diferent fase del procés de compostatge: inicial, termofílica, inici de maduració i final de maduració. Comproven que el % de mineralització baixa gradualment a l'augmentar la maduresa assolida en el compostatge; els valors per les barreges amb residus que contenen fang fresc és 60-70 % i per les barreges amb fang compostat 10-40 %.

Madejón et al. (2001a) comproven que l'aplicació d'un residu amb MO poc estable (compost de RSU, dosi 50 t/ha=2 % i 30 dies) tot i presentar problemes de fitotoxicitat per la germinació, provoca un elevat increment de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa, ureasa, proteolítica de BAA i deshidrogenasa; aquest increment és menor en el cas dels dos residus més estabilitzants (compost agroforestal i fang de paperera). Els mateixos autors publiquen resultats d'una experiència similar (Madejón et al., 2001b) allargant el temps d'incubació fins a 280 dies i amb dos sòls de textura diferent. En el sòl control tipus argilós el C disminueix al voltant d'un 25 % i en les barreges entre 29 i 45 % i la mineralització és major en les barreges amb sòl tipus arenós. Pel que fa les activitats enzimàtiques, en general tendeixen a disminuir (una possible causa s'atribueix a la manca de vegetació) encara que acaba la incubació amb valors de C i activitats superiors al control. Pel que fa a la seva dinàmica, descriuen un primer període d'intensificació de les activitats de 9 setmanes que depèn del creixement de la biomassa i un segon període de descens fins a 40 setmanes. La correlació entre les 4 activitats resulta ser alta i en general troben correlació entre les 4 activitats el C i el C-soluble en els dos períodes; així confirmen que l'aport de residus orgànics promou l'activitat microbiana i l'activitat enzimàtica.

Debosz et al. (2002) estudien la influència de les condicions ambientals i completen l'estudi in vitro de laboratori amb contenidors a l'exterior. Estudien l'efecte de l'aplicació de compost (RSU a 17 t m.s/ha) i fang anaeròbic (4,2 t m.s/ha i 330 dies) a dosis molt baixes fixades com a dosis agrícoles (limitades per l'aport de P). El disseny experimental consta d'incubacions tant a temperatura constant com a l'exterior en condicions climàtiques reals i alhora també avaluen el mateix en proves de camp on s'han aplicat els mateixos residus en les mateixes dosis durant 3 anys. Sobre l'evolució conclouen que durant les primeres setmanes es veuen els efectes de l'aplicació, però aquests són transitoris i a llarg termini no hi ha conseqüències sobre les propietats físiques ni microbiològiques del sòl. Així, l'activitat β -glucosidasa al llarg dels mesos d'incubació (a T controlada) amb el fang és alta inicialment i decreix amb el temps i en el compost és més estable; en el cas de l'evolució de l'activitat en condicions climàtiques reals no es veu una gran diferència per l'efecte de la variació estacional (excepte baixada final degut a l'hivern). Respecte de l'evolució del contingut

en carbohidrats solubles en aigua calenta no observen canvis amb el temps d'incubació excepte un pic als dos mesos en el cas del fang.

➤ Paral·lelament trobem experiències que aporten resultats referents a la influència de l'aplicació del residu sobre el contingut en carbohidrats incidint en les propietats físiques

Metzger et al. (1987) i Kinsbursky et al. (1989) estudien l'efecte de l'aplicació de fang sobre el contingut d'agregats estables i el contingut en CHT i CH-solubles en aigua en barreges sòl-fang (dosi 5 % m.s i 54 dies). Detecten una primera fase de formació d'agregats que relacionen amb un increment del contingut en CH-solubles en aigua que va associada a un increment de la població microbiana i elevat despreniment de CO₂. La segona fase és d'estabilització i al final les barreges presenten un valor d'agregats estables superior al control. Troben que el contingut d'agregats estables està més relacionat amb la fracció de CH-solubles que amb el de CHT i consideren que els carbohidrats de les barreges poden ser del propi fang o bé productes de l'activitat microbiana que promou l'addició de fang. Pel que fa a les fluctuacions en el contingut en CH-solubles apunten que i) inicialment és important el paper dels polisacàrids dels fongs i després els bacteris estarien més involucrats en la degradació, síntesi i redeposició dels polisacàrids originals, i ii) una porció dels polisacàrids queden protegits de la degradació microbiana en formar complexos amb els cations metàl·lics o per quedar ocluits en els microporus inaccessibles als microorganismes. A partir dels resultats de correlacions els autors suggereixen que els carbohidrats provinents dels fongs tenen un paper important en la formació dels agregats estables solubles en aigua.

En un disseny molt semblant a l'anterior Roldán, et al. (1994) incuben barreges sòl i RSU (fresc, dosis 2,4 % i 4,8 % i 67 dies) i de forma similar també afirmen que si bé els carbohidrats del residu milloren l'estat d'agregació de les partícules de forma immediata, el manteniment o creixement dels agregats estables depèn de la càrrega microbiana i en particular de la proliferació dels micelis dels fongs.

Pascual et al. (1999) descriuen la dinàmica de la MO (C, àcids húmics i fúlvics, C-soluble, CHT i CH-solubles, proteïna soluble i compostos fenòlics) en un assaig de recuperació d'un sòl de zona àrida. En aquest cas, la incubació és de sòl amb fang aeròbic, amb RSU i amb compost fet de barreja dels dos; la dosi es calcula per arribar al 2 % de MO i la durada és de 365 dies. Detecten que amb els residus frescos la millora és més espectacular que amb el compost, però també ho és la davallada de les diferents fraccions. Per les barreges sòl-fang el contingut en CHT és superior al control i es manté constant al llarg de la incubació i ho atribueixen al seu origen microbià (associat a una mineralització més difícil). Inicialment el contingut en CH-solubles només és superior al control en les barreges de dosi alta. Amb el temps, per la dosi baixa s'observa un increment en CH-solubles i en canvi per la dosi alta decreix el contingut fins als 30 dies i després augmenta. Els autors interpreten la diferent evolució considerant que a dosi alta inicialment predomina la mineralització a la humificació i després es formen compostos més complexos i per la dosi baixa hi ha un major equilibri entre els dos processos ja que s'ha incorporat menys MO fàcilment degradable i l'activitat microbiana és menys destacada. Al final el contingut en CH-solubles sempre és superior al control i per tant indica que l'activitat microbiana ha estat revitalitzada. La proteïna soluble es veu incrementada des de l'inici i per tots els

tractaments, decreix amb el temps i al final segueix sent superior al control en tots els casos.

Per últim, els autors García-Orenes, et al. (2005) comproven que els fangs milloren les propietats físiques -l'estabilitat dels agregats i la densitat aparent- en dos tipus de sòls degradats (un amb problemes de salinització). L'experiència consta d'incubacions sòl-fang (tres dosis entre 3-5 % fang m.s i 2 anys) amb 3 addicions successives de fang en contenidors en hivernacle i amb cultiu de tomàquet. Amb el temps detecten valors creixents de C i també de CHT; al final l'increment en CHT és superior al de C i ho relacionen amb el realç de l'activitat microbiana pel fang afegit.

➤ Els treballs d'especial rellevància són els de Serra-Wittling et al. (1995), Saviozzi et al. (2002) i Pascual et al. (2002) ja que determinen les activitats enzimàtiques en les barreges sòl-residu i també en els residus. En aquests treballs s'estudia **l'additivitat de l'activitat enzimàtica** comparant l'activitat teòrica (tenint en compte la composició de la barreja i la suma de les activitats del sòl més la del residu) i l'activitat real (mesurada en la barreja sòl-residu)

Serra-Wittling et al. (1995) incuben un sòl amb tres tipus de compost de RSU (de 3 i 7 mesos de maduració i vermicompost, en dues proporcions, 10 i 30 % i 189 dies) i controlen 9 activitats enzimàtiques (entre elles GLC, GAL i UR). Per estudiar l'efecte additiu entre les activitats del sòl i del residu determinen les activitats en els residus que també incuben paral·lelament a les barreges. L'experiència posa de manifest que l'afegit del compost menys madur incrementa l'activitat del sòl en els enzims relacionats amb en cicle del C quan la dosi és alta i que el compost madur no té efectes. Les activitats relacionades amb el cicle del N són estimulades, però els efectes són més transitoris. L'activitat proteàsica decreix al llarg de la incubació i l'activitat UR sembla que disminueix i torna a créixer, però al final, respecte del control, troben diferències en la proteasa i no en l'activitat UR. Relacionen el pic en l'activitat UR amb el moment en què la mort de biomassa hagués pogut incrementar la proteïna disponible amb la posterior producció d'enzims relacionats en el cicle del N.

Pel que fa a les activitats enzimàtiques en els residus emprats troben valors que són més alts que en el sòl (excepte la UR que són semblants) però quan ho refereixen a C, les activitats específiques GLC/C, GAL/C i UR/C resulten ser inferiors en els residus que en el sòl. El compost menys madur presenta valors més alts que el madur, excepte la proteasa, i la diferència és més notable en el sentit GLC>GAL>UR. El comportament de les activitats entre sòl i residu no és, en general, additiu. L'activitat enzimàtica mesurada en la barreja és inferior a la calculada i especialment per les activitats GLC, GAL i N-acetil- β -glucosaminidasa i en el compost més jove. Els autors relacionen aquest comportament amb l'activitat dels enzims extracel·lulars. Consideren que els enzims extracel·lulars del compost, encara que persisteixen al estar protegits, tenen menys activitat i s'inactiven parcialment al ser afegits al sòl. També ho atribueixen a què la barreja del sòl amb el residu indueix canvis de pH, salinitat i d'altres paràmetres que afecten la microflora del compost.

Els autors contrasten aquests resultats amb el comportament de l'activitat deshidrogenasa, enzim estrictament endocel·lular i considerat com paràmetre indicatiu de l'activitat microbiana global. Així l'activitat deshidrogenasa s'allunya del general descrit ja que i) presenta alta correlació amb la mineralització del C; ii) l'activitat

específica és més alta en el residu que en el sòl, i iii) segueix la pauta d'additivitat sòl més residu.

Saviozzi et al. (2002) per avaluar la capacitat dels residus d'incrementar i mantenir l'activitat bioquímica dels sòls, incuben dos residus molt diferents (fang de digestió aeròbica com a material poc madur i fems com a més estable, a dues dosis calculades per assolir un 1 % i un 2 % de C orgànic i 60 dies) i mesuren les activitats deshidrogenasa (com a intracel·lular) i casseinolítica (com a extracel·lular) a més de biomassa i respiració. Per la deshidrogenasa troben que inicialment l'activitat teòrica (calculada per additivitat sòl + fang) és superior a la real (mesurada en la barreja sòl-fang), però coincideixen al final. Per la casseinolítica hi ha additivitat en les barreges sòl-fem, però per sòl-fang l'activitat real és superior a la teòrica i ho justifica per l'important aport de substrats nitrogenats disponibles que indueix la síntesi d'enzims.

Pascual et al. (2002) fan un estudi de l'activitat enzimàtica amb més profunditat ja que determinen l'activitat ureàsica i fosfatàsica total i la dels enzims immobilitzats (en extractes) en les barreges i en els residus aplicats. En aquest cas, la incubació és de sòl amb fang aeròbic, amb RSU i amb compost fet de barreja dels dos; la dosi es calcula per arribar 2 % MO i la durada és de 365 dies. Pel que fa a les dues activitats en els residus troben la gradació: fang >> RSU > compost i ho expliquen d'acord a la correspondència entre un alt contingut microbià i un nivell de substrat capaç d'activar la síntesi d'enzims. L'activitat dels enzims immobilitzats (que representa entre 0,1-0,6 % de la total) és també inferior en les mostres de compost. A l'inici les activitats enzimàtiques en les barreges mantenen la gradació observada en els residus, però declinen i s'uniformitzen i al final encara són superiors al control; observen, però que en el sòl-compost el descens és sempre inferior. Respecte de l'evolució de les activitats dels enzims immobilitzats constaten que la persistència de les activitats ureàsica i fosfatàsica és més alta en les barreges de compost que en les que han rebut residu fresc i acaben sent superior a la del control. Conclouen que l'addició de residus orgànics augmenta l'activitat enzimàtica del sòl control i que per tant, contribueixen a la regeneració biogeoquímica del sòl i reactiven el cicle dels nutrients N i P.

➤ Per últim, agrupem els resultats d'estudis més recents que fan referència a l'aplicació de fangs amb els posttractaments d'assecatge tèrmic i de compostatge

Fernández et al. (2007a) estudien la dinàmica de mineralització del C a través de la mesura del CO₂ en mostres sòl-fang incubades durant 60 dies i posen de manifest la importància del grau de degradabilitat del residu. Assagen dos fangs diferents: un procedeix d'assecatge tèrmic (30 % C) amb aire calent i temperatura de 380-450°C i l'altre és un fang procedent del compostatge (18 % C) de la barreja de tres fangs diferents. Les barreges són d'uns 100 g i el sòl és tipus arenós (0,7 % C i 0,09 % N) i la dosi és l'equivalent a 80 Mg/ha. Detecten que el màxim del despreniment de CO₂ té lloc el primer dia i que les barreges amb fang compostat s'estabilitzen al cap de 7 dies i les de fang tèrmic als 28 dies. Globalment la mineralització resulta anàloga en les barreges del fang compostat que en el sòl control i és més alta (aprox. 5 cops la del sòl control) en les barreges que contenen fang tèrmic. Atribueixen el comportament del fang compostat a l'aport de MO ja estabilitzada que compleix l'objectiu d'incrementar la MO del sòl. Contràriament, la matèria orgànica del fang tèrmic comporta l'activació de l'activitat dels microorganismes, que a més a més, pot tenir efectes negatius a l'incrementar la velocitat de mineralització de la MO nativa del sòl i

induir condicions anaeròbiques per l'alt consum d'oxigen derivat de la mineralització de grans quantitats de carboni no estabilitzat

Del mateix grup d'autors Pedra et al. (2007) estudien l'efecte de les propietats físiques de dos sòls sobre la cinètica de transformació del C aportat per dos residus. Controlen durant 28 dies el comportament de mostres incubades amb compost de RSU i fang de digestió anaeròbica (amb igual contingut del 25 % C, però valor superior de N en el fang 3,6 % N i 2,2 % N en el compost) amb dos sòls de diferent textura (tipus argilós 1,1 % C i tipus sauló 0,7 % C) i dues dosis del 10 i 20 % de fang (equivalent a 30 i 60 T/ha) en barreges a microescala. Els resultats assenyalen: i) un valor màxim de despreniment de CO₂ als dos dies amb estabilització al final del període controlat; ii) una velocitat de mineralització més baixa en el compost que en el fang i en el sòl tipus argilós que en el tipus arenós, i iii) un nivell de MO dels sòls que es manté o augmenta durant el temps d'incubació, excepte per la dosi alta de fang.

Més recentment, Sciubba et al. (2013) estudien el producte final del compostatge de dos fangs (aeròbic i anaeròbic) amb alta proporció de residu de clofolla d'arròs i ho comparen amb un compost convencional (RSU, fang i residus vegetals). Controlen incubacions amb barreges (250 g) de dos sòls (1,5 % de C i només es diferencien en la textura), una proporció 30 Mg/ha i durant 98 dies. El comportament del compost provinent del fang aeròbic (amb valors més alts d'activitat microbiana, activitats enzimàtiques i mineralització del N) està d'acord amb la menor estabilització de la MO aportada. En el procés de mineralització del N, comproven la incidència del tipus de fang i de sòl; així és més lenta en el cas del fang aeròbic (on apunten una probable immobilització de N) i en el sòl tipus argilós. En cap cas observen efectes negatius en els paràmetres de qualitat del sòl estudiats i per tant conclouen que són aptes per a la seva aplicació en agricultura.

Finalment destaquem les interessants aportacions del treball de Bastida et al. (2012) on estudien els residus com a font d'enzims immobilitzats, partint de la caracterització enzimàtica dels materials aplicats (fang i RSU, ambdós frescs i compostats) realitzats per Moreno et al. (2007). Els autors plantegen com a la hipòtesi de partida: *el residu compostat comportarà una proporció més alta d'activitat estabilitzada i tindrà efectes més perdurables que el residu fresc*. De les diferents activitats mesurades comproven que la hipòtesi només es compleix per l'enzim ureasa i ho relacionen amb què el seu alt pes molecular facilita el seu procés d'immobilització. El disseny experimental consta de la incubació d'aquests quatre residus a microescala i a dosis molt baixes (10 i 20 % m.s) i 365 dies amb 8 mostreigs; determinen per sis enzims (GLC, BAA, UR, deshidrogenasa, fosfatasa i difenoloxidasa) les activitats total i immobilitzades en les barreges sòl-residu.

L'aport de MO té un efecte positiu sobre la qualitat bioquímica del sòl degradat i influeix sobre els continguts en C, CH-solubles i BMC del sòl al cap d'un any; detecten poca diferència entre les dues dosis aplicades, la qual cosa vol dir que el sòl degradat respon a baixos inputs de MO. En el sòl control i en tots els tractaments detecten una pèrdua semblant de carboni orgànic que es situa entre un 20-25 %. Pel que fa als CH-solubles hi ha un increment inicial (que és més acusat en les barreges amb materials frescos) seguit d'una davallada -que és molt accentuada el primer mes i és més acusada en les barreges amb els materials frescos que en les respectives de materials compostats- i finalment una estabilització. En el sòl control la davallada en CH-solubles és del 67 %, en sòl-fang del 60-80 % i per sòl-RSU del 70-95 %. Aquestes

variacions contrasten amb la més lenta degradació del carboni orgànic i indiquen que hi ha més canvis en la fracció més làbil.

Pels 3 enzims hidrolítics (GLC, UR i deshidrogenasa) l'activitat de les barreges amb residu fresc és inicialment més alta que amb el respectiu material compostat, baixa amb el temps i al final no hi ha diferències entre ells; els autors constaten així que en l'aplicació de materials compostats, els valors de les activitats enzimàtiques són més estables amb el temps. Per altra banda, l'expressió de les activitats com a activitats específiques permet veure si les diferències detectades provenen del nivell de MO o són reals. Inicialment troben que no hi ha diferències en GLC/C ni en UR/C entre barreges i control, però al final les barreges tenen una activitat específica UR/C superior al control i per tant la MO ha guanyat activitat UR; en canvi per GLC/C són semblants al control (excepte pel fang dosi alta que és inferior) i no s'ha donat aquest enriquiment.

Per l'activitat UR comproven la hipòtesi de partida ja que en les barreges amb residus compostats l'activitat estabilitzada és més alta que amb els frescos i per tant els efectes són més perdurables. Per l'activitat GLC, en canvi, destaquen la capacitat dels enzims sintetitzats de nou a quedar estabilitzats. Concretament detecten pels fangs, (sense tenir aquest residu més activitat GLC, ni total ni immobilitzada, que els RSU) que l'activitat immobilitzada creix amb el temps i al final el percentatge d'activitat dels d'enzims immobilitzats respecte a la total, en els sòls que han rebut fang fresc, és la més alta (25 %). Sostenen que la MO làbil aportada estimula la síntesi d'enzims hidrolítics i el seu alliberament al sòl i que després, aquestes proteïnes poden quedar atrapades en l'humus, donant lloc a valors superiors d'activitat immobilitzada respecte de les mostres del residu compostat.

4.1.2 Resultats de proves de camp: experimentació en contenidors a l'exterior o en parcel·les

Resumim en primer lloc les experiències amb dosi d'aplicació agrícola de fangs i posteriorment les de l'àmbit de restauració de sòls on l'aplicació és generalment única i a dosis més altes.

4.1.2.1 Experiències sobre aplicació agrícola de fangs

Una de les primeres experiències, a gran escala i a llarg termini, sobre la influència de l'adobat orgànic sobre les activitats enzimàtiques és la descrita per Martens et al. (1992). En aquesta prova de camp es fan quatre aportacions durant 2,5 anys (i 11 mostreigs) de diferents adobats orgànics (fang, fems i dos de material vegetal) i de dosi 25 Mg/ha m.s i sense vegetació. Les aportacions més interessants són l'evolució de les activitats amb un llarg període de temps i també el fet d'incloure valors d'activitats en els residus aplicats. L'activitat enzimàtica (controlen 9 enzims) queda incrementada, en mitjana, entre 2 i 4 cops respecte de l'activitat del sòl control; ara bé, aquest increment és molt acusat durant el primer any i molt inferior amb les següents aportacions. Suposen que l'estimulació inicial pot ser conseqüència de la presència de substàncies que desencadenin en els organismes del sòl la segregació de grans quantitats d'enzims; posteriorment un mecanisme feed-back aturaria aquest procés ja que hi hauria recursos disponibles, és a dir que el procés de promoció i supressió poden quedar balancejats i així arribar a un nivell constant d'activitat enzimàtica en el sòl.

Respecte de la diferent resposta dels residus aportats en el sòl, l'adobat amb restes vegetals és el que més incrementa totes les activitats (excepte la ureasa) en

comparació al fang i fem. L'activitat β -glucosidasa queda especialment incrementada a l'inici i per l'adobat vegetal a base de palla. Per la β -galactosidasa els nivells d'activitat i d'increment són inferiors a l'anterior enzim i les diferències respecte del control (considerant la mitjana de tot el període controlat) són significatives excepte pel fang. Respecte de la millora de les propietats físiques del sòl relacionen la disminució de la densitat i l'augment de la capacitat d'infiltració d'aigua amb l'increment de les activitats relacionades amb el cicle del C (β -glucosidasa, β -galactosidasa i N-acetil- β -glucosaminidasa).

Pel que fa a les activitats enzimàtiques en els residus aplicats troben que per l'activitat ureàsica els valors són semblats i en canvi les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa entre els materials aportats són molt diferents: en els residus vegetals són molt més altes que en els fems i fang. Pel fang els valors de les activitats són 1,2 $\mu\text{mol pNF/gh}$ per GLC i 1,6 $\mu\text{mol pNF/gh}$ per GAL i 46 $\mu\text{mol N/gh}$ per UR; en els materials vegetals l'activitat GLC és uns 6 vegades més alta que l'activitat GAL, però en els altres residus els valors de les dues activitats són molt més semblants.

Saviozzi et al. (1999) també estudien els efectes a llarg termini, en aquest cas de l'aplicació repetida de fang de digestió aeròbia (5 t/ha m.s per any i durant 12 anys) i fems (igual dosi i 40 anys) en rotacions de cereals prenent com a referència un sòl natural adjacent. Constaten que el cultiu comporta davallada en paràmetres bioquímics i biològics del sòl que no queda compensada per l'aport dels residus orgànics i suggereixen l'aplicació de dosis més altes. Concretament, troben que el contingut en MO, CHT i CH-solubles en els sòls cultivats resulta ser inferior respecte del sòl natural i que és superior en l'adobat amb fems respecte de l'adobat amb fang, fet atribuïble a que la MO en aquest és més resistent a la mineralització. L'abundància relativa, però, de les fraccions de carbohidrats respecte al carboni és similar en els tres tractaments indicant que les característiques qualitatives de la MO són semblants. Per l'activitat enzimàtica ureàsica descriuen valors inferiors pel tractament amb fangs i ho atribueixen al possible efecte negatiu dels metalls pesants.

Les experiències de Albiach et al. (2000), Albiach et al. (2001a) i Albiach et al. (2001b) posen de manifest els efectes diferencials i positius de l'aportació de residus en el nivell de MO i de carbohidrats i el realç de les propietats relacionades amb l'activitat biològica. Aquests autors aporten resultats sobre biomassa, conjunt d'activitats enzimàtiques, continguts en carbohidrats i la seva relació amb l'estabilitat d'agregats en sòls que han rebut repetides aportacions de diferents tipus de residus orgànics (fems, fang aeròbic i anaeròbic i RSU) respecte d'altres productes comercials o fertilització mineral en cultius després de 5-10 anys.

Ros et al. (2006) aporten resultats sobre diferents materials compostats (fang, RSU, fems i residus vegetals) en una aplicació agrícola amb fertilització complementària de N mineral i durant 12 anys d'aplicació. En aquests cas, les diferències s'avaluen tenint en compte els efectes a diferents profunditats. Considerant només els resultats a 0-10 cm, trobem que els materials compostats incrementen els continguts de C i N total, però per biomassa microbiana i respiració no hi ha diferència amb el control. El compost de fangs és el material que més incrementa la MO i ho atribueixen a l'aport del material lignocel·lulós difícil de degradar que fa d'agent *bulking*. Les activitats enzimàtiques proteolítica de BAA i fosfatàsica del sòl on s'ha aplicat compost de fang són més altes que el control i per les activitats UR i GLC no hi ha diferències significatives amb el sòl control. El valors més alts de l'activitat GLC es donen en el tractament amb compost de fems i s'atribueix a la presència de palla.

Els treballs de Fernández et al. (2007b) i Fernández et al. (2009) són especialment interessants pel que fa a aplicació de fangs posttractats. Aquests autors estudien els efectes de fang compostat i de fang procedent d'assecatge tèrmic amb contrast amb fertilització mineral en un cultiu de cereals. Apliquen dues dosis 20 i 80 t/ha m.s i l'experiència permet veure els efectes residuals (d'una sola aplicació) i també els efectes acumulatius (amb successives aplicacions) al cap de 1, 2 i 3 anys. Els fangs aplicats tenen un contingut molt diferent de MO (18,1 % C el compostat i 29,6 % el tèrmic) i corresponen als de l'experiència in vitro de Fernández et al. (2007a). Controlen els valors de C, C-extractable, àcids húmics i àcids fúlvics i les activitats enzimàtiques catalasa, deshidrogenasa i ureasa.

Els resultats de l'efecte residual al cap d'un any indiquen que només les dosis altes presenten contingut en C superior al control i al cap de tres anys només es dona pel fang tèrmic dosi alta. Aquests efectes residuals més importants en el fang tèrmic els atribueixen a la resistència física a la descomposició que presenten els *pellets*. No es troben diferències en el grau d'humificació de la MO de les parcel·les que han rebut els dos tipus de fang. Constaten que els dos tipus de fangs milloren del nivell de MO i de la fracció humificada, però que el fang compostat és més eficient ja que la quantitat de MO aportada pel fang tèrmic és inicialment superior, presenta un percentatge de mineralització més alt i per tant aportant més MO contribueix menys a l'augment de la MO del sòl final. Pel que fa als efectes residuals en l'activitat enzimàtica UR destaquem que el tractament amb fang tèrmic i la dosi alta dona valors significativament més alts que els altres i que el control i ho relacionen amb l'alt contingut de N orgànic. Pel que fa a la dosi, els autors afirmen que és millor la resposta d'una única aplicació especialment del compostat, ja que la dosi acumulativa i les altes sembla que siguin perjudicials per a la fertilitat en baixar la producció i la biomassa.

Per últim, del mateix grup d'autors citem el treball de Franco-Otero et al. (2012) on, també en un cultiu de cereals, comparen la fertilització orgànica amb fang compostat i fang assecat tèrmicament junt amb compost de RSU i fertilitzant mineral amb una dosi de 30 t/ha m.s i al cap d'un any. Sobre la caracterització dels materials destaquem que el fang tèrmic presenta un contingut més alt de MO (26,8 % de C i 4,2 % N orgànic) i de formes solubles de C, de carbohidrats i de proteïna respecte del fang compostat (13,2 % C i 2,1 % N orgànic). Els resultats indiquen que no hi ha diferències en paràmetres microbiològics ni en els contingut dels components de la MO (C, C-soluble, CH-solubles i proteïna solubles) entre els diferents tractaments. Pel que fa a la incidència del tractament del fang sobre les activitats enzimàtiques, no troben efectes sobre les activitats GLC i BAA i si en l'activitat UR i en la relació UR/BMC que són més altes amb el tractament fang tèrmic que amb el compostat.

4.1.2.2 Experiències sobre aplicació de fangs en restauració

En l'àmbit de la restauració de sòls amb l'aplicació de fangs, Sopper (1993) en estudis amb sòls de mineria, no detecta efectes adversos a pesar de la possible inhibició que podrien exercir els metalls pesants sobre l'activitat microbiana. A més, es dona un ràpid restabliment de la comunitat microbiana, que incrementa la descomposició de la MO, afavoreix el reciclatge de nutrients i per tant beneficia el creixement de la coberta vegetal. En el mateix sentit, les experiències de Speir et al. (2003 i 2004) sobre la recuperació de sòls de pastura amb l'aplicació de fangs amb altes dosis 150 t/ha m.s i després de 4 anys indiquen que es produeix un realç de la fertilitat del sòl, de la biomassa i l'activitat sense efectes adversos aparents atribuïbles al metalls pesants.

Sobre restauració de sòls abandonats de zona àrida destaquem primer dos estudis del mateix grup d'autors Ros et al. (2003) i Bastida et al. (2008b). Ros et al. (2003) proposen la restauració d'un terreny abandonat de zona semiàrida amb una alta i única dosi de fang (250 t/ha m.h) i de fang barrejat amb palla (6:1). Controlen diferents variables i els efectes sobre la vegetació i la resistència a l'erosió al cap de 2 anys. Al principi detecten un gran increment de tots els paràmetres i amb el temps la MO disminueix un 70%. Al final es segueix detectant l'efecte intensificador, respecte del sòl control, per C-soluble, biomassa, respiració i les activitats UR, fosfatasa i GLC (amb efecte intensificador de 2-5 i similar al del C). L'activitat GLC creix amb el temps i ho atribueixen a la incorporació contínua de MO en el sòl conseqüència de la recuperació de la coberta vegetal; l'activitat acaba sent més alta que amb l'aplicació de fang+palla, aplicació que també resulta ser millor per la estabilitat dels agregats degut als carbohidrats afegits pel material.

Bastida et al. (2008b) plantegen com a objectiu estudiar els efectes de residus de diferent grau d'estabilitat (un mateix fang de digestió anaeròbica deshidratat i compostat amb palla (3:1) amb un contingut semblant en MO) amb dosis altes (de 120 t/ha) sobre la restauració d'un sòl degradat de zona semiàrida amb poca vegetació. Controlen un mostreig estacional (primavera, estiu i tardor) durant 2 anys. L'estudi és molt complert ja que determina a més la mida, l'activitat i l'estructura de la comunitat microbiana.

Inicialment els valors de carboni orgànic són pel control (CO) 1,3 % C, pel sòl amb fang deshidratat (D) 2,0 % C i pel sòl amb fang compostat (C) 2,5 % C. El contingut de MO inicialment presenta un efecte intensificador de 1,6 i 1,9 pels fangs D i C i amb el temps es detecten poques variacions i mantenen les diferències inicials $CO < D < C$. Pel C-soluble detecten més variacions i una davallada final, però amb la mateixa gradació que el carboni. Pels CH-solubles també igual gradació amb més oscil·lacions amb l'estació i al final $CO < D = C$. Inicialment, l'activitat GLC presenta la mateixa gradació que el carboni i per l'activitat UR el sentit és contrari entre els dos fangs (únic paràmetre on $D > C$). Amb el temps, l'activitat UR té tendència a disminuir i l'activitat GLC presenta valors màxims a la primavera; no sempre es manté la diferència significativa entre fangs, però sempre es mantenen valors significativament superiors al control. Al final, troben diferències significatives entre control i els dos fangs per ambdues activitats amb la gradació $CO < C < D$.

Calculen les relacions UR/BMC i GLC/BMC (amb la mitjana de totes les dates) que indica la producció d'enzim per la biomassa i resulten ser inferiors en els sòls on s'ha aplicat el fang compostat; aquest resultat és coherent amb què el fang compostat proporciona compostos més resistents que seran hidrolitzats més lentament i en canvi el fang deshidratat té més compostos fàcilment metabolitzables per la comunitat microbiana. De l'estudi de la població microbiana dedueixen que els dos tractaments comporten, amb el temps, el desenvolupament de diferents comunitats bacterianes. Dels resultats de coberta vegetal dedueixen que no es detecten, amb el temps, efectes fitotòxics deguts al fang i conclouen que els dos materials són vàlids per la restauració, però que és millor el compost perquè sembla que a la llarga aporta compostos de carboni més perdurables.

Més concretament en experiències de recuperació de sòls procedents de canteres de calcària amb aplicació de fangs en dosis úniques destaquem els resultats dels estudis del nostre grup de treball que s'emmarquen en diversos projectes de recerca (Alcañiz et al., 2008).

Les primeres experiències del grup són les portades a terme a les canteres de Rubau (Girona) i Lucas (Alcover). En el cas de l'experiència de Rubau es va aplicar fang de digestió anaeròbica dosis de 200 i 400 t/ha m.s (màxima segons metalls per agricultura i una doble) que equivalen a 7,5 i 15 % (fang sec sobre terra fina) en parcel·les de 100 m², espessor de 40 cm i pendent de 22 % i fent sembra posteriorment; dels dos sistemes d'aplicació assajats, farem esment al de barreja prèvia i no al d'aplicació directa. El sòl control tenia alt contingut en carbonats i era pobre en MO (0,6 % C).

El posterior estudi en la cantera Lucas (Alcover) es va dissenyar amb l'objectiu de determinar la dosi de fang a partir de la qual l'increment en producció vegetal deixa de ser lineal respecte a la dosi (Ortiz, 1998) . A més a més va aportar resultats sobre condicions climàtiques i edafològiques diferents a la cantera anterior; el sòl control tenia més contingut en MO (1,2 % C), menys carbonats i condicions més àrides. El fang era de digestió anaeròbica, les parcel·les de 25 m², sense pendent, amb 30 cm d'espessor, i es va fer també barreja prèvia sòl-fang i sembra. Els paràmetres bioquímics només es van controlar en les dosis del 10 % i 20 % (semblants a Rubau) i 100% (evolució el fang sense sòl).

En les parcel·les de Rubau es va fer un seguiment durant 5 anys (1992-1997) mitjançant 8 mostreigs. Inicialment els valors de carboni orgànic eren de 1,3 i 1,7 % C i l'efecte intensificador de 2,2 i 2,8 per les dosi alta i baixa. En les parcel·les d'Alcover amb valors de carboni orgànic inicials de 1,7 % i 2,0 % C (efecte intensificador de 1,4 i 1,7 per les dosi baixa i alta) es va fer un seguiment durant 3 anys (1995-1998) amb 4 mostreigs. Al final del període controlat, només en el cas de Rubau les parcel·les que havien rebut fang presentaven uns valors significativament superiors de MO al control, però iguals per les dues dosis.

Respecte als resultats de les activitats enzimàtiques aquests són especialment interessants ja que suposen l'estudi a llarg termini (Bonmatí et al., 2000). Es van estudiar, en els dos casos, les activitats enzimàtiques fosfatàsica, ureàsica, casseinolítica i proteolítica de BAA (cicles del P i N) i la invertàsica. Es detecta un clar efecte intensificador inicial de totes les activitats excepte per la ureàsica (en el cas de Rubau) fet atribuïble a la inhibició per altes concentracions d'amoni. L'activitat casseinolítica va ser clarament la més augmentada (entre 4-8 vegades la del sòl control) i les altres de forma més similar (de l'ordre de 2 vegades). L'augment de totes les activitats és més gran en augmentar la dosi de fang, encara que en Alcover, però, es detecten poques diferències entre dosis.

Pel que fa a l'evolució amb el temps és destacable, per les mostres de Rubau, la disminució dràstica de la casseinasa i la tendència a créixer de la proteolítica de BAA; aquests resultats estan d'acord amb el fet que la primera està associada a la MO fresca i la segona al procés d'estabilització de la MO (Bonmatí, 1998). Després dels 5 anys es veu que el fang ha augmentat l'activitat enzimàtica de les dues proteases (casseinolítica i BAA) i la fosfatasa , però si es treu la influència de la MO només queda augmentada l'activitat específica proteolítica de BAA/C i en canvi l'activitat UR/C és inferior a les del sòl control. De la dinàmica conjunta de les activitats enzimàtiques es planteja com a hipòtesi del comportament de la MO un primer període (especialment 4

mesos) on predomina la mineralització i després un procés d'estabilització paral·lel a la mineralització MO aportada per les restes vegetals.

En les mostres d'Alcover, al final dels 3 anys totes les activitats (excepte la invertasa) perduren, és a dir, les activitats del sòl on s'havia aplicat fang són superiors a la que presenta el control i comparant les activitats específiques, només per la fosfatasa es pot dir que sigui degut a l'aport de MO. En aquest cas, les condicions climàtiques fan que l'evolució de la MO sigui més lenta i, encara que sigui important la mineralització respecte de l'estabilització, perdura per més temps l'efecte intensificador del fang.

La darrera experiència del grup es va plantejar per avaluar l'efecte de tres fangs assecats tèrmicament i de tres fangs compostats procedents de diferents plantes de Catalunya aplicats a sòls residuals de cantera (residus d'extracció i de trituració). L'assaig es fa en contenidors a l'exterior, la dosi aplicada és 80-140 t/ha m.h (calculada per augmentar el contingut de C fins a un 2 %), s'aplica sembra i es controla el període de 13 mesos amb dos mostreigs (inici i final) d'acord amb l'Informe del projecte (IQS-CREAF-ESAB, 2006). Sobre aquesta experiència, Marando et al. (2011) i Marando, (2013) descriuen els resultats dels efectes de l'aplicació dels fangs posttractats sobre el contingut de C, C-extraïble, CHT, CHE, les activitats GLC i GAL i també els continguts de biomassa (BMC) i respiració basal (RB). Destaca la millora en les propietats físico-químiques i biològiques dels sòls residuals i que d'acord als canvis observats en BMC i RB, sembla que no hi ha efectes tòxics importants. L'efecte del fang disminueix més amb el temps en els paràmetres associats a la MO fàcilment degradable (RB, BMC, C-extraïble i CHE) i les activitats GLC i GAL augmenten per efecte de la vegetació. L'efecte de tipus de fang sobre els paràmetres estudiats, va ser superior al del tipus de sòl.

La millora inicial del nivell de C i N orgànic disminueix amb el temps, però al final segueix sent significativa respecte als controls. Els valors de disminució de MO oscil·la entre 0-50% depenent del fang, del sòl i de la interacció dels dos factors. Tot i que el descens en MO va ser, en general, menys important en barreges amb fang compostat es constata que el comportament dels fang depèn no només del seu posttractament sinó també dels processos previs d'obtenció del fang i del tipus d'estabilització aplicada. Els que presenten la davallada més important de MO són els fangs tèrmics i el compostat de digestió aeròbica i es detecta resistència a la descomposició del fang tèrmic en forma de *pellets*.

L'efecte intensificador (valor en la barreja respecte del valor en el control) és inicialment molt alt per C-extraïble i per CHE (3-36 i 3-16 respectivament) disminueix amb el temps i al final (a excepció d'un cas) no s'observen diferències en els valors de C-extraïble i CHE entre tractaments. Per els CHT efecte intensificador és menys acusat (2-5) i disminueix poc amb el temps. Els valors de l'activitat GLC inicialment són 1-6 vegades la dels controls i 1-3 vegades al cap dels 13 mesos. Aquest paràmetre, però, presenta un comportament diferenciat en el cas d'un dels fangs (tèrmic, però no digerit) i posa de manifest la seva sensibilitat davant de la labilitat de la MO aportada; en aquestes barreges, els valors de les activitats enzimàtiques GLC i GAL són molt més altes (efecte intensificador inicial de 8-29) i són les úniques que disminueixen amb el temps.

4.2 OBJECTIUS

Els objectius específics d'aquest capítol deriven dels **objectius generals B i C** (Capítol 1) i són:

- 1r. Quantificar l'efecte de l'aplicació d'un fang deshidratat i del mateix fang sotmès a l'assecatge tèrmic i sotmès a compostatge, sobre els continguts en carboni orgànic, carbohidrats totals i carbohidrats extractables i sobre l'activitat enzimàtica β -glucosidasa del sòl.
- 2n. Relacionar els resultats anteriors amb els resultats de les activitats enzimàtiques proteolítica de BAA i ureàsica.
- 3r. Esbrinar la influència dels posttractaments d'assecatge tèrmic i de compostatge del fang deshidratat sobre el conjunt de paràmetres esmentats.
- 4t. Estudiar la incidència de la dosi i del tipus de sòl sobre el comportament dels fangs.
- 5è. Aprofundir en l'efecte dels fangs aplicats amb les determinacions del Nitrogen aminoacídic i l'activitat enzimàtica β -galactosidasa en les mostres finals.
- 6è. Aprofundir en l'efecte dels fangs sobre les característiques de l'activitat enzimàtica β -glucosidasa amb la determinació de l'activitat enzimàtica en els fangs i l'estudi de l'additivitat sòl+fang en les mostres inicials.
- 7è. Aprofundir en l'efecte dels fangs sobre les característiques cinètiques i de termoestabilitat de l'activitat enzimàtica β -glucosidasa en les mostres finals.
- 8è. Situar els valors dels paràmetres bioquímics en les mostres finals en el rang de valors obtinguts en l'estudi dels sòls naturals.

4.3 MATERIAL I MÈTODES

Les mostres amb les que hem treballat provenen de dues experiències que s'emmarquen en el projecte *Aprofitament de fang de depuradora i productes derivats, fang compostat i fang assecat tèrmicament, en la recuperació de terrenys degradats* (projecte ECOFANGS) que va rebre els ajuts CIRIT (Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya i Ministeri d'Educació i Ciència) i que es va realitzar (1999-2002) entre l'Institut Químic de Sarrià (URL), el Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals (CREAF-UAB) i l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona (Consorti de l'Escola Industrial de Barcelona CEIB i UPC).

4.3.1 Experiència 1: experiència en lisímetres

4.3.1.1 Disseny experimental

En aquesta experiència s'estudia l'efecte d'un fang deshidratat, sense posttractament, (D) i els seus fang derivats: el mateix fang sotmès a un posttractament d'assecatge tèrmic (T) o bé de compostatge (C), sobre dos sòls (argilós A i sauló S) i a dues dosis (alta H i baixa L). Es van preparar les barreges sòl-fang, es van col·locar en lisímetres de 10 L i es van mantenir en condicions controlades durant 9 mesos junt amb els sòls controls (COA, COS). La combinació de factors estudiats dóna 14 tractaments (Taula 4.1) i de cada tractament es van preparar tres rèpliques i es controlaren un total de 42 lisímetres.

L'efecte sobre el sòl s'avalua amb dos sòls procedents de pedreres i les dosis es calculen tenint en compte que la barreja final assoleixi un valor del 3 % de MO (dosi baixa) o un 6 % de MO (dosi alta). Les condicions de la incubació van ser de 25°C i d'humitat del 30 % de capacitat de camp. Els diferents mostreigs corresponen als 7, 67 i 267 dies.

Taula 4.1. Conjunt de tractaments de l'experiència en lisímetres i nomenclatura de les mostres.

Sòl argilós (A)	Barreges sòl-fang	Dosi baixa	Dosi alta
Sòl control COA	Fang deshidratat i assecat tèrmicament	ATL	ATH
	Fang deshidratat	ADL	ADH
	Fang deshidratat i compostat	ACL	ACH

Sòl arenós (S)	Barreges sòl-fang	Dosi baixa	Dosi alta
Sòl control COS	Fang deshidratat i assecat tèrmicament	STL	STH
	Fang deshidratat	SDL	SDH
	Fang deshidratat i compostat	SCL	SCH



Figura 4.1 Experiència en lisímetres

4.3.1.2 Materials

Els dos sòls emprats es diferencien especialment per les característiques físiques i d'acord amb aquest criteri s'anomenen sòl argilós (A) i sòl sauló (S). El sòl argilós és un sòl desenvolupat sobre calcàries i dolomites i procedent d'una pedrera d'Alcover (Alt Camp) i el sòl sauló format sobre sauló i provinent d'una pedrera de Sant Fost de Campcentelles (Vallès Occidental). Els paràmetres més importants d'aquest sòl d'acord als mètodes de caracterització emprats (D_a , cilindre), CaCO_3 (calcimetria), bases de canvi (fotometria) i fòsfor (Olsen) es presenten a la Taula 4.2.

Taula 4.2. Característiques dels sòls utilitzats en l'experiència en lisímetres (Tarrasón et al., 2004).

Paràmetre	Unitats	Sòl argilós (A)	Sòl sauló (S)
Densitat aparent	g cm^{-3}	1,28	1,67
Aigua saturació	$\text{g H}_2\text{O Kg}^{-1}$	315,6	188,5
Sorra grossa	g Kg^{-1}	119,1	722,2
Sorra fina	g Kg^{-1}	192,8	47,5
Llims	g Kg^{-1}	297,4	82,9
Argila	g Kg^{-1}	385,7	156,5
Classe textural (ISSS)		argilosa grossa	franco-arenosa
pH (aigua, 1:2,5)		8,7	8,8
CE (25°C)(1:5)	dS m^{-1}	0,23	0,21
CaCO_3	$\text{g Kg}^{-1}\text{sms}$	254,0	6,0
Na	$\text{cmolc Kg}^{-1}\text{sms}$	0,158	nd
K	$\text{cmolc Kg}^{-1}\text{sms}$	nd	nd
Ca	$\text{cmolc Kg}^{-1}\text{sms}$	25,74	25,94
Mg	$\text{cmolc Kg}^{-1}\text{sms}$	1,19	1,24
P (Olsen)	$\text{mg Kg}^{-1}\text{sms}$	1,91	1,12

nd, no detectable; sms, sobre matèria seca

El fang deshidratat (D) procedia de l'EDAR de Blanes, el fang compostat (C) va seguir aquest posttractament a la mateixa estació depuradora i el fang tèrmic (T) es va obtenir traslladant el mateix lot de fang deshidratat de Blanes a l'EDAR de Banyoles on es va sotmetre al posttractament d'assecatge tèrmic. L'EDAR de Blanes és una estació depuradora biològica i el fang es sotmès a un procés de digestió aeròbia i després anaeròbia en un digestor a temperatura de 35 °C i durant un període mínim de 25 dies. El procés de deshidratació es fa per centrifugació. El compostatge d'aquest fang deshidratat es va fer barrejant-lo amb estelles de pi en una relació volumètrica 1:4,5, en túnel de aireació forçada, durant uns 15 dies i va arribar a temperatura màxima de 60 °C. El producte obtingut es va tamitzar i es va recuperar el 92 % de les estelles (més de 10 mm) i es va deixar madurar a temperatura ambient uns 3 mesos. El procés d'assecatge tèrmic a l'estació de Banyoles es va fer en un cilindre amb pales rotatòries amb aire calent (temps de residència 15 minuts i T aproximada de 130 °C) on perd al voltant del 90 % d'aigua i s'obté un material sòlid de textura granular. Les característiques dels tres tipus de fang s'indiquen en la Taula 4.3. D'acord a l'informe final del projecte (IQS-CREAF-ESAB, 2002) indiquem la referència dels mètodes de

caracterització dels fangs: pH i C.E (extracte aquós-mostra humida) i la resta de paràmetres a partir de mostra assecada a 105 °C i tamisada 0,75 mm. MO (calcinació), C oxidable (Walkley-Black), N (Kjeldhal), fòsfor (via seca i colorimetria Bray), potassi (via seca i fotometria), metalls pesants (digestió amb aigua regia i absorció atòmica). El grau d'estabilitat (% de la MO resistent a la hidròlisi amb H₂SO₄ 70 % i calent respecte de la MO total), i el N no hidrolitzable (N orgànic del residu del grau d'estabilitat) van ser realitzats d'acord al mètode descrit a Huerta et al. (2010).

Taula 4.3. Característiques dels fangs utilitzats en l'experiència en lisímetres (Tarrasón et al., 2010).

Paràmetre	Unitats	Fang deshidratat (D)	Fang deshidratat i assecat tèrmicament (T)	Fang deshidratat i compostat (C)
CE (25°C)(1:5)	dS m ⁻¹	1,80	5,28	5,84
pH (aigua, 1:2,5)		8,28	7,00	7,35
Densitat aparent	g cm ⁻³	0,60	0,50	0,39
Matèria seca	g Kg ⁻¹	203	860	690
C-oxidable	g Kg ⁻¹	502	512	438
MO	g Kg ⁻¹	669	675	643
Grau d'estabilitat	g 100g ⁻¹	39,5	36,9	46,2
N-total	g Kg ⁻¹	46,6	44,5	33,6
N-no hidrolitzable	g Kg ⁻¹	10,4	10,9	14,2
P	g Kg ⁻¹	18,9	17,8	15,5
K	g Kg ⁻¹	0,7	0,8	1,3
Cu	mg Kg ⁻¹	749	744	777
Zn	mg Kg ⁻¹	885	800	997
Cd	mg Kg ⁻¹	3,6	3,6	3,7
Pb	mg Kg ⁻¹	73	75	85
Ni	mg Kg ⁻¹	42	46	42
Cr	mg Kg ⁻¹	50	88	51
Hg	mg Kg ⁻¹	2,6	2,7	2,6

Resultats expressats sobre matèria seca

Les característiques generals que més diferencien els tres fangs són el contingut de matèria seca i la salinitat. El contingut en MO és molt similar, però no les característiques d'aquesta, tal com indiquen els valors de grau d'estabilitat i Nitrogen no hidrolitzable. El procés de compostatge del fang deshidratat ha representat una pèrdua en MO i un guany en estabilització, però insuficients ja que la MO estable representa menys de la meitat (Huerta et al., 2010). Els tres fangs són aptes per a ser utilitzats en agricultura d'acord al RD 1310/1990 i la Directiva 86/278/EEC.

A partir de les característiques dels fangs (continguts en matèria seca i matèria orgànica) es va calcular la quantitat de cadascun dels fangs que s'havia de barrejar amb 40 Kg de sòl (prèviament garbellats per 5 mm) per omplir els diferents lisímetres i assolir els nivells de matèria orgànica del 3 % per la dosi baixa (dosi L) i del 6 % per a la dosi alta (dosi H). En la Taula 4.4 s'indiquen la quantitat de cada fang aportada

per aquestes dues dosis. Les barreges van quedar constituïdes amb un 5 %-31 % de fang humit. D'acord a la composició de les barreges i a la riquesa en N orgànic dels fangs, el N orgànic de les barreges va ser inicialment 0,30-0,15 % N depenent de la dosi de fang aportada i sense considerar el N orgànic del sòl.

Taula 4.4. Composició de les barreges sòl-fang de l'experiència en lisímetres (Tarrasón, 2004).

Dosi	Criteri	Unitats	Fang deshidratat (D)	Fang deshidratat i assecat tèrmicament (T)	Fang deshidratat i compostat (C)
Dosi baixa (L)	3% MO	kg fang humit per 40 Kg de sòl	8,9	2,2	2,8
		kg fang humit per 100 kg barreja	18,0	5,0	6,0
Dosi alta (H)	6% MO	kg fang humit per 40 Kg de sòl	17,9	4,4	5,5
		kg fang humit per 100 kg barreja	31,0	9,0	12,0
Proporció de fang afegit entre les dosis alta i baixa (H/L)			1,7	1,9	1,9

4.3.2 Experiència 2: experiència en parcel·les

4.3.2.1 Disseny experimental

Es van construir parcel·les experimentals de 100 m² per assajar l'aplicació dels mateixos tres fangs (deshidratat, tèrmic i compostat) de l'experiència anterior sobre dos sòls, formats sobre materials de diferent composició, de dues àrees molt properes amb una sola dosi 10 Mg per ha (matèria seca) (aproximadament equivalent a 6 Mg de MO de fang per ha) i durant un any. La ubicació de l'experiència va ser al terme municipal de Taradell (Osona) en dues zones, a El Puig (zona 1, margues) i al vessant sud de la Serra de Vallmitjana (zona 2, sobre conglomerats-gresos) ambdues amb un pendent mitjà del 16 % (Figura 4.2). A la zona del Puig es va escollir un antic camp de farratge abandonat de més de 20 anys en el que s'observaven evidents signes de degradació i en la zona de Vallmitjana un bosc en fase de regeneració natural arbustiva després d'un incendi (any 1983). El clima es pot catalogar com a submediterrani amb un cert caràcter continental, precipitació anual d'uns 750 mm i temperatura mitjana anual de 12°C. L'any de l'experiència va ser especialment sec i de temperatures normals. Les dimensions de la primera zona només van permetre la construcció de tres parcel·les per tractament i en la zona 2, més gran, es van fer cinc rèpliques per a cada tractament; en total es controlaren 12 i 20, 32 parcel·les (Taula 4.5). Es realitzaren dos mostreigs, l'inicial (4 dies després de l'aplicació) i el final (als 395 dies).

Taula 4.5. Conjunt de tractaments de l'experiència en parcel·les i nomenclatura de les mostres.

Zona El Puig	Barreges sòl-fang	
Sòl textura franca (F)	Fang deshidratat i assecat tèrmicament	FT
Sòl control (FO)	Fang deshidratat	FD
	Fang deshidratat i compostat	FC

Zona Vallmitjana	Barreges sòl-fang	
Sòl textura franc-arenosa (Fr)	Fang deshidratat i assecat tèrmicament	FrT
Sòl control (FrO)	Fang deshidratat	FrD
	Fang deshidratat i compostat	FrC

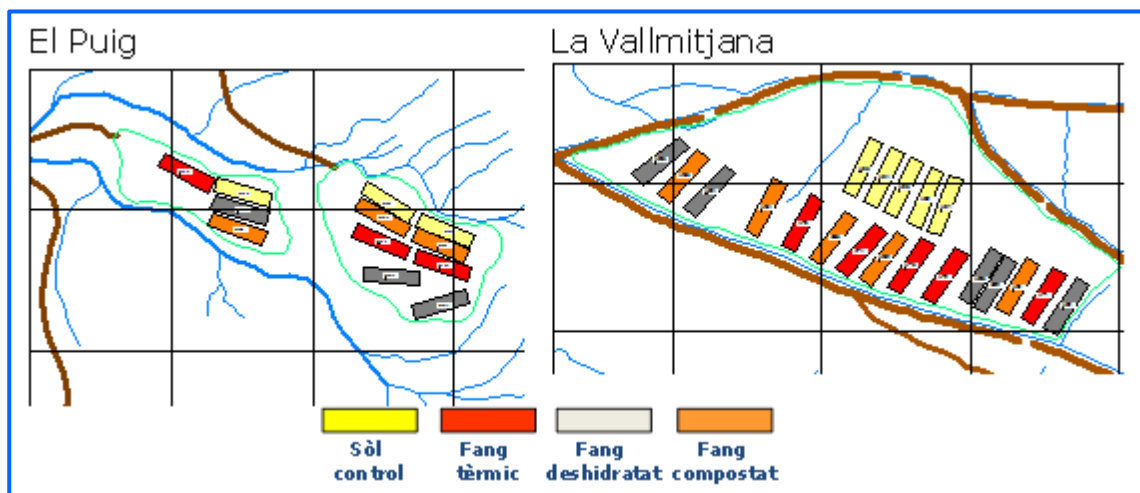
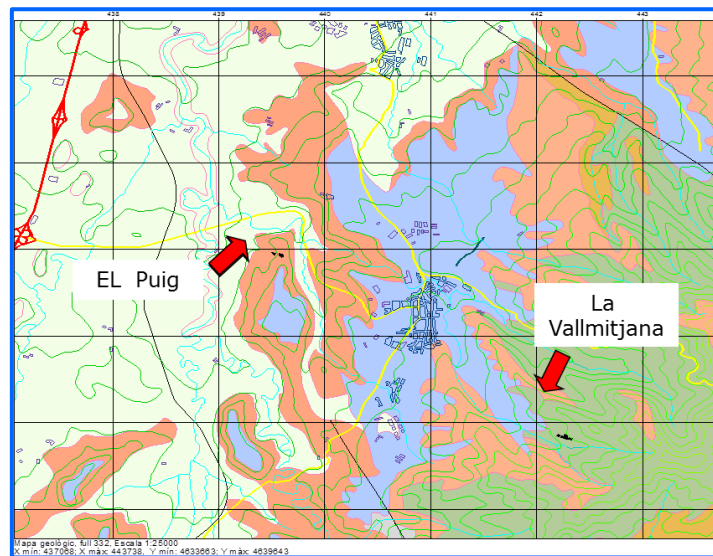


Figura 4.2 Experiència en parcel·les (Tarrasón, 2004)

4.3.2.2 Materials

Els sòls de la zona experimental de El Puig s'han format sobre dipòsits al·luvials i col·luvials de margues massives. El sòl més desenvolupat de la zona de Vallmitjana es format sobre gresos i conglomerats del Paleocè amb abundància de còdols quarzífics. Els paràmetres més importants d'aquest sòls es presenten a la Taula 4.6. La diferència més important que hi ha entre els dos sòls és la textura, molt més fina en el sòl del Puig i en canvi a Vallmitjana en els horitzons superficials hi predominen les sorres. També es pot diferenciar el sòl del Puig per la presència de carbonats i de càrrega de la calci intercanviable.

Taula 4.6. Característiques dels sòls utilitzats en l'experiència en parcel·les (Tarrasón, 2010).

Paràmetre	unitats	El Puig Sòl franc (F)	Vallmitjana Sòl franc arenós (Fr)
Densitat aparent	g cm ⁻³	1,17	1,41
Sorra grossa	g Kg ⁻¹	48,5	683,1
Sorra fina	g Kg ⁻¹	294,6	180,0
Llims	g Kg ⁻¹	492,2	59,3
Argila	g Kg ⁻¹	164,8	77,7
Classe textural (ISSS)		Franca	Franca arenosa
CaCO ₃	g Kg ⁻¹	274	nd
pH (aigua, 1:2,5)		8,05	7,10
CE (25°C)(1:5)	dS m ⁻¹	0,38	0,33
Na	cmolc Kg ⁻¹	0,12	0,29
K	cmolc Kg ⁻¹	0,43	0,40
Ca	cmolc Kg ⁻¹	34,92	3,0
Mg	cmolc Kg ⁻¹	3,43	1,7
CIC	cmolc Kg ⁻¹	25,16	22,8

Resultats expressats sobre matèria seca

Els tres fangs aplicats són de la mateixa procedència que la descrita en l'experiència anterior. A El Puig abans d'aplicar els fangs es va eliminar la vegetació (principalment matolls), i es va llaurar per eliminar la crosta superficial formada. A Vallmitjana es va fer una desbrossada mecànica amb trituració de les restes vegetals que quedaren escampades en superfície. El fang deshidratat es va aplicar amb remolc de fems i la seva distribució va ser força irregular donat el tipus de material. Els fangs compostat i tèrmic s'aplicaren amb una abonadora i en aquest cas es va assolir una distribució uniforme. A partir de les dades dels fangs (contingut en matèria seca i de MO) es va calcular la quantitat a aplicar de cadascun dels fangs per assolir un contingut de 6 Mg MO ha⁻¹. La dosi en matèria seca va ser de 10 Mg ha⁻¹ i en matèria humida varen ser de: 50 Mg ha⁻¹ de fang deshidratat, 11,3 Mg ha⁻¹ de fang tèrmic i 13,8 Mg ha⁻¹ de fang compostat. A la Taula 4.7 es presenten les quantitats de fang realment aplicades. D'acord a les quantitats de fang aplicades, els aportos de N orgànic van ser de 511, 574 i 440 Kg/ha respectivament per les parcel·les amb fang D, T i C. Immediatament després de l'aplicació dels fangs es va procedir a la sembra de tres tipus de llavors de

gramínies (*Lolium perenne* L., *Dactylis glomerata* L., i *Festuca arundinacea* S.) amb una densitat de 20 g m⁻² (equival a 200 Kg de mescla de llavors per ha).

Taula 4.7. Quantitats reals aplicades dels tres tipus de fang en l'experiència en parcel·les (Tarrasón, 2004).

	Fang deshidratat (D)	Fang deshidratat i assecat tèrmicament (T)	Fang deshidratat i compostat (C)
Pes de fang humit (Mg de fang per ha)	54	15	19
Desviació dosi teòrica (Mg de fang per ha)	+4,0	+3,7	+5,2

D'acord a l'informe final del projecte (IQS-CREAF-ESAB, 2002) i d'altres publicacions sobre la mateixa experiència (Mejía, 2005; Ojeda et al., 2008) coneixem d'altres característiques dels fangs que complementen la seva caracterització i que citem a continuació:

- i. Els estudis microbiològics dels fangs varen indicar que el fang deshidratat presenta una concentració microbiana (bacteris i fongs) molt més alta que el fang compostat i especialment que el fang tèrmic.
- ii. El fang deshidratat conté 14,7 % (g AA per 100 g fang sec) d'aminoàcids proteics i 2,3 % d'aminoàcids lliures. L'assecatge tèrmic fa disminuir els aminoàcids lliures i manté el contingut en aminoàcids proteics; en canvi el compostatge disminueix els dos tipus i el contingut en aminoàcids proteics passa a ser del 7, 4%. Aquests continguts en aminoàcids representen un 48 %, 53 % i 38 % de N proteic, respecte al N orgànic, pels fangs D, T i C respectivament.
- iii. Les proteïnes del fang deshidratat es degraden a pèptids en els posttractaments especialment en el compostatge on les cadenes són de menor pes molecular. Així, si bé el contingut en N aminoacídic és inferior en el fang compostat, el contingut en pèptids dels fangs segueix la gradació C >> T ≥ D.
- iv. Per piròlisi-cromatografia de gasos els perfils són molt similars entre els fangs deshidratat i tèrmic i en canvi hi ha baixa semblança entre fang deshidratat i fang compostat.
- v. La concentració dels contaminants orgànics del fang deshidratat disminueix en els processos de posttractament especialment en el compostatge.
- vi. El contingut en CHT dels fang són 296,3, 313,7 i 229,9 mg glucosa g⁻¹ (m.s) respectivament per D, T i C. Aquests valors representen un contingut relatiu de carbohidrats totals respecte del carboni orgànic del 24, 25 i 21 % (g C-glucosa 100 g⁻¹ C) respectivament per cadascun dels fangs D, T i C.

A partir de les dades de caracterització bioquímica de les barreges sòl-fang de l'informe final del projecte (IQS-CREAF-ESAB, 2002) també disposem dels valors d'altres paràmetres bioquímics (activitats ureàsica, proteolítica de BAA) que afegim com a complement dels resultats dels principals paràmetres bioquímics en els que hem centrat el nostre estudi. La metodologia emprada per aquestes determinacions bioquímiques és la mateixa que la utilitzada per sòls naturals (capítol 3). Per l'activitat ureàsica es va seguir el mètode de Tabatabai i Bremner (1972) modificat per Nannipieri et al. (1978) i per l'activitat de BAA (N- α -benzoil-L-argininamida) es va seguir el mètode de per Ladd i Butler (1972) modificat per Bonmatí et al. (1998).

4.3.3 Mètodes d'anàlisi

En el cas de l'experiència 1, pel mostreig (excepte en el primer) es buidaven els lisímetres i homogeneïtzaven les barreges per afavorir la mescla del fang, sobretot el deshidratat, amb el sòl. Cada mostra composta de cada lisímetre i per cada temps de mostreig s'analitza per separat i s'obtenen 3-4 rèpliques analítiques per paràmetre. A causa de la confecció manual de les barreges sòl-fang els valors dels primers mostreigs presenten alta variabilitat entre lisímetres. Per aquest motiu els valors de carboni inicials (mostreig 7 dies) de l'experiència en lisímetres corresponen a mostres compostes dels tres lisímetres d'un mateix tractament.

En el cas de l'experiència 2 es van prendre mostres compostes (10 submostres amb un cilindre de 5 x 20 cm) per cada parcel·la a l'inici i al final de l'experiència i, anàlogament al cas anterior, s'obtenen resultats de 3-4 rèpliques analítiques per paràmetre per cadascuna de les mostres.

En el cas de les mostres finals de les dues experiències, les variables activitat β -galactosidasa i contingut en N aminoacídic es van determinar sobre mostres compostes formades pels lisímetres (en el cas de l'experiència 1), o bé per les parcel·les (en el cas de l'experiència 2), del mateix tractament.

Les mostres varen ser assecades a l'aire durant una setmana, homogeneïtzades i garbellades per obtenir la fracció de terra fina (<2 mm) i emmagatzemades a temperatura ambient. Tots els resultats s'expressen sobre matèria seca.

Els protocols de les determinacions analítiques es resumeixen al capítol 5 i estan descrits a l'annex. La determinació del contingut en carboni orgànic es va fer per combustió i es fruit del treball de la posada a punt que es descriu al capítol 5 de la tesi. Per la determinació de carboni orgànic es parteix de la terra fina molturada i tamisada per sedàs 0,250 mm. L'anàlisi dels aminoàcids totals es va realitzar per hidròlisi àcida i posterior quantificació dels aminoàcids per HPLC d'acord al treball de Mejía (2005). La determinació del contingut en carbohidrats totals de les mostres de sòls es va fer a través de la doble hidròlisi amb àcid sulfúric establerta a Cheshire (1979) i en la determinació de la fracció de carbohidrats extractables és va fer servir com a reactiu extractant el K_2SO_4 0,5 M seguint els estudis de Badalucco et al. (1992); per a la quantificació vam fer servir el mètode colorimètric de l'antrona (Brink et al., 1960). Les mesures de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa es basen en la determinació colorimètrica del producte de la hidròlisi de paranitrofenilglucòsids (Tabatabai, 1982; Eivazi i Tabatabai, 1988). El protocol analític és fruit del treball de posada a punt que es descriu al capítol 5 de la tesi.

Per a la determinació de les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa en les mostres de fangs s'ha partit de la mostra assecada a l'aire i triturada. Per l'assaig de termoestabilitat de l'activitat β -glucosidasa s'ha seguit el criteri de Miller i Dick (1995) determinant l'activitat en la mostra que s'ha sotmès durant 2 hores a l'estufa a 85°C. Per la determinació de la K_M hem seguit el mètode de Eivazi i Tabatabai (1988) mesurant l'activitat β -glucosidasa a les següents concentracions de substrat: 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM i 25 mM i transformació de Lineweaver-Burk representant la inversa de l'activitat en front de la inversa de la concentració de substrat.

4.3.4 Tractament estadístic de dades

Pel conjunt de mostres dels sòls controls i les barreges sòl-fang de les dues experiències disposem d'un conjunt de dades que dividim en dues categories: variables principals (variables centrals de la tesi) i les altres variables (que formen part de la caracterització de les mostres) de la mateixa manera que hem fet pels sòls naturals (capítol 3).

Tots els tractaments de dades inclouen l'estudi de les variables anomenades directes o absolutes (expressades per g de sòl) assenyalades a la Taula 4.8 així com les variables calculades. Les variables calculades són:

- Variables relatives al contingut de MO del sòl: valors corresponents a les variables directes, però expressades per g de carboni orgànic. Treballem amb els continguts relatius en carbohidrats (CHE/C, CHT/C) i les activitats enzimàtiques específiques (GLC/C, GAL/C, UR/C i BAA/C) (prenent com a valor de C la mitjana de la mostra).
- Relació entre les variables: valors derivats del quocient entre variables: la relació entre els dos tipus de carbohidrats (CHE/CHT) i els valors corresponents a les activitats enzimàtiques expressades per mg de N aminoacídic (GLC/N_{AA}, GAL/ N_{AA}, UR/ N_{AA} i BAA/N_{AA}).

Es van fer servir models lineals (ANOVA) per avaluar la influència dels diferents factors controlats (fang, dosi i temps o dies de mostreig) i amb els lisímetres (o bé parcel·les) com a factor encaixat, sobre les variables considerades, prèvia revisió dels requeriments per un correcte ús del mètode. Les dades van ser analitzades utilitzant Statistics Analysis System software i el procediment GLM utilitzant el test de la variància (SAS, 1990). La comparació de les mitjanes de les diferents variables es va realitzar segons procediment de Tukey (nivell de significació $\alpha=0,05$). El mètode emprat per l'anàlisi i comparació d'aquestes dades s'ha fet per cadascun dels sòls de forma independent i en el cas de l'experiència 1 es treu els valors dels sòls control.

En la Taula 4.8 especifiquem les variables que s'han considerat per cadascuna de les ANOVA per l'estudi dels factors fang i dosi, en l'experiència 1 o bé només el factor fang, en el cas de l'experiència 2. El factor temps de mostreig s'estudia per a cada tractament.

Per l'assaig de termoestabilitat es comparen les activitats β -glucosidasa de les mostres escalfada i no escalfada amb el test de t de Student.

Per representar les característiques bioquímiques de les barreges finals sòl-fang es construeixen els diagrames radials amb els valors de les variables estandarditzats (Hofman et al., 2003; Miralles et al., 2007).

Taula 4.8. Característiques de l'anàlisi estadística de l'ANOVA per a les dues experiències.

	ANOVA			Variables							
				Principals						Altres	
	Nº	Factors	Data	C	CHE	CHT	GLC	GAL	N _{AA}	UR	BAA
Experiència 1	1A	fang i dosi	7 dies	x	x	x	x			x	x
		fang i dosi	67 dies	x	x	x	x			x	x
		fang i dosi	267 dies	x	x	x	x			x	x
	1B	fang i dosi	267 dies					x	x		
Experiència 2	2A	fang	4 dies	x	x	x	x			x	x
		fang	295 dies	x	x	x	x			x	x
	2B	fang	295 dies					x	x		

4.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.4.1 Experiència 1: experiència en lisímetres

4.4.1.1 Efectes globals

a. Valors i comportament de les variables

Presentem el global dels resultats de l'experiència en lisímetres separatament per a les barreges sòl-fang i pels sòls controls ja que, donades les característiques dels sòls controls i les dosis de fang aplicades, els valors dels paràmetres estudiats en ambdós tipus de mostres són molt diferents. La Taula 4.9 conté el resultat de l'estadística descriptiva, els valors de les mitjanes globals dels paràmetres per les barreges sòl-fang (considerant els dos sòls, els tres fangs, les dues dosis i els tres temps de mostreig) i les seves característiques de dispersió. Els resultats de les mostres de sòls controls es presenten en les Taules 4.10 i 4.11.

L'estadística descriptiva dels resultats de les barreges sòl-fang ens indica que els paràmetres presenten diferent variabilitat. La variabilitat dels valors de carboni és la més baixa, seguida de CHT, CHE i GLC i de les activitats enzimàtiques UR i BAA que presenten una alta variabilitat. En general, la dispersió dels paràmetres relatius al carboni és igual o superior a la del paràmetre absolut corresponent.

El *raking* de variabilitat detectat entre les variables sembla indicar que el conjunt de factors estudiats (fang, sòl i temps) tenen una especial incidència sobre les activitats enzimàtiques relacionades amb el cicle del N, ureàsica i proteolítica de BAA. De la variabilitat dels paràmetres absoluts respecte dels referits al contingut de carboni, podem deduir que, en la dispersió global de les característiques de les barreges, preval el tipus de MO més que el seu contingut.

Marando (2013) en una experiència d'aplicació de sis fangs (assecats tèrmicament i compostats) en contenidors amb dos sòls i amb una sola dosi també troba major dispersió per les activitats enzimàtiques GLC i GAL que pels valors de C, CHT i CHE.

Taula 4.9. Mitjana global, rang i dispersió (de les mitjanes dels valors de tots els tractaments i temps) per les mostres de barreges sòl-fang de l'experiència en lisímetres.

	Unitats	Mitjana \pm d.e	Mínim	Màxim	Màx/Mín	CV(%)
C	g 100 g ⁻¹	2,48 \pm 0,89	0,88	4,45	5,0	36
CHE	mg glucosa g ⁻¹	0,272 \pm 0,137	0,077	0,664	8,6	50
CHT		2,893 \pm 1,303	0,983	6,583	6,7	45
CHE/CHT	g 100 g ⁻¹	9,8 \pm 3,5	3,4	17,3	5,1	35
GLC	μ mol pNF g ⁻¹ h ⁻¹	0,245 \pm 0,144	0,066	0,799	12,1	59
UR	μ mol N g ⁻¹ h ⁻¹	1,96 \pm 1,67	0,52	7,07	13,5	85
BAA		0,97 \pm 1,16	0,06	4,25	77,3	119
CHE/C	g C-glucosa 100 g ⁻¹ C	0,51 \pm 0,42	0,19	2,77	14,7	83
CHT/C		5,19 \pm 3,00	2,18	21,26	9,8	58
GLC/C	μ mol pNF g ⁻¹ C h ⁻¹	11,14 \pm 7,99	3,86	50,97	13,2	72
UR/C	μ mol N g ⁻¹ C h ⁻¹	86,3 \pm 69,3	22,8	347,5	15,2	80
BAA/C		37,47 \pm 36,95	3,39	153,0	45,1	99

d.e, desviació estàndard; CV, coeficient de variació

Taula 4.10. Valors (mitjana \pm desviació estàndard) dels paràmetres per el sòl control argilós (COA) de l'experiència en lisímetres.

Dies	C	CHE	CHT	GLC	BAA	UR
	g 100 g ⁻¹	mg glucosa g ⁻¹		μ mol pNF g ⁻¹ h ⁻¹	μ mol N g ⁻¹ h ⁻¹	
7	1,000 \pm 0,018	0,042 \pm 0,010	0,717 \pm 0,062	0,090 \pm 0,006	0,351 \pm 0,081	0,558 \pm 0,067
67	0,702 \pm 0,238	0,060 \pm 0,013	0,846 \pm 0,080	0,124 \pm 0,010	0,357 \pm 0,030	0,264 \pm 0,027
267	0,856 \pm 0,089	0,096 \pm 0,016	1,267 \pm 0,278	0,110 \pm 0,009	0,389 \pm 0,103	0,180 \pm 0,063
Dies	CHE/CHT	CHE/C	CHT/C	GLC/C	BAA/C	UR/C
	g 100 g ⁻¹	g C-glucosa 100 g ⁻¹ C		μ mol pNF g ⁻¹ C h ⁻¹	μ mol N g ⁻¹ C h ⁻¹	
7	5,8 \pm 1,3	0,17 \pm 0,04	2,87 \pm 0,25	8,98 \pm 0,58	35,1 \pm 8,1	55,8 \pm 6,7
67	7,2 \pm 1,8	0,36 \pm 0,13	5,10 \pm 1,38	17,91 \pm 3,98	53,3 \pm 11,3	39,3 \pm 12,7
267	7,9 \pm 2,5	0,45 \pm 0,09	5,95 \pm 1,32	12,84 \pm 1,23	45,9 \pm 13,4	21,3 \pm 8,2

Taula 4.11. Valors (mitjana i desviació estàndard) dels paràmetres per el sòl control sauló (COS) de l'experiència en lisímetres.

Dies	C	CHE	CHT	GLC	BAA	UR
	g 100 g ⁻¹	mg glucosa g ⁻¹		μ mol pNF g ⁻¹ h ⁻¹	μ mol N g ⁻¹ h ⁻¹	
7	0,163 \pm 0,010	< 0,1	< 1	< 0,02	< 0,2	< 0,2
67	0,146 \pm 0,005	< 0,1	< 1	< 0,02	< 0,2	< 0,2
267	0,143 \pm 0,020	< 0,1	< 1	< 0,02	< 0,2	< 0,2

Ambdós sòls controls presenten uns valors molt baixos dels paràmetres analitzats, i molt especialment el sòl sauló que presenta, per totes les variables bioquímiques, valors inferiors al sòl argilós i per sota del límit de detecció de les tècniques analítiques emprades per a la seva determinació. Les característiques del sòl control sauló seran especialment indicades per posar de manifest les característiques pròpies dels fangs i per tant diferenciadores dels posttractaments.

Amb el temps d'incubació, detectem un descens de carboni orgànic (en ambdós sòls controls el contingut en C disminueix un 12 %). En el sòl control A es dona un augment del contingut en CHE i CHT del sòl així com de la seva proporció sobre el total de la MO i de la relació CHE/CHT; les activitats enzimàtiques es mantenen durant el període controlat excepte l'activitat UR que presenta una davallada continuada amb el temps.

Els sòls controls emprats en l'experiència tenen les característiques bioquímiques associades als sòls molt pobres en MO d'acord a la seva procedència. El sòl control argilós és més semblant als sòls emprats en d'altres experiències bibliogràfiques similars amb sòls degradats i en canvi el sòl sauló s'acosta més al material afegit en proves respiromètriques (Huerta et al., 2010). El procés de mineralització detectat en els sòls control està d'acord amb l'augment dels valors de biomassa microbiana i de la relació C-microbià/C detectat per Tarrasón (2004). Aquest autor constata que la incubació dels sòls en condicions òptimes de T i humitat afavoreix el desenvolupament de la biomassa. Madejón et al. (2001b) en una experiència d'incubació semblant detecten pel sòl control tipus argilós una major disminució del carboni, al voltant d'un 25 % en 280 dies. Bastida et al. (2012) troben pel sòl control una important pèrdua de carboni (al voltant del 30 % en 365 dies d'incubació) indicant la capacitat de degradació de la MO estabilitzada d'un sòl procedent d'una regió semi-àrida en les condicions favorables de la incubació.

Els resultats del valor de F de la ANOVA 1A (ANOVA de dos factors fang i dosi amb interacció, per a cada temps) es presenten en la Taula 4.12. D'acord amb els objectius la caracterització de les barreges dels 267 dies s'ha complementat amb les determinacions de l'activitat β -galactosidasa (GAL) i el contingut en N aminoacídic (N_{AA}) que alhora ha permès determinar també el quocients entre les activitats i el N aminoacídic. **Els resultats del valor de F del tractament de dades ANOVA 1B** (ANOVA de dos factors fang i dosi amb interacció) per aquestes variables es presenten en la Taula 4.13. A partir dels resultats de l'ANOVA 1A podem resumir com a tendències més destacables:

- i. A l'inici, totes les variables, a excepció de l'activitat UR, presenten efecte fang i dosi en ambdós sòls.
- ii. Tant a l'inici com al final, les variables directament relacionades amb l'aport de MO (C i CHT i CHE) presenten l'efecte fang, dosi i interacció més acusat que les activitats enzimàtiques en ambdós sòls.
- iii. Al final, totes les variables, a excepció de l'activitat BAA, segueixen presentant efecte fang i dosi en ambdós sòls.
- iv. Les variables relatives a carboni més diferenciadores de les barreges són a l'inici BAA/C i CHT/C (en el sòl A) i GLC/C i CHE/C (en el sòl S).
- v. Les variables relatives més diferenciadores de les barreges al final són CHE/C, CHE/CHT i l'activitat específica GLC/C en ambdós sòls.
- vi. Les variables relatives al carboni no presenten efecte dosi, inicialment, però si amb el temps i especialment en el sòl A.

Taula 4.12. Resultats de l'ANOVA 1A per a l'experiència en lisímetres: valors de F pels factors fang (F), dosi (D) i interacció fang-dosi (F x D).

Barreges sòl A					Barreges sòl S				
Dies	Factor	Variable			Dies	Factor	Variable		
7		C	CHE	CHT	7		C	CHE	CHT
	F	-	45,5***	74,5***		F	-	108,0***	12,6**
	D	-	70,9***	114,7***		D	-	165,2***	110,2***
	F x D	-	11,4***	20,7***		F x D	-	4,1*	ns
		GLC	BAA	UR			GLC	BAA	UR
	F	22,2***	25,2***	ns		F	22,8***	ns	ns
	D	6,5*	35,7***	ns		D	24,0***	11,9**	ns
	F x D	ns	ns	ns		F x D	4,7*	ns	ns
		CHE/CHT	CHE/C	CHT/C			CHE/CHT	CHE/C	CHT/C
	F	6,4*	21,0***	50,7***		F	18,8***	60,2***	17,1***
	D	8,7*	ns	ns		D	ns	ns	ns
	F x D	ns	ns	7,3**		F x D	ns	4,1*	ns
		GLC/C	BAA/C	UR/C			GLC/C	BAA/C	UR/C
	F	12,3**	26,9***	4,3*		F	35,9***	5,7*	ns
D	ns	ns	ns	D	14,4**	ns	9,1*		
F x D	ns	14,6***	ns	F x D	18,0**	ns	ns		
Barreges sòl A					Barreges sòl S				
Dies	Factor	Variable			Dies	Factor	Variable		
67		C	CHE	CHT	67		C	CHE	CHT
	F	35,8***	30,9***	148,6***		F	7,6**	88,7***	73,6***
	D	217,1***	76,5***	170,4***		D	102,5***	64,4**	161,6***
	F x D	5,6***	ns	9,4**		F x D	ns	ns	10,7**
		GLC	BAA	UR			GLC	BAA	UR
	F	20,6***	14,2***	119,2***		F	23,3***	ns	43,0***
	D	16,4**	32,6***	133,9***		D	44,2***	11,4**	ns
	F x D	ns	11,8**	16,4***		F x D	ns	ns	4,7*
		CHE/CHT	CHE/C	CHT/C			CHE/CHT	CHE/C	CHT/C
	F	ns	17,2***	24,8***		F	49,9***	30,7***	13,6***
	D	7,22*	5,2*	ns		D	24,3***	13,3**	ns
	F x D	ns	ns	ns		F x D	13,6***	ns	ns
		GLC/C	BAA/C	UR/C			GLC/C	BAA/C	UR/C
	F	6,7*	18,2***	157,3***		F	ns	ns	69,3***
D	8,1*	19,6***	24,9***	D	10,0**	ns	58,1***		
F x D	ns	12,3**	4,6*	F x D	ns	ns	23,8***		
Barreges sòl A					Barreges sòl S				
Dies	Factor	Variable			Dies	Factor	Variable		
267		C	CHE	CHT	267		C	CHE	CHT
	F	26,1***	34,2***	35,0***		F	36,3***	169,1***	63,6***
	D	70,0***	63,7***	277,1***		D	187,1***	139,2***	213,4***
	F x D	ns	ns	16,24***		F x D	4,2*	51,8***	5,9**
		GLC	BAA	UR			GLC	BAA	UR
	F	14,4***	ns	14,5***		F	26,4***	ns	4,1*
	D	6,9*	15,7**	26,5***		D	19,3***	ns	5,3*
	F x D	ns	4,3*	21,6***		F x D	ns	ns	6,2*
		CHE/CHT	CHE/C	CHT/C			CHE/CHT	CHE/C	CHT/C
	F	90,3***	66,3***	ns		F	28,2***	20,4***	ns
	D	17,4**	ns	35,5***		D	ns	ns	5,5*
	F x D	39,8*	15,9***	5,5*		F x D	29,7***	8,3**	15,5***
		GLC/C	BAA/C	UR/C			GLC/C	BAA/C	UR/C
	F	31,4***	4,7*	12,6**		F	24,3***	ns	ns
D	84,0***	35,7***	11,4**	D	9,6**	ns	40,4***		
F x D	14,9***	8,1**	23,5***	F x D	ns	ns	7,3**		

<0,05 **<0,01 ***<0,001; ns no significatiu

Taula 4.13. Resultats de l'ANOVA 1B per a l'experiència en lisímetres: valors de F pels factors: fang (F), dosi (D) i interacció fang-dosi (F x D).

Sòl A	GAL	GAL/C	N _{AA}	GLC/N _{AA}	GAL/N _{AA}	BAA/N _{AA}	UR/N _{AA}
F	ns	ns	133,1***	170,6***	4,6*	7,5**	ns
D	14,4**	ns	255,7***	442,2***	ns	98,3***	ns
F x D	ns	ns	20,4***	50,2***	ns	15,5***	32,1***
Sòl S	GAL	GAL/C	N _{AA}	GLC/N _{AA}	GAL/N _{AA}	BAA/N _{AA}	UR/N _{AA}
F	15,7***	21,5***	187,2***	791,0***	33,9***	3,7*	13,7***
D	29,2***	ns	237,3***	442,2***	8,3*	ns	97,2***
F x D	9,9***	11,2**	22,9***	50,2***	12,8**	7,7**	6,3**

* <0,05 ** <0,01 *** <0,001; ns no significatiu

D'acord als resultats de l'ANOVA 1B, la nova variable N aminoacídica, junt amb la variable calculada GLC/N_{AA}, destaquen per ser les de màxim poder discriminant de les barreges finals en ambdós sòls.

La capacitat diferenciadora de les variables (assenyalada en el punt ii) és coherent amb la major dependència dels paràmetres directament relacionats amb el contingut de MO que no pas de les activitats enzimàtiques. Si traiem la influència de la quantitat de MO aportada pels fangs, i considerem les variables relatives a carboni (punt iv) la diferenciació de les barreges a l'inici està relacionada amb el diferent contingut en pèptids, càrrega microbiana i labilitat que diferencia els fangs (descrita a l'apartat de materials). D'acord al que hem assenyalat (punts i, iii), el comportament de l'activitat UR és indicatiu d'una possible inhibició inicial i la minva de la capacitat diferenciadora de l'activitat proteolítica de BAA és coherent amb la previsible progressiva hidròlisi del material peptídica aportat pel fang. Del comportament de les variables també poden entreveure que la MO aportada pels diferents fangs i dosis comporta al final del període d'incubació una MO restant en les barreges de diferent grau de maduresa i molt especialment amb diferent contingut en N aminoacídica i, en conseqüència, també de GLC/N_{AA} o sigui de la presència de proteïna enzimàticament activa (pel que fa a la hidròlisi de carbohidrats) en la MO que resta als 267 dies.

b. Efecte fang i canvis dels paràmetres amb el temps d'incubació

Els resultats de la separació de mitjanes d'acord a ANOVA 1A es presenten en les Taules 4.14, 4.15, 4.16 i 4.17 on incloem els valors de les mitjanes dels diferents paràmetres per a les barreges sòl-fang per a cada temps indicant les diferències significatives degudes a al fang i a la dosi. Anàlogament presentem en les Taules 4.18 i 4.19 els resultats de la caracterització complementària de les barreges i del sòls controls als 267 dies (amb l'activitat β -galactosidasa (GAL) i el contingut en N aminoacídica (N_{AA}) i els quocients entre les activitats i el N aminoacídica) d'acord a la ANOVA 1B.

Taula 4.14. Resultats del contingut en carboni orgànic ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), carbohidrats totals i extractables (mg glucosa g^{-1}) i de les relacions CHE/CHT ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), CHE/C i CHT/C ($\text{g C-glucosa } 100 \text{ g}^{-1}\text{C}$) en les barreges de l'experiència en lisímetres corresponents al sòl argilós pels 7, 67 i 267 dies de mostreig.

7 dies	Carboni orgànic		Carbohidrats extractables		Carbohidrats totals	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja A-T	2,364CV	4,449Aa	0,215Ab	0,498Aa	3,109Ab	5,340A
Barreja A-D	2,452Ab	3,831Ba	0,115Aa	0,204Ba	2,141Bb	3,812B
Barreja A-C	2,397Bb	3,451Ca	0,126ABa	0,226Ba	2,300Ba	2,699C
7 dies	CHE/CHT		CHE/C		CHT/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja A-T	6,9Aa	9,3Aa	0,36Aa	0,45Aa	5,26Aa	4,80Aa
Barreja A-D	5,4Aa	5,4Ba	0,19Ba	0,21Ba	3,49Ba	3,98Ba
Barreja A-C	5,5Aa	8,5ABa	0,21ABa	0,26Ba	3,84Ba	3,13Ca
67 dies	Carboni orgànic		Carbohidrats extractables		Carbohidrats totals	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja A-T	2,723Ab	3,798Aa	0,385Ab	0,664Aa	3,436Ab	5,218A
Barreja A-D	1,958Bb	3,355Ba	0,319Ab	0,539ABa	2,527Bb	3,889B
Barreja A-C	2,157Bb	2,948Ba	0,215Bb	0,363Ba	1,866CV	2,605C
67 dies	CHE/CHT		CHE/C		CHT/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja A-T	11,2 Aa	12,7Aa	0,57ABa	0,70Aa	5,06Aa	5,50Aa
Barreja A-D	12,6 Aa	13,9 Aa	0,65Aa	0,64ABa	5,17Aa	4,64AB
Barreja A-C	11,6 Aa	13,9 Aa	0,40Ba	0,49Ba	3,51Ba	3,54Ba
267 dies	Carboni orgànic		Carbohidrats extractables		Carbohidrats totals	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja A-T	2,836Ab	3,682Aa	0,229Ab	0,403Aa	3,623Ab	6,583A
Barreja A-D	1,854Bb	3,037Ba	0,299Aa	0,392ABa	2,315Bb	5,2988
Barreja A-C	2,103Bb	2,764Ba	0,132Bb	0,251Ba	3,233Ab	4,467B
267 dies	CHE/CHT		CHE/C		CHT/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja A-T	6,13Ba	6,1ABa	0,32Ba	0,44ABa	5,12Ab	7,21Aa
Barreja A-D	12,9Aa	7,4Ab	0,64Aa	0,52Ab	4,99Ab	6,99Aa
Barreja A-C	4,1Ca	5,6Ba	0,25Ba	0,36Ba	6,16Aa	6,47Aa

Per cada paràmetre i data, valors dins d'una mateixa columna seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre fangs a una mateixa dosi. Per cada paràmetre i data, valors dins d'una mateixa fila seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre dosi per un mateix fang.

Taula 4.15. Resultats del contingut en carboni orgànic ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), carbohidrats totals i extractables ($\text{mg glucosa } \text{g}^{-1}$) i de les relacions CHE/CHT ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), CHE/C i CHT/C ($\text{g C-glucosa } 100 \text{ g}^{-1}\text{C}$) en les barreges de l'experiència en lisímetres corresponents al sòl sauló pels 7, 67 i 267 dies de mostreig.

7 dies		Carboni orgànic		Carbohidrats extractables		Carbohidrats totals	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja S-T	1,882Bb	3,680Aa	0,278Ab	0,470Aa	1,684Ab	3,611Aa	
Barreja S-D	1,432CV	2,682Ca	0,122Bb	0,232Ba	1,558Ab	3,022ABa	
Barreja S-C	2,067Ab	3,657Ba	0,140Bb	0,287Ba	1,124Ab	2,387Ba	
7 dies		CHE/CHT		CHE/C		CHT/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja S-T	16,8Aa	13,07Aa	0,611Aa	0,511Aa	3,696Aa	3,925Aa	
Barreja S-D	8,3Ba	7,7Ba	0,341Ba	0,347Ba	4,353Aa	4,507Aa	
Barreja S-C	12,3ABa	12,2Aa	0,270Ba	0,314Ba	2,175Ba	2,611Ba	
67 dies		Carboni orgànic		Carbohidrats extractables		Carbohidrats totals	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja S-T	1,574Ab	3,105Aa	0,212Bb	0,275Ba	2,038Ab	3,569Aa	
Barreja S-D	1,264Ab	2,590ABa	0,288Ab	0,426Aa	1,665Ab	3,478Aa	
Barreja S-C	1,092Ab	2,319Ba	0,114CV	0,206Ba	1,015Bb	1,683Ba	
67 dies		CHE/CHT		CHE/C		CHT/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja S-T	10,5Ba	7,7Bb	0,54Ba	0,35Ba	5,17Aa	4,60ABa	
Barreja S-D	17,3Aa	12,3Ab	0,92Aa	0,66Aa	5,34Aa	5,40Aa	
Barreja S-C	11,3Ba	12,2Aa	0,42Ba	0,37Ba	3,72Aa	3,03Ba	
267 dies		Carboni orgànic		Carbohidrats extractables		Carbohidrats totals	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja S-T	1,402Ab	2,449Aa	0,161Ab	0,376Aa	1,930Ab	2,838Aa	
Barreja S-D	1,187ABb	2,342Aa	0,186Ab	0,299Ba	2,017Ab	2,742Aa	
Barreja S-C	0,886Bb	1,565Ba	0,086Ba	0,077Ca	0,983Bb	2,259Ba	
267 dies		CHE/CHT		CHE/C		CHT/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja S-T	8,4Ab	13,3Aa	0,46Ba	0,62Aa	5,51ABa	4,64Aa	
Barreja S-D	9,2Aa	10,9Aa	0,64Aa	0,51Aa	6,85Aa	4,70Ab	
Barreja S-C	8,8Aa	3,4Bb	0,40Ba	0,19Ba	4,54Ba	5,80Aa	

Per cada paràmetre i data, valors dins d'una mateixa columna seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre fangs a una mateixa dosi. Per cada paràmetre i data, valors dins d'una mateixa fila seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre dosi per un mateix fang.

Taula 4.16. Resultats de les activitats β -glucosidasa ($\mu\text{mol pNFg}^{-1} \text{h}^{-1}$), ureàsica i proteolítica de BAA ($\mu\text{mol N g}^{-1} \text{h}^{-1}$) i de les activitats específiques GLC/C ($\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{C h}^{-1}$), UR/C i BAA/C ($\mu\text{mol N g}^{-1} \text{C h}^{-1}$) en les barreges de l'experiència en lisímetres corresponents al sòl argilós pels dies 7, 67 i 267 de mostreig.

7 dies		β -glucosidasa		Ureàsica		Proteolítica BAA	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja A-T	0,602Aa	0,812Aa	1,450Aa	2,000Aa	3,618Aa	4,276Aa	
Barreja A-D	0,306ABa	0,459Ba	0,646Aa	0,885Aa	0,842Bb	2,561Ba	
Barreja A-C	0,204Ba	0,292Ba	0,659Aa	1,541Aa	1,661Bb	3,882ABa	
7 dies		GLC/C		UR/C		BAA/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja A-T	25,48Aa	18,26Aa	61,3Aa	44,9 Aa	153,0Aa	96,1Ab	
Barreja A-D	12,49ABa	11,97Aa	26,4 Aa	23,1 Aa	34,3Ba	66,9Aa	
Barreja A-C	8,53Ba	8,46Aa	27,5 Aa	44,6 Aa	69,3Ba	112,5Ab	
67 dies		β -glucosidasa		Ureàsica		Proteolítica BAA	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja A-T	0,310Aa	0,325ABa	1,460Ba	2,355Ca	0,201Ab	3,333Aa	
Barreja A-D	0,254Ab	0,328Aa	3,480Ab	7,068Aa	1,036Aa	2,038Aa	
Barreja A-C	0,177Ba	0,250Ba	1,313Bb	3,500Ba	0,144Aa	0,320Ba	
67 dies		GLC/C		UR/C		BAA/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja A-T	11,42ABa	8,56Aa	53,7Ba	62,1Ca	7,2Bb	87,5Aa	
Barreja A-D	13,00Aa	9,82Aa	178,1Aa	210,5Aa	53,1Aa	61,1Aa	
Barreja A-C	8,30Ba	8,54Aa	61,3Bb	118,7Ba	6,6Ba	10,8Ba	
267 dies		β -glucosidasa		Ureàsica		Proteolítica BAA	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja A-T	0,20Aa	0,23Aa	4,6Aa	3,9Ba	0,7Aa	0,6Aa	
Barreja A-D	0,17Aa	0,20ABa	1,5Bb	6,90Aa	1,0Aa	0,3Ab	
Barreja A-C	0,15Aa	0,16Ba	1,4Ba	2,7Ba	0,5Aa	0,3Aa	
267 dies		GLC/C		UR/C		BAA/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H	
Barreja A-T	6,89Ba	6,17Aa	162,9Aa	106,5Ba	25,4Ba	17,2Aa	
Barreja A-D	9,39Aa	6,48Ab	77,9Bb	225,6Aa	52,3Aa	10,0Ab	
Barreja A-C	7,00Ba	5,84Ab	63,9Ba	96,1Ba	25,5Ba	10,5Aa	

Per cada paràmetre i data, valors dins d'una mateixa columna seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre fangs a una mateixa dosi. Per cada paràmetre i data, valors dins d'una mateixa fila seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre dosi per un mateix fang.

Taula 4.17. Resultats de les activitats β -glucosidasa ($\mu\text{mol pNFg}^{-1} \text{h}^{-1}$), ureàsica i proteolítica de BAA ($\mu\text{mol N g}^{-1} \text{h}^{-1}$) i de les activitats específiques GLC/C ($\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{C h}^{-1}$), UR/C i BAA/C ($\mu\text{mol N g}^{-1} \text{C h}^{-1}$) en les barreges de l'experiència en lisímetres corresponents al sòl sauló pels 7, 67 i 267 dies de mostreig.

7 dies	β-glucosidasa		Ureàsica		Proteolítica BAA	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja S-T	0,342Aa	0,346Aa	0,631Aa	0,601Aa	0,264Aa	0,867Aa
Barreja S-D	0,162Bb	0,289Aa	0,523Aa	0,733Aa	0,386Aa	0,612Aa
Barreja S-C	0,117Bb	0,252Aa	0,544Aa	0,872Aa	0,115Aa	0,544Aa
7 dies	GLC/C		UR/C		BAA/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja S-T	18,191 Aa	9,402Ab	34,656Aa	16,334Aa	14,491Aa	23,664Aa
Barreja S-D	11,328Ba	10,759Aa	36,519Aa	27,345Aa	26,964Aa	22,813Aa
Barreja S-C	5,669Ca	6,889Aa	26,330Aa	23,841Aa	5,548Aa	14,873Aa
67 dies	β-glucosidasa		Ureàsica		Proteolítica BAA	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja S-T	0,211Ab	0,307Aa	1,579Ba	2,031ABa	0,385A	-----
Barreja S-D	0,139ABa	0,211Ba	4,364Aa	2,963Aa	0,273Aa	0,745Aa
Barreja S-C	0,120Bb	0,203Ba	0,772Ba	0,786Ba	0,165Aa	0,539Aa
67 dies	GLC/C		UR/C		BAA/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja S-T	13,39Aa	9,87Aa	100,2Ba	64,9ABa	24,354	-----
Barreja S-D	11,07Aa	8,17Aa	347,5Aa	116,6Ab	23,098	29,326
Barreja S-C	10,99Aa	9,32Aa	70,9Ba	34,3Ba	15,123	23,282
267 dies	β-glucosidasa		Ureàsica		Proteolítica BAA	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja S-T	0,136Aa	0,174Aa	1,498ABa	1,350Aa	0,209Aa	0,809Aa
Barreja S-D	0,066Ba	0,090Ba	1,760Aa	0,654Ab	0,060Aa	0,404Aa
Barreja S-C	0,094ABb	0,147Aa	0,781Ba	0,957Aa	0,105Aa	0,055Aa
267 dies	GLC/C		UR/C		BAA/C	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja S-T	9,73Aa	7,05ABa	107,3ABa	54,7Aa	14,9	33,1
Barreja S-D	5,73Ba	3,86Ba	150,2Aa	28,0Ab	5,6	17,3
Barreja S-C	10,92Aa	9,52Aa	88,1Ba	60,3Aa	12,3	3,4

Per cada paràmetre i data, valors dins d'una mateixa columna seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre fangs a una mateixa dosi. Per cada paràmetre i data, valors dins d'una mateixa fila seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre dosi per un mateix fang.

Taula 4.18. Resultats del contingut en nitrogen aminoacídic (N_{AA}) i activitat β -galactosidasa (GAL). Valors absoluts i relatius al carboni en les mostres finals (267 dies) de l'experiència en lisímetres per sòls controls ($x \pm d.e$) i barreges corresponents al sòl argilós i sòl sauló.

Sòl A	N_{AA}		β -galactosidasa		GAL/C	
	mg N_{AA} g ⁻¹		μ mol pNF g ⁻¹ h ⁻¹		μ mol pNF g ⁻¹ C h ⁻¹	
COA	0,093 \pm 0,009		< 0,02		-	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja A-T	1,118Ab	1,654Aa	< 0,02	0,030Aa	-	0,815Aa
Barreja A-D	0,612Bb	1,512Ba	< 0,02	0,028Aa	-	0,921Aa
Barreja A-C	0,449CV	0,775Ca	< 0,02	0,023Aa	-	0,833Aa
Sòl S	N_{AA}		β -galactosidasa		GAL/C	
	mg N_{AA} g ⁻¹		μ mol pNF g ⁻¹ h ⁻¹		μ mol pNF g ⁻¹ C h ⁻¹	
COS	0,022 \pm 0,017		< 0,02		nd	
Dosi	L	H	L	H	L	H
Barreja S-T	0,479Ab	0,976Aa	< 0,02	< 0,02	-	0,490Ba
Barreja S-D	0,404Bb	0,726Ba	< 0,02	0,026Ba	-	1,111Ba
Barreja S-C	0,173CV	0,334Ca	< 0,02	0,037Aa	-	2,424Aa

Per cada paràmetre, valors dins d'una mateixa columna seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre fangs a una mateixa dosi. Per cada paràmetre, valors dins d'una mateixa fila seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre dosi per un mateix fang.

Taula 4.19. Resultats dels quocients entre les activitats β -glucosidasa (GLC), β -galactosidasa (GAL), proteolítica de BAA (BAA) i ureàsica (UR) i el contingut en nitrogen aminoacídic (N_{AA}) en les mostres finals (267 dies) de l'experiència en lisímetres per sòls controls ($x \pm d.e$) i barreges corresponents al sòl argilós i sòl sauló.

Sòl A	GLC/ N_{AA}		GAL/ N_{AA}		BAA/ N_{AA}		UR/ N_{AA}	
	μ mol pNF mg ⁻¹ N_{AA} h ⁻¹		μ mol N mg ⁻¹ N_{AA} h ⁻¹		μ mol N mg ⁻¹ N_{AA} h ⁻¹		μ mol N mg ⁻¹ N_{AA} h ⁻¹	
COA	1,187 \pm 0,100		-		4,207 \pm 1,110		1,948 \pm 0,684	
Dosi	L	H	L	H	L	H	L	H
A-T	0,174Ca	0,138Bb	-	0,018Aa	0,642Ca	0,385Aa	4,140Aa	2,369CV
A-D	0,284Ba	0,130Bb	-	0,019Aa	1,596Aa	0,200Aa	2,371Bb	4,550Aa
A-C	0,327Aa	0,208Ab	-	0,030Aa	1,198Ba	0,370Ab	3,002Ba	3,413Ba
Sòl S	GLC/ N_{AA}		GAL/ N_{AA}		BAA/ N_{AA}		UR/ N_{AA}	
	μ mol pNF mg ⁻¹ N_{AA} h ⁻¹		μ mol N mg ⁻¹ N_{AA} h ⁻¹		μ mol N mg ⁻¹ N_{AA} h ⁻¹		μ mol N mg ⁻¹ N_{AA} h ⁻¹	
COS	-		-		-		-	
Dosi	L	H	L	H	L	H	L	H
S-T	0,284Ba	0,178Bb	nd	nd	0,436ABb	0,829Aa	3,127Ba	1,383Bb
S-D	0,163Ca	0,124CV	nd	0,036Ba	0,149Bb	0,556Aa	4,356Aa	0,901Bb
S-C	0,543Aa	0,440Ab	nd	0,114Aa	0,607Aa	0,165Bb	4,514Aa	2,865Ab

nd no detectable

Per cada paràmetre, valors dins d'una mateixa columna seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre fangs a una mateixa dosi. Per cada paràmetre, valors dins d'una mateixa fila seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre dosi per un mateix fang.

Com a efecte global de l'addició dels fangs als sòls controls es pot observar que com a conseqüència de l'afegit de qualsevol tipus de fang i als dos tipus de sòls hi ha un increment de tots els paràmetres estudiats. Per tal d'avaluar aquest increment, definim l'**efecte intensificador** dels fangs com el valor del quocient que resulta de dividir el valor de les variables en les barreges per la corresponent variable en el sòl control (Taula 4.20).

Taula 4.20. Rang de valors de l'efecte intensificador* per a les diferents variables a l'inici i al final de l'experiència en lisímetres.

	C		CHT		CHE		N _{AA}
	7 dies	267 dies	7 dies	267 dies	7 dies	267 dies	267 dies
Barreges sòl A	2-4	2-4	3-7	2-5	3-12	2-4	7-15
Barreges sòl S	10-20	6-17	-	-	-	-	12-33
	GLC		UR		BAA		GAL
	7 dies	267 dies	7 dies	267 dies	7 dies	267 dies	267 dies
Barreges sòl A	2-9	1-2	1-4	7-38	2-12	0,7-3	-
Barreges sòl S	-	-	-	-	-	-	-

(*) valor mínim i màxim del quocient que resulta de dividir el valor de les variables en les barreges entre el corresponent valor en el sòl control.

L'efecte intensificador del fang sobre els paràmetres bioquímics només l'hem pogut calcular sobre el sòl control A ja que no disposem de dades del sòl control S. L'efecte intensificador sobre el sòl S ha de ser superior al calculat per el sòl A donat que, tal com hem vist, els valors del control són inferiors.

La variable més incrementada per l'afegit del fang inicialment és el contingut en CHE. Al final de la incubació l'efecte intensificador encara que ha disminuït, segueix existint (només per BAA el valor mínim és <1). Al final el grau d'intensificació dels fangs és més semblant per totes les variables a excepció del contingut en N aminoacídic i l'activitat UR que és la variable més augmentada als 267 dies.

L'efecte intensificador detectat per totes les variables està d'acord amb els resultats de múltiples experiències in vitro de barreges sòl-residu orgànic i és paral·lel al descrit a Tarrasón (2004) i Jiménez et al. (2007) per les propietats biològiques biomassa microbiana i respiració de la mateixa experiència. Diverses experiències descrites a la bibliografia consideren que aquest increment es justifica atenent a l'activitat biològica del propi material afegit i a l'estimulació de la biomassa del sòl per la matèria orgànica aportada (Eivazi i Zacaria, 1993; Roldán et al., 1994; Serra-Wittling et al., 1995; Moreno et al., 1999; Madejón et al., 2001b; Debosz et al., 2002; Kizilkaya et al., 2005; Saviozzi et al., 2002; Pascual et al., 2002; Pascual et al., 2007).

L'efecte activador de la MO afegida sobre la biomassa del sòl està d'acord amb què la intensitat dels increments ve influenciada pel tipus de sòl, i és més gran en el sòl més pobre en MO. L'efecte estimulador es manifesta clarament en les barreges amb sòl argilós ja que totes les variables (excepte la UR) es veuen inicialment incrementades per sobre de l'augment del contingut en carboni orgànic; en el cas de les barreges amb sòl arenós això només succeeix pel valor de CHE. La variable que trobem inicialment més incrementada (CHE) respon a l'aport de MO làbil per part d'aquest tipus de residus orgànics (Jeuch et al., 2000; Singh i Agrawal, 2008; Soliva, 2008) i l'increment similar de C, CHT i GLC obeeix al lligam d'aquesta activitat enzimàtica amb el contingut de MO (Eivazi i Tabatabai, 1988; Turner, 2002; Knight i Dick, 2004).

A partir dels valors de les Taules 4.14 a 4.17 pels 7, 67 i 267 dies podem avaluar **l'efecte temps** global o tendència general dels paràmetres amb el temps d'incubació encara que la significació estadística del factor temps es detalla en les figures dels apartats següents on es discuteixen els resultats per cada grup de variables. El comportament es pot resumir en els tres punts següents:

- i. Els valors de C i de l'activitat GLC finals són per totes les barreges significativament inferiors als valors inicials.
- ii. Els valors de l'activitat proteolítica BAA finals són menors o iguals als inicials i els de l'activitat UR significativament superiors a les inicials.
- iii. L'evolució dels carbohidrats de les barreges amb el temps d'incubació no es pot generalitzar ja que la dels CHT depèn del tipus de sòl i la dels CHE depèn del tipus de fang afegit.

L'evolució de les activitats enzimàtiques amb el temps d'incubació, segueix la pauta general descrita d'un ràpid i significatiu increment amb l'addició del residu orgànic i posterior descens progressiu (Moreno et al., 1999; Madejón et al., 2001b). Madejón et al. (2001b) apunten que una possible causa de la davallada d'activitats pot ser la manca de vegetació i d'altres autors atribueixen la davallada de les activitats hidrolítiques a la manca de compostos fàcilment degradables o bé a la presència de metalls assimilables (Kizilkaya et al., 2005; Bastida et al., 2012). Pel que fa als canvis en el contingut en carbohidrats no hem trobat cap pauta general a la bibliografia; es descriuen fluctuacions d'aquest valor al llarg del temps d'incubació on sembla tenir un paper destacat la dinàmica de successió de la flora microbiana d'acord a Kinsbursky et al. (1989) i Roldán, et al. (1994) i l'equilibri mineralització-humificació d'acord a Pascual et al. (1999).

Al final de l'experiència, les barreges tenen uns valors de carbohidrats i activitats enzimàtiques incrementats, respecte del control, de forma similar a l'increment final en MO. Aquest procés d'homogeneïtzació dels increments entre les variables amb el temps es pot relacionar amb la tendència del sòl esmenat a assolir un nou estat d'equilibri (Senesi, 1989). Serra-Wittling et al. (1995) també constaten que amb el temps els diferents tractaments s'igualen i ho atribueixen a què s'esgota la MO disponible i el sòl tendeix, per mecanisme homeostàtic, a un estat estable.

El contingut en N aminoacídic en les mostres finals és la variable que resta més incrementada per l'addició de fangs respecte del sòl control al cap dels 267 dies. Aquest resultat és explicable si tenim en compte que el component proteic dels fangs és el majoritari respecte de la MO i del N orgànic (Hattori i Mukai, 1986; Pascual et al., 1999; Jeuch et al., 2000; Singh i Agrawal, 2008). A més a més, les variables N_{AA} i GLC/N_{AA} en les mostres finals, que són les úniques que mostren diferències significatives entre totes les barreges per a un mateix sòl, apunten característiques diferencials de la fracció proteica entre les barreges.

4.4.1.2 Efectes en els continguts de Carboni orgànic, N aminoacídic, Carbohidrats totals i extractables

El comportament del contingut en **carboni orgànic** de les barreges es pot deduir a partir de les Taules 4.14 i 4.15 i la Figura 4.3.

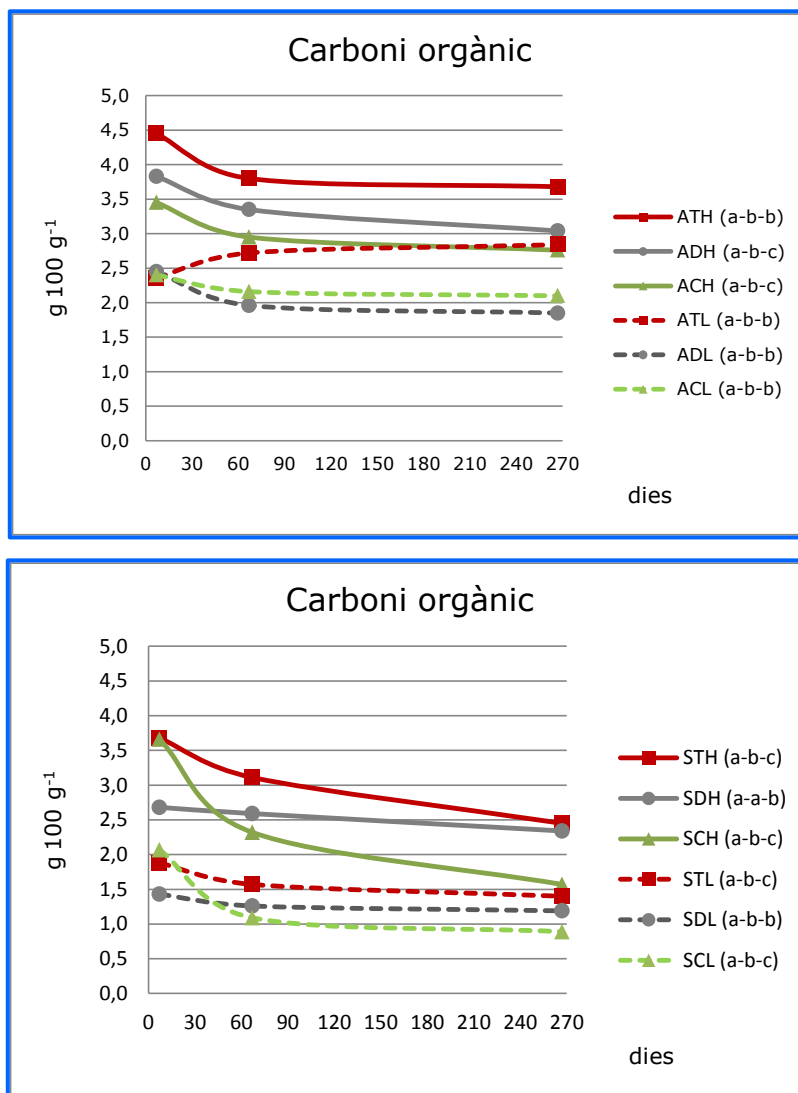


Figura 4.3 Valors de carboni orgànic en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.

Les barreges sòl argilós-fang als 7 dies tenen un contingut de C de 3,9 % (H) i 2,4 % (L) i les de sòl sauló-fang de 3,3 % (H) i 1,8 % (L) com a mitjana. Aquests valors són pròxims als fixats en el disseny experimental (3,5 % i 1,8 %) pel sòl S i lleugerament superiors per les barreges de sòl A ja que aquest sòl control té un contingut superior en matèria orgànica.

Els resultats del contingut en carboni de cadascuna de les barreges trobats experimentalment es corresponen amb els valors teòrics esperats considerant additivitat pels valors de carboni (fang+sòl control) i la composició de les barreges en pes. Així, la relació valor experimental de C de les barreges/valor teòric de C de les barreges (sent el valor teòric el calculat) pren valors entre 0,9-1,1 per les barreges amb sòl A i entre 0,7-1,0 per les barreges sòl S i els valors més diferents de 1 en ambdós sòls, són per les que contenen fang deshidratat. Aquestes discrepàncies són

atribuïbles a la heterogeneïtat inicial de les barreges (especialment pel fang deshidratat) i als problemes de mostreig inicials dels lisímetres.

L'afegit de fang augmenta el contingut en MO de forma que a l'inici l'efecte intensificador varia entre 2-4 vegades el carboni del control A i entre 10-20 vegades el carboni del control S. Als 267 dies en totes les barreges el contingut final de carboni és significativament inferior a l'inicial i es manté el mateix efecte intensificador en el sòl A, però a les barreges amb el sòl S disminueix i presenten valors que ara oscil·len entre 6-17, depenent del fang i la dosi.

L'efecte fang general en els dos sòls i a diferents temps (excepte els valors inicials) és pot expressar com $T \geq D \geq C$. En totes les barreges i en els diferents temps, el contingut en carboni orgànic de la dosi alta és significativament superior al de la dosi baixa.

La disminució de la MO global (mitjana dels tractaments) ha estat més alta en el sòl S (on ha disminuït un 34 %) que en el sòl A (on el descens global ha estat del 16 %) i s'ha vist molt afectada pel tipus de fang. Les barreges amb fang C han presentat una davallada més alta que les de fang T, en els dos sòls on s'han aplicat; el descens ha estat (mitjana de dues dosis), respectivament per les barreges amb C i T, de 16 % i 8% en el sòl A i 57 % i 30 % en el sòl S. En el cas del fang D, el descens de MO ha estat el més alt en el sòl A (23 %) i el més baix per el sòl S (15 %).

La disminució dels valors de carboni es concentra en els primers 67 dies (Figura 4.3). En aquest període és on trobem més diferències en el comportament dels fangs i de cadascun entre els dos sòls. Al llarg del segon període en general no hi ha diferències en el sòl A i en canvi en el sòl S la mineralització continua entre 67 i 267 dies.

El percentatge de pèrdua de MO ha estat superior per a la dosi alta que la baixa, excepte per les barreges A-D i S-D on per la dosi L és més alt que per la dosi H. El ritme de mineralització en les barreges S-D també ha estat diferent ja que SDH és l'única barreja on no hi ha davallada en els valors de carboni orgànic entre 7 i 67 dies i SDL l'única on no hi ha diferència entre els valors entre 67 i 267 dies.

El procés de mineralització de la MO ha estat intens en el primer període de la incubació coincidint amb la màxima activitat de la biomassa (Tarrasón, 2004). Aquest procés, però, ha estat diferent en els dos sòls; ha estat més favorable en les barreges de textura grossa del sòl sauló i en canvi s'ha vist alentit o paralitzat en les barreges de textura fina del sòl argilós. Per una banda, aquest resultat és semblant al descrit per diferents experiències on s'assaja la influència del tipus de sòl: la de Madejón et al. (2001b) per barreges de compost amb temps d'incubació de 280 dies, la de Sciubba et al. (2013) per barreges de fang compostat durant 98 dies i la de Pedra et al. (2007) que estudien el comportament de mostres incubades amb compost de RSU i fang de digestió anaeròbica durant 28 dies. Per altra banda, està d'acord amb el paper de l'argila en la formació de complexos organo-minerals resistents a la degradació microbiana i la major activitat de la biomassa en un sòl arenós (Franzluebbers et al., 1996).

Els valors obtinguts són difícils de comparar amb la bibliografia ja que d'acord als resultats d'altres experiències similars, el descens en carboni orgànic és molt variable. Hattori i Mukai (1986) troben que el percentatge de mineralització del C, oscil·la entre 20-44 % depenent del tipus de fang. Serra-Wittling et al. (1995) detecten, independent de la maduresa dels dos materials (compost de RSU i vermicompost), mineralització del 20 % i per Bernal et al. (1998) en les barreges de residus que contenen fang fresc del 60-70 % i barreges amb fang compostat del 10-40 %. Bastida

et al. (2012), en incubacions a microescala amb dosi baixes, no troben diferències entre la mineralització (valors que oscil·len al voltant del 30 % als 365 dies) en el sòl control i en els diferents residus fangs i RSU ni en l'estat de maduresa. Finalment per Moreno et al. (1999) no hi ha variació en el contingut de carboni orgànic de les barreges en 120 dies.

El descens del carboni per les barreges dels fangs T i C segueixen les pautes esperables d'afectació pel sòl i la dosi ($S > A$ i $H > L$) i es diferencien entre sí només per la intensitat d'aquest procés. La minva més gran i més continuada en el temps de la MO en les barreges de fang C està d'acord amb els valors de qCO_2 (indicador de la fracció metabòlicament activa dels microorganismes del sòl) observats en les mateixes barreges per Tarrasón (2004). Les barreges amb fang C, tot i no presentar els valors més alts de qCO_2 , sí que són les que el mantenen més constant durant el temps d'incubació, mentre que minva en els altres casos. Val a dir que aquest autor assenyala que les barreges dels tres tipus de fang presenten inhibició de l'activitat microbiana, respecte del control, que afectaria al metabolisme heterotròfic i no a la multiplicació cel·lular i que a més s'agreuja amb el temps en el cas de T i D.

Aquest contrast de comportaments del fang compostat i tèrmic era poc esperat i no s'ajusta al d'altres experiències on la menor davallada en MO correspon al residu que aporta MO més estabilitzada (Bernal et al., 1998; Pascual et al., 1998; Madejón et al., 2001a; Saviozzi et al., 2002; Sciubba et al., 2013). Fernández et al. (2007a), amb un disseny experimental similar al nostre, estudien el despreniment de CO_2 en incubacions d'un fang compostat i d'un fang assecat tèrmicament i detecten per aquest últim uns valors clarament més elevats al cap de 60 dies.

A l'hora d'interpretar els resultats, però, hem de recordar que el percentatge de disminució del carboni orgànic correspon a la variació de carboni orgànic de les barreges entre els 7 i 267 dies i no entre els dies 1 i 267. Si tenim en compte que el període de màxima activitat microbiana es dona habitualment els primers dies de la incubació (Fernández et al., 2007a; Pedra et al., 2007) amb la variació de carboni orgànic des de l'inici de l'experiència possiblement els resultats foren més coherents.

Com a possibles causes que justifiquin els comportament dels fangs T i C podem considerar alternativament:

- a. En les barreges del fang T i el sòl A es podria haver donat com a conseqüència d'una intensa activitat microbiana inicial condicions de manca d'oxigen que afectessin la continuïtat del procés de mineralització amb el temps (Lowe, 1978; Senesi, 1989; Fernández et al., 2007a).
- b. La important davallada del contingut en carboni orgànic de les barreges incubades amb el fang C podria ser indicativa d'un defectuós/insuficient procés d'estabilització del material a través del compostatge, procés en el qual es redueix el contingut de la fracció de més alta degradabilitat. D'acord a Huerta et al. (2010) el fang compostat emprat no aportaria MO prou estabilitzada donat que el grau d'estabilitat és inferior al 50 %, paràmetre que ha d'augmentat molt al final del període de maduració (entre els 4 i 6 mesos). En aquest sentit és interessant l'estudi de Bernal et al. (1998) sobre la mineralització de la MO en barreges de diferents residus que corresponen a 4 fases del procés de compostatge (inicial, termofílica, inici de maduració i final de maduració). D'acord als resultats, les barreges que contenen fang són per les que el percentatge de mineralització queda més afectat pel procés de maduració del compostatge; concretament en la barreja que té una proporció

més alta de fang incubada a l'inici de la maduració mineralitza el 40 % del carboni i la incubada al final de la maduració un 20 %.

El comportament de les barreges amb fang D és clarament diferent ja que segueix pautes inverses als altres dos fangs: A>S i L>H. Aquestes diferències estan d'acord amb els elevats valors de biomassa mantinguts durant més temps en les barreges A-D i amb el ràpid descens de respiració en les barreges S-D detectades per Tarrasón (2004). Aquest comportament podria ser atribuïble a les propietats físiques en aquest tipus de barreges (i a les dificultats d'homogeneïtzació d'aquestes barreges) i posaria de manifest una major dependència de la mineralització de la MO de la biomassa pròpia del sòl on s'addicioni aquest fang.

El contingut en **N aminoacídic** resulta ser la variable final (junt amb l'activitat UR) amb més efecte intensificador (Taula 4.20). L'afegit de fang ha incrementat al final de la incubació el contingut en N aminoacídic entre 7-15 vegades el del control en el cas del sòl A i entre 12-33 en el cas del sòl S depenent del fang i la dosi. L'efecte fang final general per a cada dosi i pels dos sòls és pot expressar d'aquesta forma T>D>C. L'efecte dosi (H/L amb valors pròxims a 2) és especialment important pels tractaments ADH i ADL (Taules 4.18 i 4.19).

Aquests resultats de N aminoacídic en les barreges finals els podem relacionar amb el contingut N aminoacídic inicial de les barreges calculats a partir del contingut de N aminoacídic dels fangs i de la composició en pes de les barreges dels límits (apartat materials). En la figura 4.4 contrastem ambdós valors per a cada barreja on hem calculat el contingut inicial despreciant l'aportat pel sòl control.

Podem veure que si bé el contingut inicial i final de N_{AA} en les barreges guarden la mateixa gradació que la dels fangs, els percentatges de N_{AA} que resta encara als 267 dies respecte del N_{AA} inicialment aportat pels fangs (0 dies) són superiors per les barreges en el sòl A i molt diferents segons els tractaments: 85 % (ATH i ATL), 65 % (ACH i ACL), 50 % (STL, STH, SDL i SDH) i 30 % (SCL i SCH) i la dosi en el cas de ADH (100 %) i ADL (60 %).

La disminució del contingut en N aminoacídic, en les barreges amb fang T i C, en els dos sòls està en consonància amb el percentatge de mineralització del carboni orgànic per aquestes barreges, encara que són lleugerament superiors donat que el N aminoacídic és la fracció làbil del total del N orgànic aportat pels fangs (Lerch et al., 1992). Anàlogament al que hem vist per la mineralització del carboni orgànic s'assoleixen els valors més alts (on el N_{AA} disminueix un 70 %) en les barreges amb fang S-C la qual cosa indica que han estat les barreges amb més transformació de la MO. Els valors similars per a les dosis baixa i alta de fang aplicat podrien indicar que a l'augmentar la quantitat de fang, es frena la degradació proteica i una part del N proteic podria no seguir la via oxidativa de degradació.

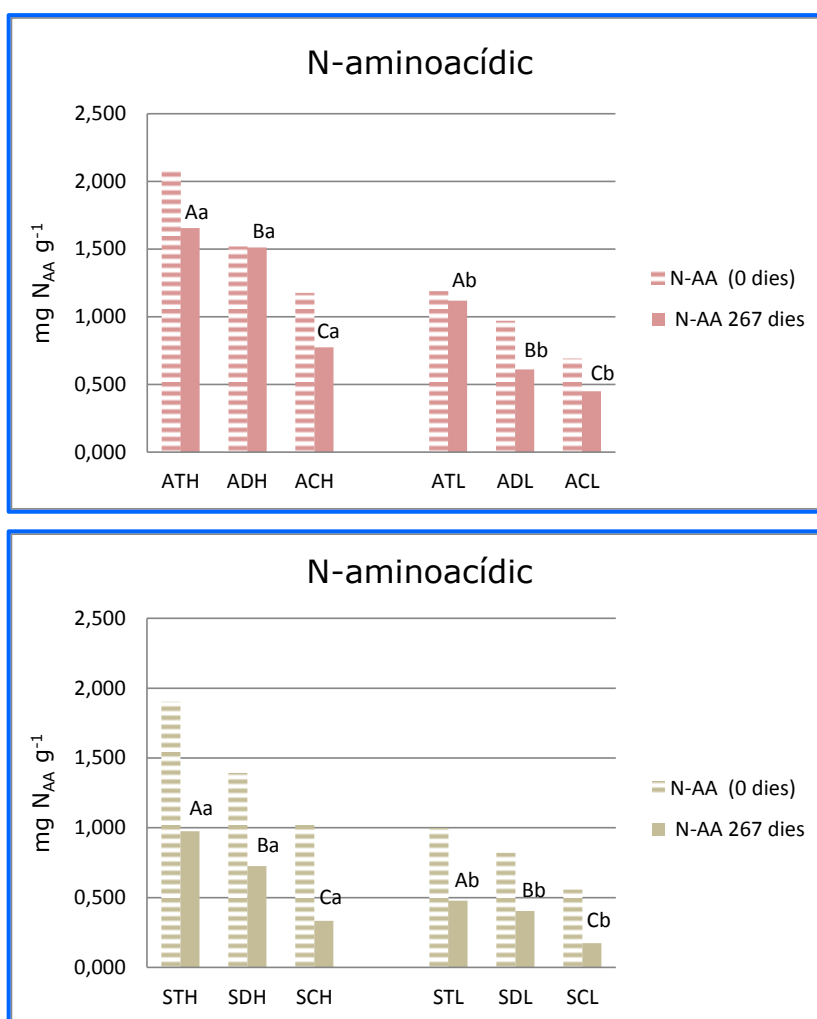


Figura 4.4 Canvis en els valors de N-aminocàrnic de les barreges de l'experiència en lisímetres. Valors inicials (0 dies) calculats i valors finals (267 dies) experimentals. Valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre fangs a una mateixa dosi. Valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre dosi per un mateix fang.

En les barreges amb fang D, com per a la mineralització del carboni, el comportament del contingut en N_{AA} és singular. Per una banda, la barreja ADH és l'única on es manté el contingut en N_{AA} al llarg dels 267 dies d'incubació (descens de 0,75 %) amb una mineralització de carboni del 20 %. Per altra banda, les barreges SDH i SDL presenten una alta disminució del N_{AA} (50 %) comparativament a una baixa mineralització del carboni orgànic (15-20 %). Aquestes anomalies semblen apuntar una dinàmica de la MO poc adequada en les barreges amb fang D que indicarien, en el sòl A i dosi alta, algun tipus d'inhibició i que, en el sòl S, aniria acompanyada per una important transformació de les proteïnes, en part anaeròbica (Alexander, 1980). Possiblement aquest fet podria tenir relació amb algun tipus d'estrès microbià induït per a la incorporació de contaminants dels fangs que s'apunta a Tarrasón (2004) i que estaria d'acord amb l'anàlisi de contaminants (Mejía, 2005). La via anaeròbica de transformació (putrefacció) del N hauria provocat la presència de productes finals (amoní, amines, àcids orgànics, mercaptans i H_2S) amb caràcter reductor que justificarien els valors anormalment alts de carboni oxidable respecte als valors de carboni orgànic total en aquestes barreges S-D (veure apartat 5.5.1.3 del capítol 5).

Mostrem el comportament dels **carbohidrats totals** a les Taules 4.14 i 4.15 i la Figura 4.5.

L'afegit del fang augmenta a l'inici entre 3-7 vegades el CHT del sòl control A. L'efecte intensificador és manté bastant constant amb el temps d'incubació i els valors de CHT en els barreges als 267 dies d'incubació són iguals o bé superiors que a l'inici.

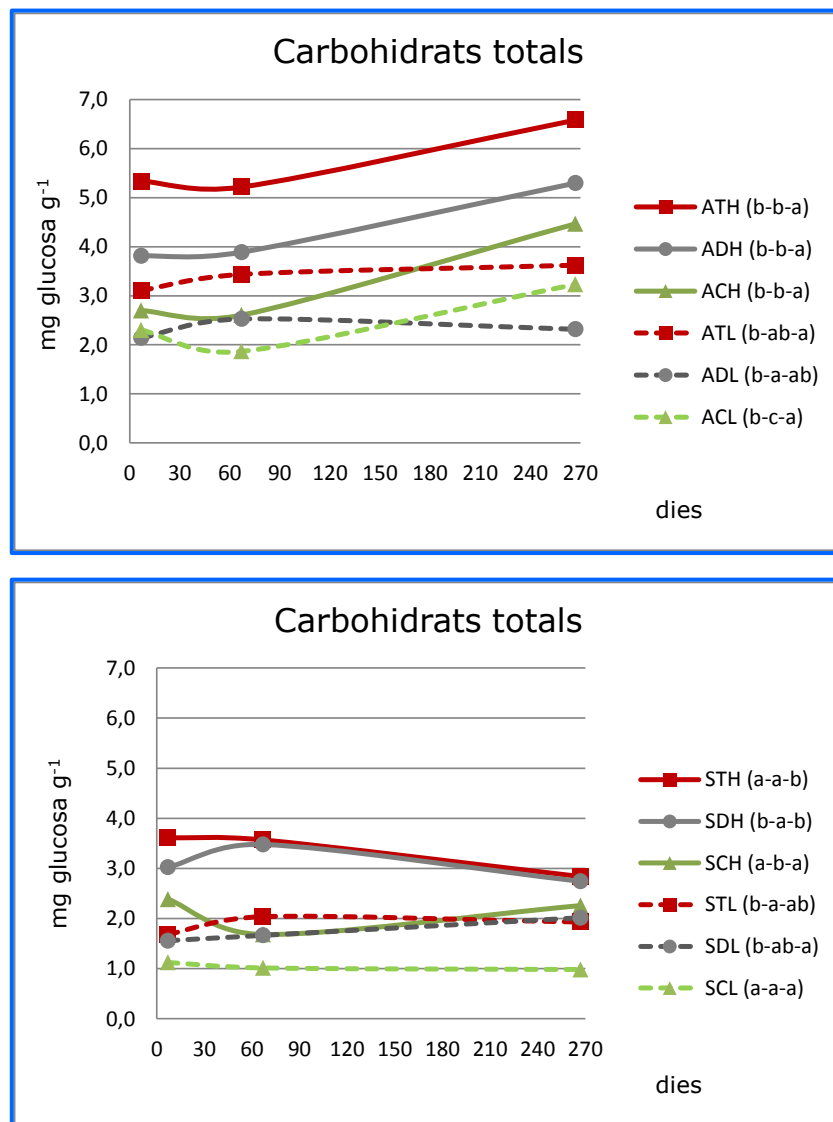


Figura 4.5 Valors de carbohidrats totals en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.

L'efecte fang general en els dos sòls i a diferents temps és pot expressar com $T \geq D \geq C$. En totes les barreges i en els diferents temps, el contingut en CHT de la dosi alta és significativament superior al de la dosi baixa.

La dinàmica de les barreges amb el temps en el sòl A és paral·lela al control, on hi ha un increment en el contingut de CHT en el segon període (més per H que per L i especialment per les barreges A-C) i en el sòl S la tendència és a mantenir-se constant.

Atenent al contingut relatiu en CHT, les barreges amb fang C presenten una MO amb menys proporció en CHT i el quocient CHT/C indica que la MO es va enriquint en CHT en els dos sòls (per 10 de les 12 mostres els valors finals de CHT/C són significativament superiors a les inicials, dades no exposades) i aquest comportament és més homogeni entre tractaments en el sòl A que en el sòl S.

El comportament dels **carbohidrats extractables** es pot observar a partir de les Taules 4.14 i 4.15 i la Figura 4.6.

L'afegit de fang augmenta a l'inici entre 3-12 vegades el CHE del control A; l'efecte intensificador, si bé es manté constant per les barreges D, baixa, aproximadament a la meitat, per les barreges amb fang T i fang C.

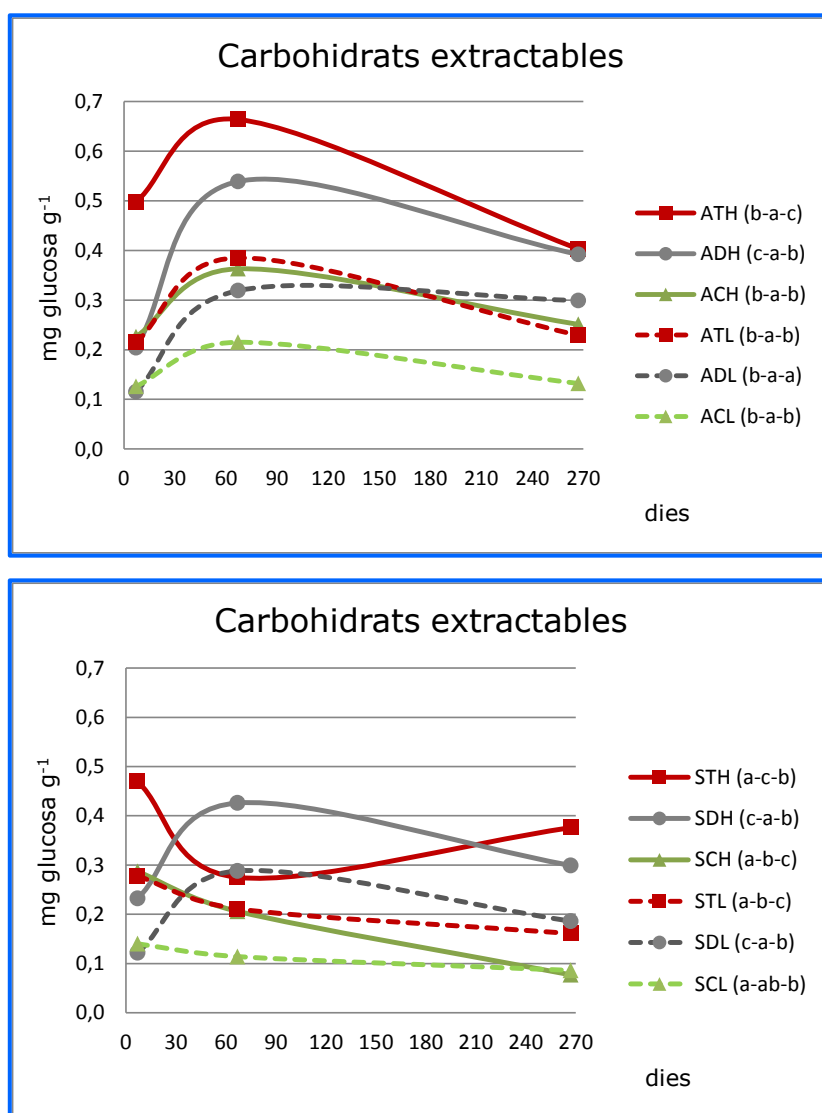


Figura 4.6 Valors de carbohidrats extractables en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.

L'efecte fang és en general $T \geq D \geq C$, encara que, en el sòl sauló als 67 dies és $D > T \geq C$. En totes les barreges i en els diferents temps, el contingut en CHE de la dosi alta és significativament superior al de la dosi baixa, a excepció de les barreges S-C als 267 dies (SCH=SCL).

Als 267 dies, els continguts en CHE de les barreges A-T, A-C, S-T i S-C són iguals o bé inferiors als inicials i en canvi en les barreges A-D i S-D incrementa el contingut en CHE al llarg del temps d'incubació i els valors finals són significativament més alts als inicials. En el sòl A, hi ha una dinàmica molt paral·lela entre tractaments: tots presenten un valor màxim als 67 dies i en el sòl S només DH i DL presenten un màxim als 67 dies.

A partir del valor del quocient CHE/C a l'inici podem deduir que la MO aportada amb més contingut en CHE correspon al fang T i que als 67 dies s'assoleix una proporció de CHE màxima especialment per les barreges de fang D.

Pel que fa a la **discussió dels resultats de carbohidrats totals i extractables**, les barreges amb el fang C són les que presenten uns valors més baixos de carbohidrats i per tant podem dir que és el fang que aporta una menor proporció de MO làbil. Aquests resultats són coherents amb els valors de carbohidrats en aquests fangs (d'acord amb Ojeda et al., 2008, veure apartat de materials) i amb els valors més alts del grau d'estabilitat del fang compostat i és conseqüència del compostatge (Senesi, 1989; Soliva, 2001).

A partir dels valors de CHT/C i CHE/C a l'inici en les barreges S-T i S-D (on hi ha menys influència de la composició de la MO del sòl control) podem deduir que la MO del fang T és la més rica en CHE i la del fang D en CHT. Aquesta característica està d'acord amb l'alta càrrega microbiana present en fang D que disminueix molt en el procés d'assecatge tèrmic i que provocaria en el fang T alta presència de biomassa microbiana morta i per tant de substrat disponible (IQS-CREAF-ESAB, 2002). Aquestes característiques dels fangs també estan d'acord amb el que sosté Tarrasón (2004):

- i. Troba per l'increment causat pel fangs en la respiració del sòl la gradació $T > D > C$ i ho relaciona amb l'aport de MO potencialment mineralitzable per part dels diferents fangs
- ii. Detecta una reducció important de la biomassa microbiana en les barreges amb fang C amb el temps i ho atribueix a la manca de compostos làbils en aquestes barreges

L'evolució amb el temps dels valors dels carbohidrats CHT i CHE no respon, especialment en el sòl A, al que a priori caldria esperar, una davallada paral·lela al procés de mineralització d'acord amb la seva alta degradabilitat. Bastida et al. (2012) detecten minva dels CH-solubles com a reflex dels canvis en la fracció més làbil. Pascual et al. (1999) atribueixen a l'origen microbià dels CH la seva difícil degradació per justificar la poca variació del contingut amb el temps. García-Orenes et al. (2005) detecten un augment dels valors CHT i CHT/C en barreges sòl-fang, però en aquest cas, semblaria estar condicionat per l'augment de MO conseqüència de les successives addicions de fang. En estudis sobre el contingut en carbohidrats i la seva incidència sobre agregats estables atribueixen les fluctuacions en el contingut de carbohidrats a les modificacions de la càrrega microbiana (Kinsbursky et al., 1989; Roldán, et al., 1994; Deboz et al., 2002).

Pel que fa als canvis en CHE durant la incubació, es pot pensar en una dinàmica mineralització-humificació similar a la descrita per l'experiència de Pascual et al. (1999). En totes les barreges hi ha un primer procés de despolimerització i hidròlisi de carbohidrats i acumulació dels carbohidrats extractables que coincideix amb el descens dels alts valors inicials de biomassa microbiana i que es fa palès amb els valors màxims entremigs dels 67 dies. Interpretem que en el cas de les barreges amb fang D, en ambdós sòls, aquest procés seria molt accentuat i comportaria un contingut en CHE final superior a l'inicial; i que no s'observa, però, en el cas de les barreges S-C i S-T a causa del seu consum ja que la mineralització ha estat especialment important.

Paral·lelament a la despolimerització, podem suposar que també es dona en la MO de les barreges un procés de síntesi microbiana i/o d'alliberació del polisacàrids, que formen part d'altres biomolècules, que explicaria la seva acumulació. Aquest procés podria ser causat pel consum de CHE i per tant seria més intens en aquelles barreges especialment per ACL i SCL ja que el contingut en CHE és menor. També el paper protector de l'argila seria important en l'augment de CHT detectat en les barreges amb sòl argilós. En aquest sentit Kinsbursky et al. (1989) consideren que una porció dels polisacàrids queden protegits de la degradació microbiana en formar complexos amb els cations metàl·lics o per quedar ocluits en els microporus inaccessibles als microorganismes.

Cal afegir aquí que, tot i que en la metodologia analítica de CHT s'inclou una hidròlisi inicial que allibera els polisacàrids adsorbits (Lax i García-Orenes, 1993), podria haver-se donat, amb el temps, una progressiva accessibilitat dels carbohidrats més resistents i protegits per lignines, o potser lipopolisacàrids de membrana externa dels bacteris, que justificaria també el seu augment.

4.4.1.3 Efectes en les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa

a. Activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa en els fangs i additivitat fang + sòl per l'activitat β -glucosidasa

En la Taula 4.21 presentem els resultats per les activitats enzimàtiques mesurades en els fangs. A partir dels valors d'activitat enzimàtica β -glucosidasa en els fangs i en els sòls controls i de la composició en pes de les barreges dels lisímetres podem fer un càlcul per estimar l'additivitat de les activitats enzimàtiques del fang i del sòl a l'inici de l'experiència. En la Figura 4.7 contrastem el valor teòric d'activitat GLC (que l'anomenem activitat enzimàtica β -glucosidasa prevista de la barreja a l'inici de la incubació) amb el valors d'activitat experimental mesurada en les barreges als 7 dies (Taula 4.16 i 4.17).

Taula 4.21. Resultats les activitats β -glucosidasa (GLC) i β -galactosidasa (GAL), absoluta i específica, en els tres fangs (D fang deshidratat, T fang deshidratat i assecat tèrmicament i C fang deshidratat i compostat (mitjana \pm d.e).

	Unitats	Fang T	Fang D	Fang C
GLC	$\mu\text{mol pNFg}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,13 \pm 0,02	3,53 \pm 0,15	5,00 \pm 0,12
GAL		<0,02	2,34 \pm 0,19	1,22 \pm 0,20
GLC/C	$\mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{ C h}^{-1}$	0,25 \pm 0,05	7,03 \pm 0,30	11,42 \pm 0,49
GAL/C		-	4,66 \pm 0,38	2,79 \pm 0,45

Les dues **activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa en els fangs** segueixen la gradació: per l'activitat β -glucosidasa (absoluta i específica) C>D>>T i per l'activitat β -galactosidasa (absoluta i específica) D>C>>T.

Els valors de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa en els fangs compostat i deshidratat són superiors a les que assenyala la bibliografia per mostres de fang (Martens et al., 1992; Moreno et al., 2007; Vargas-García et al., 2010) i es situen, respectivament, 1,3 i 2,3 vegades per sobre dels valors màxims descrits pels nostres sòls naturals (capítol 3). Anàlogament als resultats de Serra-Wittling et al. (1995) i a Madejón et al. (2001a), però, les activitats en els residus referides al contingut de carboni, resulten ser molt inferiors a les descrites per les mostres de sòls.

L'activitat GLC, que és superior en el fang compostat respecte del fang deshidratat, no s'adiu amb la pauta general per les activitats enzimàtiques que són, en general, més altes en el residu menys madur (Serra-Wittling et al., 1995); tanmateix, hem de tenir present que el fang emprat no havia completat el procés de maduració tal com hem apuntat anteriorment. Pensem també, que hem de tenir en compte la possible contribució de l'estella de pi afegida al fang com agent *bulking* a l'hora de compostar-lo. Vargas-García et al. (2010) detecten en la fase de maduració de compostatge de fangs, un increment de l'activitat β -glucosidasa que atribueixen a la presència de compostos de carboni derivats de les activitats cel·lulòsica i hemicel·lulòsica de la fase termofílica. Per altra banda, Moreno et al. (2007) troben que l'efecte del compostatge en fangs és molt positiu ja que augmenta la proporció d'activitat β -glucosidasa immobilitzada en el residu.

En el cas del fang tèrmic, els valors de l'activitat β -glucosidasa són molt baixos i estan per sota dels mínims mesurats en el nostre estudi de sòls naturals i no es detecta activitat β -galactosidasa. Aquests resultats són coherents amb el posttractaments d'assecatge tèrmic on és previsible la pèrdua d'activitat enzimàtica del fang deshidratat ja que β -glucosidasa presenta una temperatura d'inactivació de 70°C (Eivazi i Tabatabai, 1988). Per altra banda, la més alta proporció GAL/GLC del fang deshidratat també es dona en l'estudi de Martens et al. (1992) respecte d'altres residus i és coherent amb la més alta càrrega microbiana present en el fang (Curci et al., 1997; Martínez i Tabatabai, 1997); el fet de no detectar-se activitat GAL en el fang tèrmic podria ser indicador d'inhibició de l'activitat microbiana (Carbonell et al., 2000; Martínez-Iñigo et al., 2009).

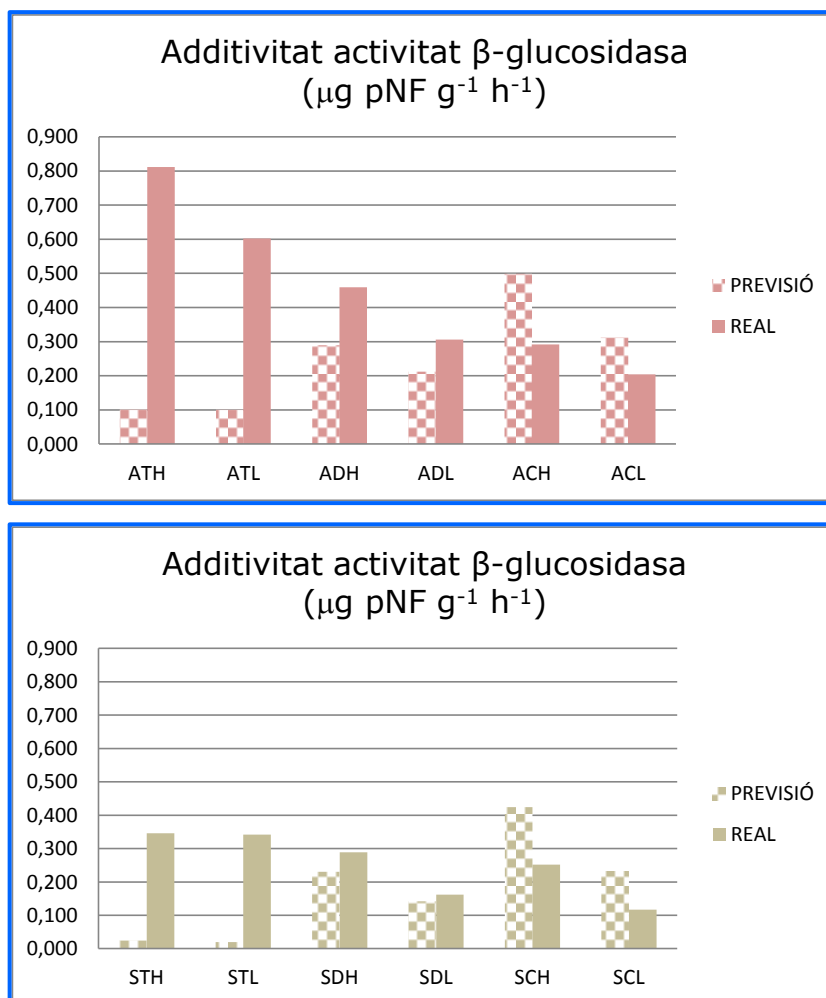


Figura 4.7 Additivitat sòl+fang per l'activitat β -glucosidasa : contrast entre el valor de l'activitat en les barreges (real, 7 dies) i el valor calculat considerant l'additivitat entre les activitats del sòl i del fang (previsió).

D'acord a la Figura 4.7, podem veure que, en els dos sòls, les barreges amb els fangs D i C presenten valors d'activitat GLC de l'ordre als valors previstos d'acord al càlcul d'additivitat. En el cas del fang D els valors reals són 1,3 vegades superiors als calculats i molt semblants en els dos sòls. L'activitat GLC en les barreges de fang C en els dos sòls són la meitat de valor previst d'acord al càlcul d'additivitat. En contrast amb aquests resultats, per les barreges amb el fang T la relació GLC real/GLC prevista és entre 7 i 15 vegades superior, respectivament pel sòl A i S i igual per les dues dosis.

Els valors especialment alts per les barreges amb el fang tèrmic serien en part més conseqüència de l'efecte activador, que la matèria orgànica del fang tindria sobre la biomassa del sòl, que no pas de l'aport de MO rica en aquesta activitat per part del fang T. Pels resultats d'additivitat de les activitats del sòl+fang veiem que si bé el fang T presenta activitat GLC molt baixa, té un gran efecte estimulador de l'activitat de la barreja fang-sòl atribuïble a l'aport de substrats làbils. Amb el temps l'efecte es perd, però no desapareix del tot ja que els valors d'activitat en les barreges amb fang T als 267 dies segueixen sent superiors als previstos inicialment per l'additivitat. Com que la relació real/esperada és independent de la dosi, la biomassa del sòl és limitant de l'efecte activador. Saviozzi et al. (2002) descriuen un efecte semblant per l'activitat casseinolítica en barreges sòl-fangs i ho justifiquen per l'important aport de substrats

nitrogenats disponibles. L'efecte estimulador superior per les barreges amb sauló també està d'acord amb els resultats d'aquests autors que detecten valors superiors en les mostres de residus (incubats amb sorra) que en les barreges residu-sòl.

En el cas del fang D el residu aporta activitat GLC i en aquest cas, l'efecte estimulador és molt petit de manera que es suma a la del sòl i podem considerar que es compleix l'additivitat. El fang C aporta molta activitat GLC, però es perd quan es barreja amb el sòl. En aquest cas no hi ha sinergia entre la MO enzimàticament activa del fang i el sòl, i no hi ha efecte estimulador previsiblement per manca de substrat. Serra-Wittling et al. (1995) justifiquen la manca d'additivitat i la pèrdua d'activitat per l'activitat β -glucosidasa tenint en compte l'existència d'enzims extracel·lulars. Consideren que els enzims extracel·lulars del compost persisteixen a l'estar protegits, però tenen menys activitat i s'inactiven al ser afegits al sòl. També ho atribueixen a què la barreja induïx canvis de pH, salinitat i d'altres paràmetres que afecten la microflora del compost.

b. Canvis en les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa

Mostrem el comportament de l'activitat enzimàtica β -glucosidasa a les Taules 4.16 i 4.17 i les Figures 4.8 i 4.9.

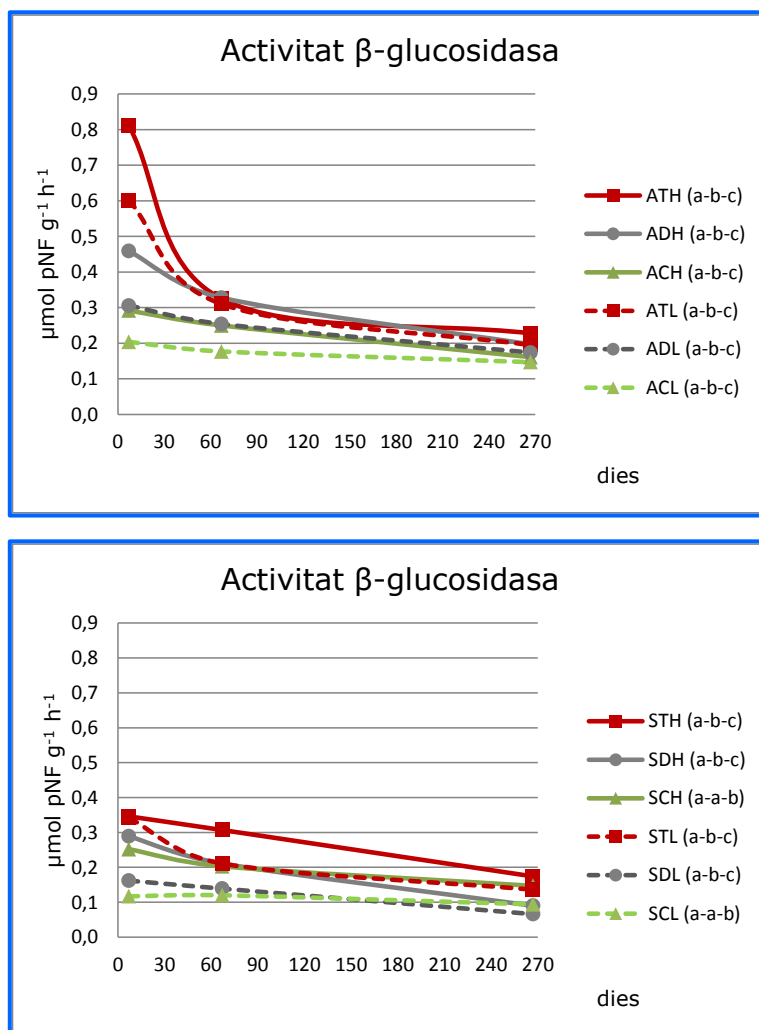


Figura 4.8 Valors de l'activitat β -glucosidasa en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.

L'afegit de fang incrementa l'activitat del sòl entre 2-9 respecte del control A depenent del fang i la dosi. Als 267 dies en totes les barreges l'activitat GLC és significativament inferior a la inicial. Amb el temps en les barreges amb el sòl A l'efecte intensificador disminueix i les barreges passen a presentar valors que ara oscil·len només entre 1,3-2,0 vegades el valor del control. L'efecte fang general és: $T \geq D \geq C$ i l'efecte dosi $H \geq L$.

L'evolució de l'activitat GLC indica una davallada acusada entre 7-67 dies, es especialment important (entre 60-70 %) en les barreges amb ATH, ATL i ADH i les barreges amb el fang C destaquen per tenir la menor pèrdua d'activitat.

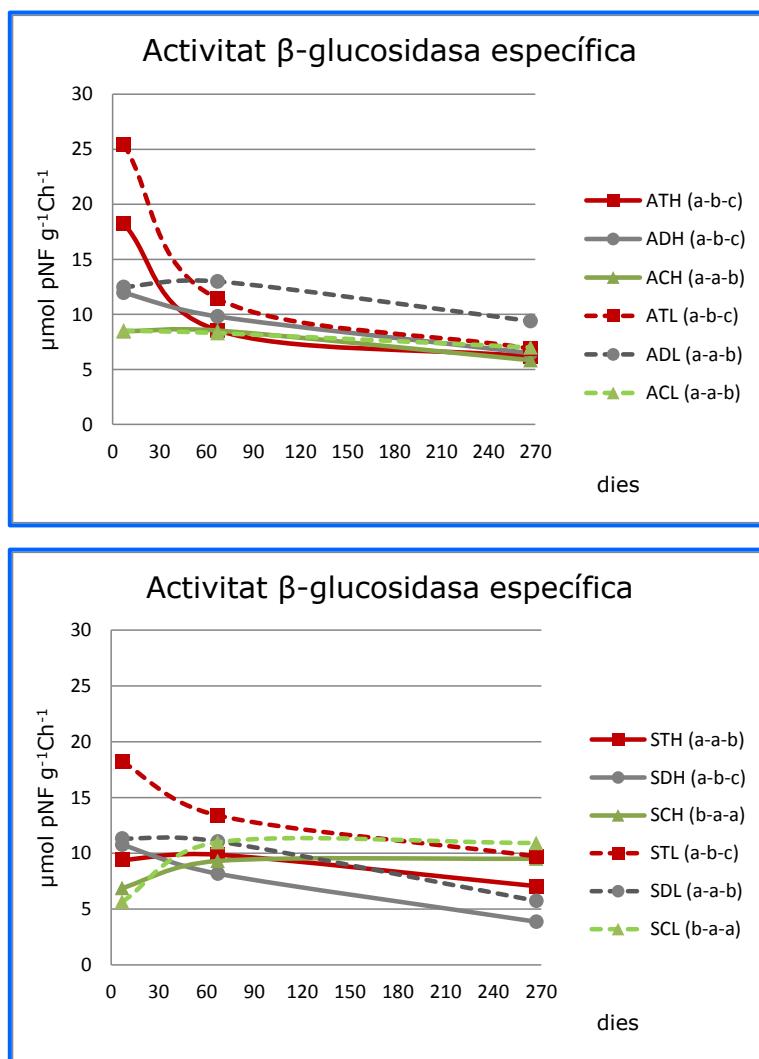


Figura 4.9 Valors de l'activitat β -glucosidasa específica en les barreges sòl-fang als 7,67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.

Els valors de **l'activitat β -glucosidasa específica** (GLC/C) de les barreges són semblants als valors del sòl control A i en general no hi ha efecte dosi. A l'igual que per l'activitat GLC, l'efecte fang inicial per GLC/C també és $T \geq D \geq C$ i els valors de les mostres finals són significativament inferiors a les inicials excepte per les barreges S-C que són significativament superiors; d'aquesta forma als 267 dies l'activitat específica GLC/C més alta es dona en les barreges S-C. Com a conseqüència, trobem que en les barreges finals del sòl sauló hi ha un clar efecte fang, i diferent a l'inicial, per l'activitat

GLC relativa al carboni orgànic i al N-aminoacídic: per GLC/C es pot expressar com $C \geq T \geq D$ i per GLC/N_{AA} com $C > T > D$.

Com a **discussió dels resultats de l'activitat β -glucosidasa** podem dir que amb l'increment de MO aportada augmenta l'activitat GLC del sòl control; tanmateix, les diferències en els valors de l'activitat enzimàtica GLC a l'inici en funció del tipus de fang (on $T > D > C$) són un reflex de la labilitat de la MO aportada pels fangs, ja que es manté la gradació quan considerem l'activitat específica GLC/C, i està d'acord amb els resultat de l'assaig d'additivitat.

En el mateix sentit, les experiències de Eivazi i Zacaria (1993), Madejón et al. (2001a), Debosz et al. (2002), Kizilkaya et al. (2005) i Sciubba et al. (2013) s'atribueixen els valors més alts de l'activitat GLC a la inestabilitat de la MO del residu i a l'augment de la dosi. A l'experiència de Serra-Wittling et al. (1995) es posa de manifesta que l'afegit de compost madur no té efecte en els enzims relacionats amb el cicle del carboni.

Amb el temps d'incubació, el descens de l'activitat GLC és un reflex de la variació en la fracció de carboni més biodegradable, es a dir de la pèrdua de substrat que utilitzen els microorganismes com a font d'energia i està d'acord amb els resultats de Moreno et al. (1999), Debosz et al. (2002) i Bastida et al. (2012). El resultat és coherent amb què la disminució sigui menor en les barreges del sòl A on el procés de mineralització presumiblement ha quedat estancat. La menor pèrdua l'activitat GLC en les barreges amb fang C (així, el tractament SCL -on no hi ha quasi efecte de la biomassa pròpia del sòl- manté un 80 % de l'activitat inicial) podria estar relacionada amb la major persistència dels enzims immobilitzats.

Els valors finals de l'activitat β -glucosidasa en les barreges són un reflex del diferent grau de transformació de la MO en els dos sòls. Així, en el sòl A, l'activitat GLC manté la mateixa diferenciació inicial entre fangs i, contràriament, les barreges amb el sòl S presenten un *ranking* diferent a l'inicial i els valors superiors són per les barreges C i T, barreges en les que podem esperar que al final la MO sigui més estable donat que el percentatge de mineralització ha estat més alt.

El fang compostat, tal com hem apuntat anteriorment, podria proporcionar al sòl activitat enzimàtica més estabilitzada i per tant seria més persistent. Diferents autors han deduït que l'enzim β -glucosidasa es pot trobar l'enzim associat a complexos E-carbohidrat i E-humus (Miller i Dick, 1995; Busto et al., 1997; Busto i Pérez-Mateos, 2000; Knight i Dick, 2004). Pascual et al. (2002), per les activitats ureàsica i fosfatàsica, també troben valors inferiors en les barreges del residu més madur junt amb una major persistència amb el temps i els autors atribueixen la resistència a la degradació dels enzims en aquestes barreges al paper del complex humus-enzim.

El comportament del fang tèrmic podria explicar-se a partir de les consideracions de Bastida et al. (2012) on destaquen, per l'activitat β -glucosidasa, la capacitat dels enzims sintetitzats de nou de quedar estabilitzats. Sostenen que la MO làbil aportada estimula síntesi d'enzims hidrolítics i el seu alliberament al sòl i que després aquestes proteïnes poden quedar atrapades en l'humus i donar lloc a valors més alts d'activitat immobilitzada que en les mostres de compost amb menor MO làbil.

El quocient de l'activitat GLC respecte del N aminoacídic (GLC/N_{AA}) de les barreges als 267 dies, tot i ser inferior al valor del sòl control A, indiquen que les barreges A-C i S-C presenten valors significativament superiors a les dels fangs T i D. Sembla que podem dir doncs, que la MO de les barreges on s'ha aplicat fang compostat contenen

una concentració més alta de proteïna enzimàticament activa pel que fa a l'activitat β -glucosidasa.

Per l'**activitat β -galactosidasa** (Taula 4.18 i 4.19) no es pot avaluar l'efecte intensificador donat els baixos valors en els sòls control A i S i només s'ha pogut determinar en barreges sòl-fang i a dosi alta. En el cas de les barreges de sòl A no es detecten diferències entre fangs i en canvi en les barreges amb sòl S destaca el fang compostat (barreja SCH) amb un activitat GAL significativament superior a les altres dues. Aquesta diferència també es detecta per les relacions GAL/C i GAL/N_{AA}.

c. Caracterització de l'activitat β -glucosidasa en les mostres finals: termoestabilitat i valor de K_M

Atenent als objectius, en aquest apartat presentem els resultats de l'estudi de les característiques de l'activitat β -glucosidasa en les barreges sòl-fang a través dels valors de termoestabilitat i K_M per a les barreges finals.

Taula 4.22. Valors de termoestabilitat i de K_M de l'activitat β -glucosidasa en les mostres finals de l'experiència en lisímetres.

Sòl A	Termoestabilitat		K_M		Sòl S	Termoestabilitat		K_M	
	%(°)		mM			%		mM	
COA	95		1,9		COS	-		-	
Dosi	L	H	L	H	Dosi	L	H	L	H
Barreja A-T	99	93	13,0	2,4	Barreja S-T	60*	81	11,6	7,2
Barreja A-D	71*	78*	2,8	4,0	Barreja S-D	81	64*	8,7	16,0
Barreja A-C	76*	76*	3,5	3,2	Barreja S-C	25*	84	5,8	1,6

(°) Percentatge d'activitat de la mostra escalfada respecte de la mostra no escalfada. Els valors amb * indica que l'activitat de la mostra escalfada és significativament diferent de l'activitat en la mostra no escalfada.

D'acord amb els resultats de l'assaig de termoestabilitat (Taula 4.22) valors de termoestabilitat inferiors al 80 %, comporten diferències significatives entre l'activitat de la mostra no escalfada i de la mostra sotmesa 2h a 85°C. Globalment, les barreges de fang T amb sòl A i el sòl control COA es poden considerar les que presenten l'activitat enzimàtica més termoestable. En el cas de les barreges amb sòl S les barreges que presenten valors de termoestabilitat superiors al 80 % són: STH, SDL i SCH. Cal recordar aquí que els valors obtinguts per les barreges amb el sòl sauló són poc fiables donat que les activitats són molt baixes i es situen al voltant del límit de quantificació de la tècnica (veure Taula 4.11).

D'acord amb els resultats dels valors de K_M (Taula 4.22) podem dir que aquests són globalment inferiors en les barreges de sòl A respecte de les del sòl S i ens indiquen que l'afinitat de l'enzim pel substrat és més alta en les barreges del sòl argilós que en les del sòl sauló. Destaca l'alt valor de k_M de la barreja ATL, respecte de les altres barreges amb sòl argilós, i els valors més baixos de les barreges amb fang compostat respecte de les altres barreges amb sòl sauló.

Els valors de termoestabilitat de l'activitat β -glucosidasa apareixen bàsicament condicionats pel paper de l'argila que és una de els components d'estabilització dels enzims extracel·lulars. (Busto i Pérez-Mateos, 2000; Turner et al., 2002). Els autors Miller i Dick (1995) troben valors de termoresistència de l'activitat β -glucosidasa similars (65-85 %) i també presenta més termoresistència el tractament que ha presentat una activitat més alta durant tot el període controlat. Per altra banda també podem tenir en compte els resultats de Bastida et al. (2012) ja que aquests autors troben que el component d'activitat β -glucosidasa dels enzims immobilitzats és superior en les barreges que han rebut un residu amb més MO làbil (fang fresc) i on l'estimulació de la síntesi d'enzims ha estat més alta que en el cas del residu més madur (fang compostat).

Els valors de K_M per la β -glucosidasa en els sòls controls i els més baixos trobats en les barreges finals, són similars a les descrites per Eivazi i Tabatabai (1988) on varien entre 1,3 i 2,4 mM depenent del sòl. A través dels resultats de K_M en el sòl control argilós i en les barreges sòl argilós-fang, veiem que l'afegit de fang ha disminuït l'afinitat de l'enzim pel substrat. Hojjati i Nourbakhsh (2007) troben resultats semblants per l'activitat L-glutaminasa en l'aplicació de fang i fems. Tanmateix veiem que l'afinitat de l'enzim pel substrat depèn més del sòl que del fang ja que és més alta en les barreges de sòl argilós que en les de sauló. Sembla que l'activitat β -glucosidasa es veu afavorida per l'argila i els components de la MO més estable del fang compostat o perquè correspon a una activitat ja present en aquest fang. L'alt valor de K_M per ATL, STL i SDH indica que en aquestes barreges l'enzim β -glucosidasa presentaria un mecanisme d'estabilització diferent de la resta.

4.4.1.4 Efectes en les activitats enzimàtiques proteolítica de BAA i ureàsica

El comportament de les activitats enzimàtiques proteolítica de BAA i ureàsica el podem deduir a partir de les Taules 4.16 i 4.17 i les Figures 4.10 i 4.11.

L'afegit de fang incrementa l'**activitat proteolítica de BAA** del sòl control A entre 2-12 vegades depenent del fang i la dosi. Als 267 dies, l'activitat BAA s'igualava o bé és 2 vegades l'activitat del control A. Els efectes fang i dosi són aquí molt poc importants ja que només es donen inicialment i en el sòl A (on només per A-T i ACH a l'inici són més altes).

Amb el temps d'incubació, l'activitat BAA de les barreges minva o bé es manté. Per els tractaments ADH i ACH acaba desapareixent l'efecte intensificador.

Pel que fa a l'activitat específica BAA/C (amb valors semblant entre barreges i control A) els efectes fang i dosi són poc importants (especialment en el sòl S) i amb el temps els alts valors inicials de BAA/C disminueixen molt i els més baixos es mantenen.

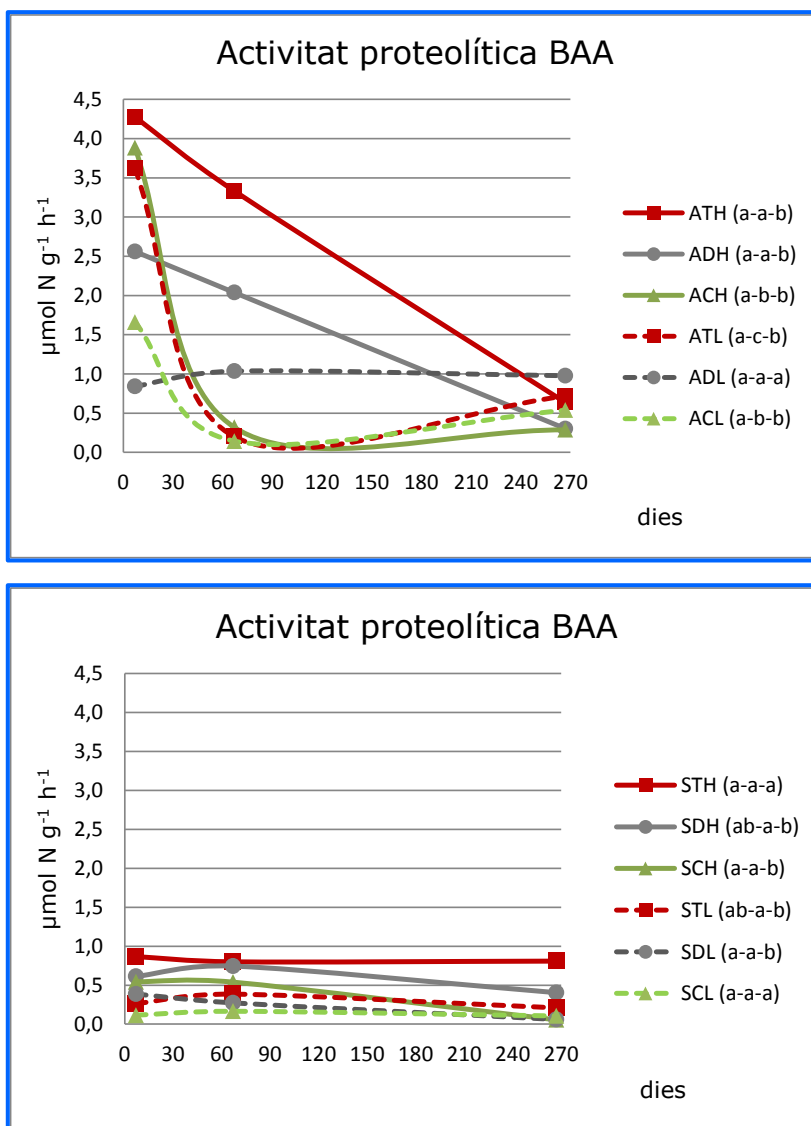


Figura 4.10 Valors de l'activitat proteolítica BAA en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a diferents temps 7-67-267 dies.

L'afegit de fang incrementa inicialment l'**activitat ureàsica** del control només entre 1-4 vegades en A depenent del fang i la dosi, però l'efecte intensificador passa a ser p 7-38 amb el temps d'incubació. A l'inici no hi ha efecte fang ni efecte dosi i amb el temps destaquen les barreges amb fang D com a les d'activitat més alta. L'efecte dosi reflexa valors H≥L.

Amb el temps d'incubació l'activitat UR de les barreges augmenta (especialment en el primer període on per les barreges amb sòl S s'arriba a un màxim als 67 dies) i disminueix, però al final, acaba sent sempre significativament superior a la inicial.

En aquest cas, les barreges tenen una activitat específica UR/C inicialment semblant a la del sòl control A, però al final, són superiors. A l'inici no hi ha efecte fang en les activitats específiques UR/C i amb el temps (especialment als 67 dies) destaquen les barreges amb fang D amb la més alta.

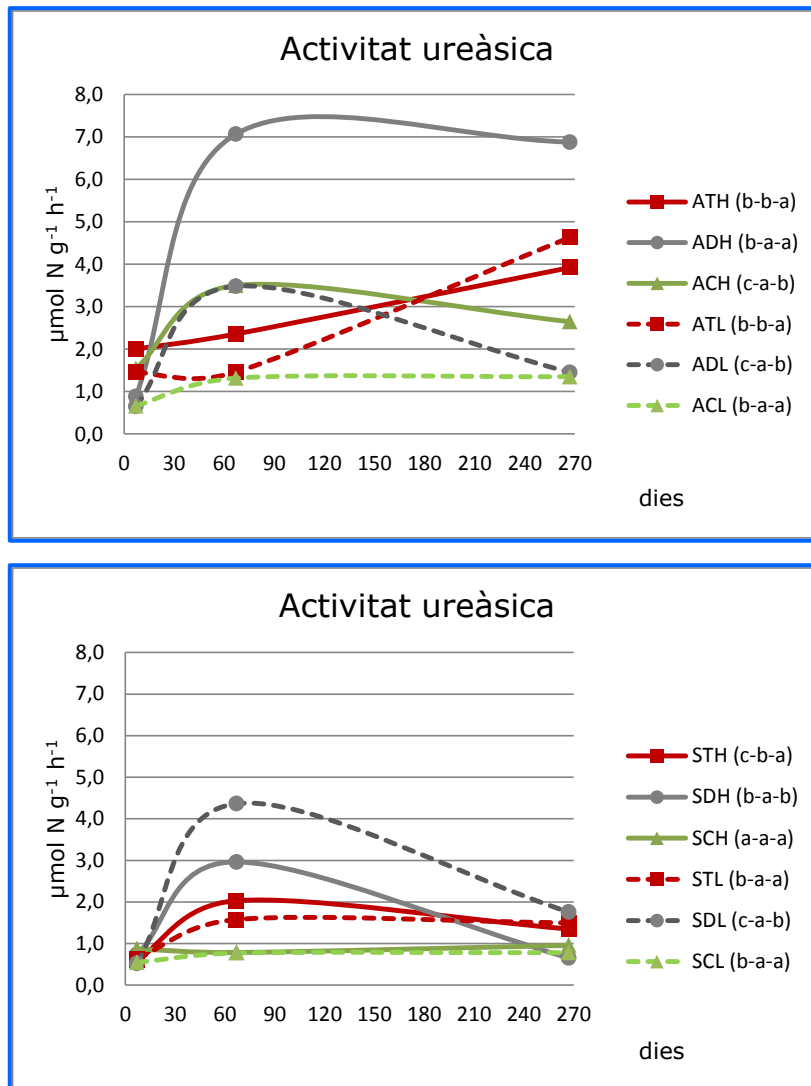


Figura 4.11 Valors de l'activitat ureàsica en les barreges sòl-fang als 7, 67 i 267 dies: codi de les barreges seguit de les diferències significatives. Per cada barreja, lletres diferents indiquen diferència significativa entre els valors a Diferents temps 7-67-267 dies.

Els quocients entre l'activitat BAA i el Naminoacídic (BAA/N_{AA}) de les barreges sòl A i fang, respecte del sòl control COA, resulten ser entre 3-12 vegades inferiors. Les barreges amb el fang C són les que més s'aproximen als valors del corresponent sòl control. Contràriament, per al quocient UR/N_{AA} existeix efecte intensificador ja que barreges presenten valors superiors al control, encara que és poc important.

Per la **discussió dels resultats de les activitats enzimàtiques proteolítica de BAA i ureàsica** hem de tenir present que intervenen en els darrers estadis de degradació dels compostos nitrogenats i estan involucrades en la hidròlisi dels enllaços amida C-N, de pèptids en el cas del BAA i no peptídics en el cas de la urea (Serra-Wittling et al., 1995; García et al., 2000; Madejón et al., 2001a)

L'activitat proteolítica de BAA també queda augmentada a l'inici per l'aport de la MO dels fangs, però en aquest cas, és menys important l'efecte activador de la biomassa del sòl ja que els dos sols són incrementats en la mateixa magnitud. La resposta del sòl S (on l'activitat no es veu afectada pel tipus ni quantitat de fang afegit) estaria d'acord amb el fet que és una activitat poc correlacionada amb el contingut de carboni, com troba també Madejón et al. (2001a) i com hem vist anteriorment en el

capítol de sòls naturals. Aquesta no dependència del contingut i tipus en MO es veu també en què, al final, el rang de valors per tots els tractaments i amb els dos sòls, és molt estret.

Els valors més baixos de BAA en les barreges A-D a l'inici està d'acord amb la diferent fracció nitrogenada dels fangs ja que el fang D és el que té menor proporció de pèptids/proteïna (Mejía, 2005). Per altra banda, la important davallada de l'activitat proteolítica BAA detectada en els tractaments ADH, ATH i ATL seria indicativa de disminució en la concentració dels pèptids, en aquestes barreges, capaços d'activar la síntesi de l'enzim d'acord a Moreno et al. (1999).

La baixa resposta de l'activitat ureàsica a l'addició inicial de fang al sòl pot ser conseqüència de tractar-se d'una activitat enzimàtica inhibida inicialment per la presència d'algun compost present en els fangs que amb el temps es transformés o quedés ocluit. Una possible acció inhibidora sobre l'activitat vindria donada per un elevat contingut inicial d'amoni en les barreges com a conseqüència d'un important procés d'amonificació als 7 dies d'incubació (Mc Carty et al., 1992; Geisseler, et al., 2010). En aquest sentit, Pascual et al. (2007), en l'estudi de barreges sòl-fang en dos règims d'humitat al llarg de 65 dies, addicionen els fangs un mes abans de l'estudi per evitar efectes fitotòxics com l'excés d'amoni. Contràriament, però, resultats de diverses experiències d'incubació troben que els residus estimulen l'activitat ureàsica del sòl des de l'inici (Bonmatí et al., 1985; Madejón et al., 2001b; Pascual et al., 2002).

Amb el temps, l'evolució de l'activitat UR i de la activitat específica UR/C també és diferent de les altres activitats perquè tendeix a créixer i separar-se de la del sòl control. Respecte al comportament d'aquesta activitat amb el temps en experiències d'incubació podem dir que és similar al observat per Serra-Wittling et al. (1995); aquests autors relacionen el pic en ureasa amb la producció d'enzims involucrats en el cicle del N posterior al moment en què la mort de biomassa hagués pogut incrementar l'aport de proteïna. El manteniment de l'activitat ureàsica també pot ser deguda a la existència d'una alta proporció d'enzim extracel·lular protegit d'acord a Geisseler, et al. (2010).

Els valors d'UR finals pel que fa als diferents fangs (on els valors més alts corresponen al fang D i els més baixos al fang C) fa pensar que el fang D és el que presenta una major proporció inicial d'inhibició o bé que és en aquestes barreges on es desenvolupa aquesta activitat enzimàtica com a conseqüència d'una demanda diferent de N. L'augment més important de l'activitat ureàsica es dona pels tractaments ADH, ATH i ATL i coincideix que són els tres tractaments on hi ha una major davallada de l'activitat proteolítica de BAA (entre 7 i 67 dies) i en els que el percentatge de degradació del N aminoacídic ha estat inferior (0-15 %). Aquests resultats posarien de manifest que en aquestes barreges la mineralització del N proteic s'ha vist dificultada, possiblement s'ha seguit via anaeròbica amb productes finals de transformació diferents tal com hem apuntat anteriorment. En aquest sentit, d'acord amb Mc Carty et al. (1992) la síntesi de la ureasa per part dels microorganismes està controlada per una regulació global del N; i també podem apuntar que la síntesi de ureasa és activada en presència d'urea i altres fonts de N així com en condicions de fam de nitrogen d'acord amb Geisseler et al. (2010).

4.4.1.5 Efectes dels posttractaments dels fangs sobre les característiques finals de les mostres

Per a descriure comparativament les característiques bioquímiques de les sis barreges finals per cada sòl presentem els **gràfics radials** (Hoffman et al., 2003; Miralles et al., 2007). Les Figures 4.12 i 4.13 s'han elaborat amb el conjunt de les variables estandarditzades dels sis tipus de barreja, separatament per cada sòl, i es presenten agrupant les dues dosis per cada tipus de fang. A partir d'elles podem deduir que:

En el cas de les barreges amb sòl argilós,

- Les barreges A-T (dosi alta) són les més riques en carboni orgànic, CHT, CHE, N aminoacídic i activitat GLC.
- Els diagrames de les barreges A-D posa de manifest que en el fang deshidratat la dosi aplicada ha tingut un efecte molt important en les característiques de les mostres finals. Comparativament a la ADH, en les barreges ADL queda poca MO, però amb alta proporció CHE/CHT i especialment activa pel que fa a l'activitat proteolítica de BAA, en contrast amb l'activitat UR.
- Les barreges A-C queden descrites pels valors mínims de totes les variables i més propers entre les dues dosis.

En el cas de les barreges amb sòl sauló,

- Les barreges S-T, en la dosi alta, són les que presenten els valors més alts de tots els paràmetres (carboni orgànic, CHT, CHE i N aminoacídic, GLC i BAA) excepte per l'activitat UR.
- En les barreges S-D destaca el diferent predomini de les activitats BAA i UR depenent de la dosi.
- Les barreges S-C queden descrites pels valors mínims de totes les variables, amb l'excepció de l'activitat GLC, i més propers entre les dues dosis.

Atenent al conjunt de resultats exposats en els apartats anteriors, podem interpretar les característiques de les barreges al final de l'experiència; ho fem separatament pels tres tipus de barreges donat que, com ja hem vist, el grau de transformació dels fangs s'ha vist molt condicionat pel tipus de sòl.

La relació de les variables per les **barreges A-T** fan pensar que aquestes barreges contenen encara MO per transformar, rica en CHT i N-aminoacídic, però amb relativament baixa activitat enzimàtica relacionada amb el cicle del N. Aquesta situació final és poc esperable donada la major labilitat inicial del material, però podria respondre als efectes indesitjables ocasionats per l'addició de material que s'està descomposant molt biològicament actiu i que consumiria molt oxigen tal com hem comentat anteriorment.

En el cas de les **barreges A-D** s'observa un important efecte dosi ja que sis de les vuit variables representades presenten diferència significativa entre els valors de H i L. Podem dir que si bé la progressió de la dosi baixa ha comportat al final una MO amb

alta proporció CHE/CHT i possiblement pèptids de baix pes molecular, doblar la dosi de fang D ha impedit la seva transformació. Aquesta característica pot ser conseqüència de que s'hagi pogut donar condicions anaeròbiques per manca de propietats físiques adequades, i/o inhibició per un més alt contingut en contaminants del fang D tal com hem apuntat anteriorment.

Per últim podríem descriure les **barreges A-C** com les barreges on les dues dosis han evolucionat de forma molt semblant cap a el menor contingut de MO i mínims de CHE i on el sòl es caracteritza per ser enzimàticament menys actiu, però on la fracció proteica és la més enzimàticament activa.

La relació de les variables en els tres tipus de barreja amb el sòl S situen les **barreges S-T** com les de més contingut de MO i alta activitat enzimàtica on és important el procés d'hidròlisi de pèptids i per tant, potencialment transformable amb el temps.

Contràriament semblaria que en les **barreges S-C** ha quedat menor contingut de MO i la que queda és menys làbil i rica en proteïna enzimàticament activa.

La descripció de les **barreges S-D** correspondria a una posició intermèdia a les dues anteriors on destaca el nivell moderadament baix d'activitat enzimàtica relacionada amb el carboni (GLC) i l'alt nivell relacionada amb el N (BAA per la dosi alta i UR per la dosi baixa); aquesta característica pensem que podria estar relacionada amb un procés d'hidròlisi de pèptids i carbohidrats microbians que indicaria una dinàmica de transformació en aquestes barreges també intermèdia a les anteriors.

El conjunt de resultat discutits en els apartats anteriors i les característiques de les mostres finals semblen indicar que i) l'assecatge tèrmic accelera el primer procés de descomposició de la MO que té lloc al sòl ja que proporciona més MO làbil; ii) el procés de compostatge proporciona una MO no tan làbil, però amb més activitat enzimàtica la qual cosa es tradueix en una major mineralització i que per tant amb el temps la MO restant sigui més estable, i iii) quan els fangs s'apliquen en un sòl argilós, es detecta un fre en l'evolució esperada de la MO; aquest és menys acusat en el cas del fang compostat (el qual presenta un comportament més reproducible, més independent del sòl) que en el fang assecat tèrmicament, on es sembla que es poden donar condicions de manca d'oxigen. De les consideracions anteriors podem dir que l'aport de fang sotmès a posttractament sempre és més adequat que la de fang deshidratat.

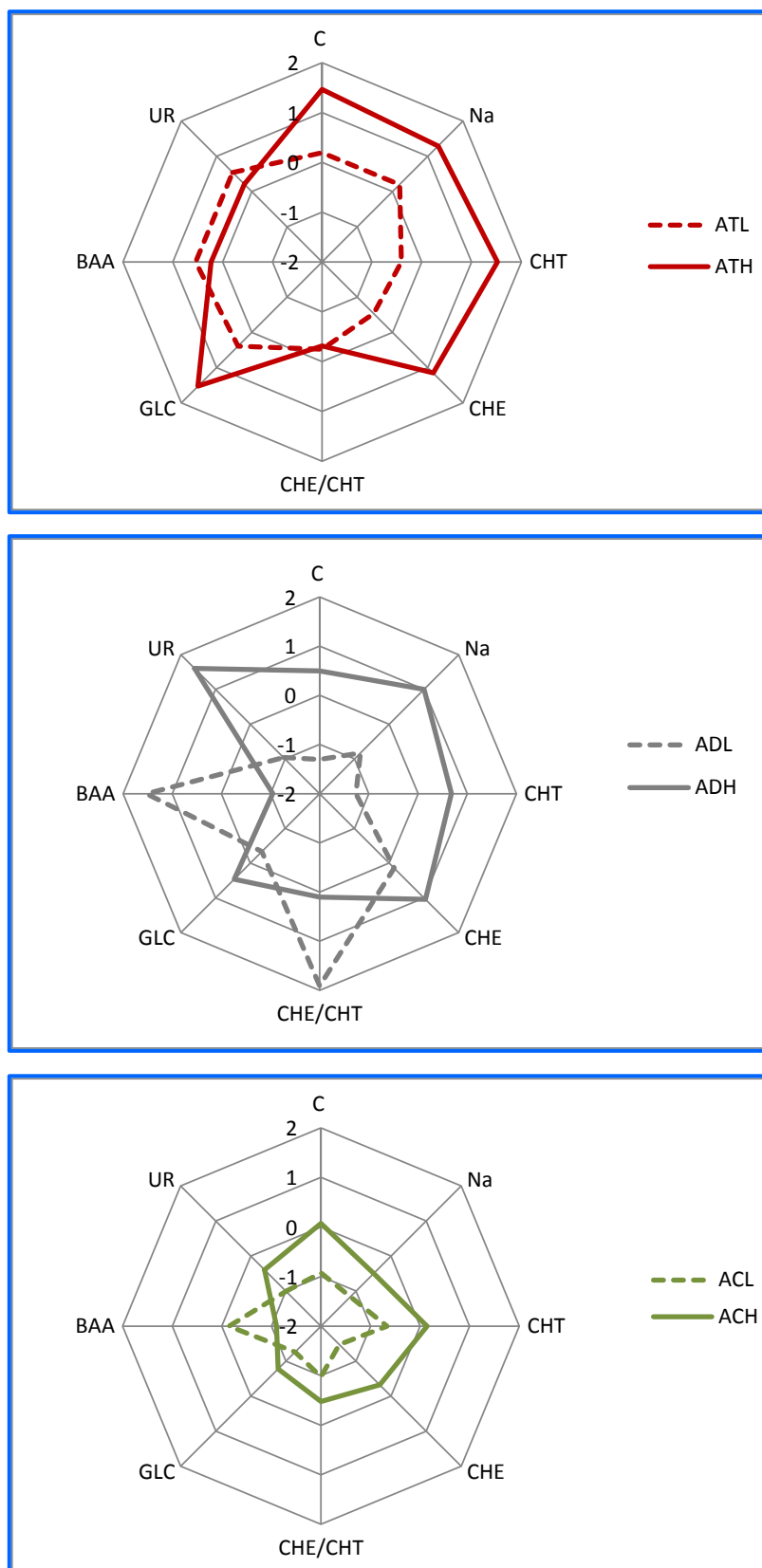


Figura 4.12 Representacions radials del conjunt de paràmetres bioquímics estandarditzats considerant totes les mostres finals (267 dies) corresponents a les barreges amb el sòl A de l'experiència en lisímetres.

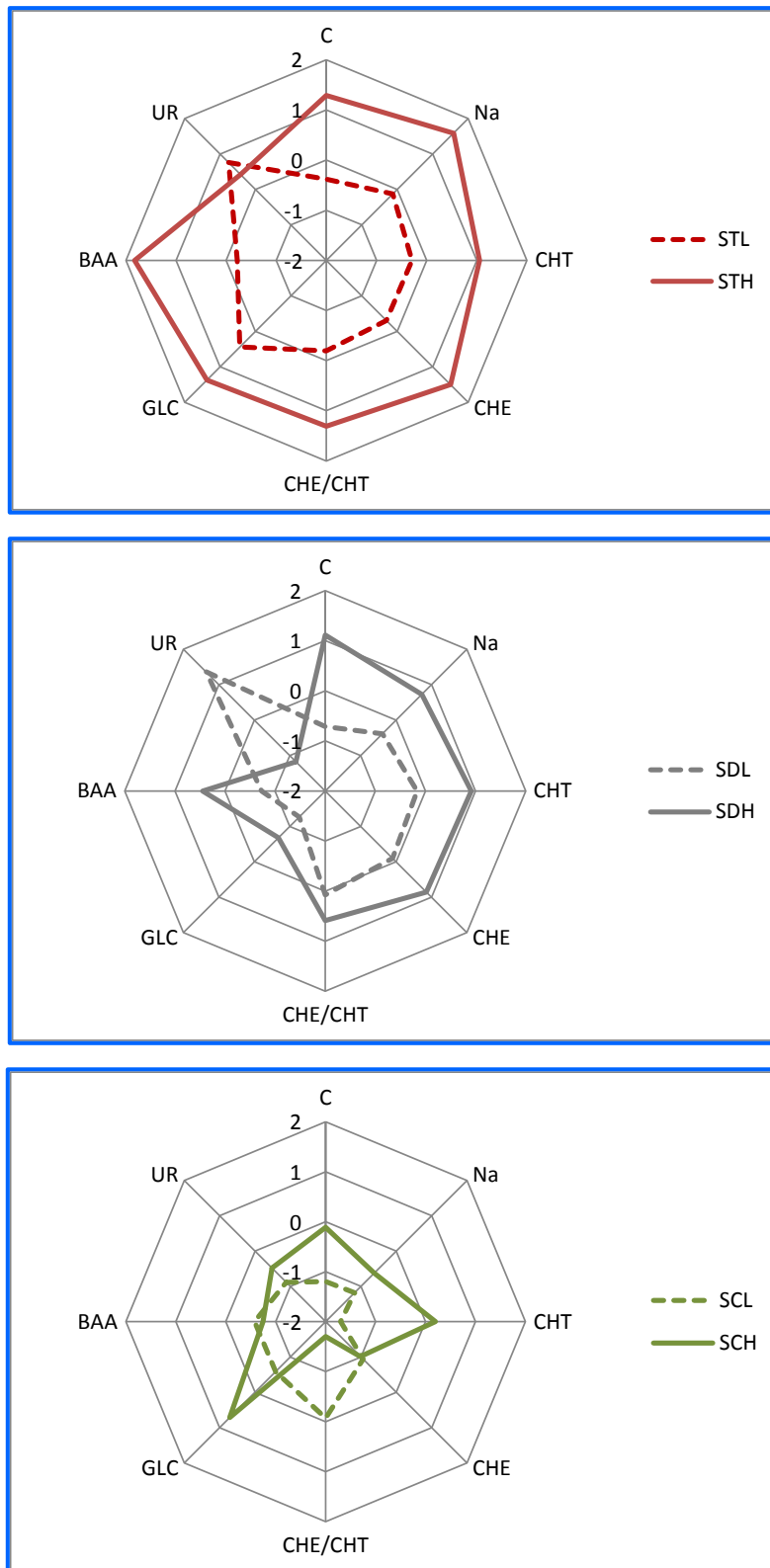


Figura 4.13 Representacions radials del conjunt de paràmetres bioquímics estandarditzats considerant totes de les mostres finals (267 dies) corresponents a les barreges amb el sòl S de l'experiència en lisímetres.

4.4.2 Experiència 2: experiència en parcel·les

4.4.2.1 Efectes globals

a. Valors i comportament de les variables

Presentem en aquest apartat els resultats de la estadística descriptiva i de l'ANOVA 2A i ANOVA 2B. El resum de l'estadística descriptiva del conjunt de valors (2 sòls, 3 fangs i 2 sòls control i 2 temps) obtinguts dels diferents paràmetres bioquímics controlats en l'experiència en parcel·les es presenta en la Taula 4.23 i els resultats de l'ANOVA 2A i ANOVA 2B (valors de F) en les Taules 4.24 i 4.25.

La dispersió global de valors deguda al sòls, fangs i temps es desigual atenent al paràmetre considerat; es més alta per les activitats enzimàtiques (especialment en per l'activitat BAA) i inferior per carboni, carbohidrats totals i carbohidrats extractables. En general, la dispersió disminueix quan considerem els paràmetres relatius al carboni (especialment per CHT/C), però augmenta en el cas de l'activitat específica BAA/C.

Aquests resultats de diferent dispersió és coherent amb el que descriu la bibliografia, una major variabilitat de les activitats enzimàtiques respecte de les propietats més constitutives de la MO, com són els carbohidrats. Per altra banda, el comportament de l'activitat BAA posa de manifest la seva major dependència del tipus de fang -ja que el posttractament condiona el diferent grau d'hidròlisi de les proteïnes (Mejía, 2005)- que no del contingut total de MO. Marando (2013) en una experiència similar d'aplicació de fangs (assecats tèrmicament i compostats) presenta un rang de valors i una variabilitat semblants per les activitats enzimàtiques GLC i GAL i també es manté el valor de CV en considerar la variabilitat de les activitats específiques. Els valors dels paràmetres C, CHT i CHE per aquesta experiència són, però, inferiors i també ho és la variabilitat del contingut en carbohidrats; aquests resultat és explicable atenent a què els sòls controls són sòls residuals de pedreres amb un contingut en MO molt baix, inferior a 1 %.

A l' inici, totes les variables absolutes presenten efecte fang en ambdós sòls i la capacitat diferenciadora és semblant entre variables i entre sòls. Amb el temps, en el sòl franc es manté o creix la capacitat diferenciadora i en canvi en el sòl franc-arenós es perd. Al final, totes les variables absolutes (a excepció de CHE i de l'activitat UR en el sòl franc-arenós) segueixen presentant efecte fang i destaca l'alta capacitat diferenciadora de les variables GLC i GLC/C entre les mostres finals de sòl franc.

L'evolució de la capacitat diferenciadora de les variables amb el temps indica que en les mostres de sòl franc-arenós ha estat més alt el grau de transformació, en el període controlat. L'alta capacitat diferenciadora de l'activitat GLC està d'acord amb altres experiències on també destaca la sensibilitat d'aquesta activitat enzimàtica en la diferenciació entre tractaments (Miller i Dick, 1995; Bandick i Dick, 1999; Monreal i Bergstrom, 2000; Badiane et al., 2001; Knight i Dick, 2004).

Taula 4.23. Mitjana, rang i dispersió pels paràmetres pel conjunt de mostres (sòls control i de sòl-fang) de l'experiència en parcel·les.

	Unitats	Mitjana \pm d.e	Mínim	Màxim	Màx/Mín	CV (%)
C	g 100 g ⁻¹	2,14 \pm 0,49	1,47	3,33	2,3	23
CHE	mg glucosa g ⁻¹	0,13 \pm 0,05	0,07	0,23	3,3	34
CHT		2,56 \pm 0,75	1,11	3,93	3,5	29
CHE/CHT	g 100 g ⁻¹	5,5 \pm 1,7	1,9	8,5	4,5	30
GLC	μ mol pNF g ⁻¹ h ⁻¹	0,96 \pm 0,40	0,42	1,84	4,4	42
GAL(*)		0,08 \pm 0,02	0,03	0,10	3,3	29
UR	μ mol N g ⁻¹ h ⁻¹	1,39 \pm 0,62	0,62	2,98	4,8	45
BAA		3,30 \pm 1,45	1,16	6,29	5,4	44
CHE/C	g C-glucosa 100 g ⁻¹ C	0,25 \pm 0,06	0,11	0,38	3,5	24
CHT/C		4,75 \pm 0,76	3,03	6,00	2,0	16
GLC/C	μ mol pNF g ⁻¹ C h ⁻¹	46,4 \pm 19,8	23,4	78,8	3,4	43
GAL/C(*)		4,04 \pm 1,4	1,78	6,49	3,6	36
UR/C	μ mol N g ⁻¹ C h ⁻¹	63,8 \pm 19,4	34,3	108,2	3,2	30
BAA/C		162,9 \pm 76,2	43,0	271,2	6,3	47

(*)només mostres finals

Taula 4.24. Resultats de l'ANOVA 2A per a l'experiència en parcel·les: valors de F i significativitat del factor fang per cada temps.

Sòl	Variable	4 dies	395 dies	Sòl	Variable	4 dies	395 dies
Franc	C	20,3 ^{***}	18,1 ^{***}	Franc-arenós	C	23,9 ^{***}	2,9 [*]
	CHE	17,5 ^{***}	9,6 ^{***}		CHE	10,9 ^{***}	ns
	CHT	4,4 [*]	38,3 ^{***}		CHT	29,2 ^{***}	14,5 ^{***}
	GLC	28,3 ^{***}	503,5 ^{***}		GLC	24,9 ^{***}	6,4 ^{***}
	BAA	31,8 ^{***}	8,3 ^{***}		BAA	8,0 ^{***}	5,6 ^{**}
	UR	3,8 [*]	17,8 ^{***}		UR	48,8 ^{***}	ns
	CHE/CHT	13,6 ^{***}	4,8 ^{**}		CHE/CHT	15,4 ^{***}	ns
	CHE/C	19,8 ^{***}	6,2 ^{**}		CHE/C	ns	ns
	CHT/C	ns	4,8 [*]		CHT/C	11,4 ^{***}	6,1 ^{**}
	GLC/C	ns	136,3 ^{***}		GLC/C	8,6 ^{***}	4,2 [*]
	BAA/C	18,8 ^{***}	10,7 ^{***}		BAA/C	ns	8,7 ^{***}
	UR/C	ns	8,8 ^{***}		UR/C	15,3 ^{***}	3,0 [*]

* <0,05 ** <0,01 *** <0,001; ns no significatiu

Taula 4.25. Resultats de l'ANOVA 2B per a l'experiència en parcel·les: valors de F i significativitat del factor fang (395 dies).

	GAL	GAL/C	N _{AA}	GLC/N _{AA}	GAL/N _{AA}	BAA/N _{AA}	UR/N _{AA}
Sòl franc	67,7***	37,9***	1514***	78,8***	4,8*	82,9***	16,2***
Sòl franc-arenós	4,2*	6,7*	154,5***	8,3***	17,4***	17,8***	5,1**

***<0,001 **<0,001 *<0,05

b. Efecte fang i canvis dels paràmetres amb el temps

En aquest apartat descrivim les característiques dels sòls controls i l'efecte fang global que es pot extreure dels resultats de la separació de mitjanes (ANOVA 2A i ANOVA 2B) i que desenvolupem més endavant, separatament per paràmetres.

Pel que fa als dos **sòls controls** emprats en l'experiència, franc i franc arenós, tot i tenir un nivell de carboni orgànic semblant, presenten MO de característiques bioquímiques diferents. El sòl franc-arenós tot i ser més pobre en CHT i CHE té valors més alts de les activitats enzimàtiques (especialment proteolítica de BAA i GAL) tant absolutes com específiques. Aquestes diferències poden estar relacionades amb les diferents característiques dels dos terrenys i de la preparació prèvia a l'aplicació dels fangs i amb les propietats biològiques. Recordem que les parcel·les del sòl franc-arenós són de sòl forestal i que les restes de vegetació es van deixar en superfície i en canvi les del sòl franc són de sòl agrícola on es van eliminar les restes vegetals i llaurat.

Pel que fa a les característiques biològiques sabem que la biomassa i la respiració del sòl franc són superiors a les del sòl franc-arenós i que tanmateix, els recomptes de fongs i llevats en el sòl franc-arenós són més elevats tant a l'inici com al llarg de l'estudi (IQS-CREAF-ESAB, 2002; Tarrasón et al., 2010). Podem pensar que possiblement la comunitat microbiana desenvolupada sobre el sòl franc-arenós, per actuar sobre les restes vegetals, pugui justificar l'activitat enzimàtica detectada.

En cap dels dos sòls controls es detecta valors finals de carboni orgànic diferents dels inicials, però sí que es detecten variacions temporals en altres paràmetres, especialment en el sòl franc, que poden ser atribuïbles l'augment del grau de recobriment vegetal en aquest cas (Tarrasón, 2004).

Analitzem l'**efecte global** de l'addició dels fangs als sòls controls a través del seu efecte intensificador així com la tendència general dels paràmetres amb el temps.

L'**efecte intensificador** (Taula 4.26) és molt semblant entre sòls, entre fangs i entre paràmetres. Sobre el sòl franc, l'efecte intensificador del fang inicialment és, pels diferents paràmetres, igual que el de l'increment en MO i en canvi sobre el sòl franc-arenós és superior al de MO excepte per l'activitat BAA que és inferior. Amb el temps desapareix l'efecte intensificador per les activitats BAA (per als dos sòls) i UR (només sòl franc-arenós) i roman per la resta de casos i és superior al del carboni orgànic. El contingut en N-aminoacídic en les mostres finals és la variable que resta més incrementada per l'addició de fangs respecte dels dos sòls controls al cap dels 395 dies. L'activitat enzimàtica més incrementada és l'activitat GAL encara que l'efecte intensificador final només existeix sobre el sòl franc.

Pel que fa a l'efecte temps podem dir que per la majoria de paràmetres la variació la marca el tipus de sòl ja que com a comportament general els valors augmenten amb en el cas de les parcel·les de sòl franc i disminueixen en el cas de les parcel·les de sòl franc-arenós; destaquem, però la variable CHE ja que en gairebé tots els casos les parcel·les presenten al final un contingut significativament inferior a l'inicial.

Taula 4.26. Mitjana de l'efecte intensificador* per a les diferents variables a l'inici i al final de l'experiència en parcel·les.

	C		CHT		CHE		N _{AA}
	4 dies	395 dies	4 dies	395 dies	4 dies	395 dies	395 dies
Barreges sòl F	<u>1,4</u>	<u>1,4</u>	1,4	1,8	1,4	1,4	<u>2,7</u>
Barreges sòl Fr	<u>1,6</u>	1,1	<u>2,3</u>	1,3	<u>1,8</u>	1,3	<u>1,7</u>
	GLC		UR		BAA		GAL
	4 dies	395 dies	4 dies	395 dies	4 dies	395 dies	395 dies
Barreges sòl F	1,4	<u>1,9</u>	1,4	1,7	1,4	1,0	<u>2,8</u>
Barreges sòl Fr	<u>2,0</u>	1,2	1,9	0,7	1,4	0,9	0,8

(*) Valor del quocient que resulta de dividir el valor de les variables en les parcel·les amb fang (mitjana dels tres fangs) entre el corresponent valor en el sòl control. Els valors subratllats corresponen als casos en els que el tractament control resulta ser significativament diferent dels tres fangs.

L'efecte intensificador inicial detectat per totes les variables està d'acord amb els resultats de múltiples experiències de camp sobre l'aplicació de residus orgànics (Martens i Frankenberger, 1992; Pascual et al., 2000; Bonmatí et al., 2000; Albiach et al., 2001a, 2001b; Ros et al., 2003; Bastida et al., 2008b). Paral·lelament a l'increment de carboni orgànic les variables que trobem inicialment més incrementades són el contingut en CHT i l'activitat GLC la qual cosa obeeix a l'estret lligam entre aquests paràmetres i el contingut de MO (Lowe, 1978; Eivazi i Tabatabai, 1988; Turner, 2002; Knight i Dick, 2004).

Els efectes de la MO afegida semblen ser més importants en el sòl franc-arenós, sòl control amb menys MO, on es veuen inicialment incrementades per sobre del contingut en carboni orgànic i on es dona una dinàmica més clara de davallada dels paràmetres amb el temps. Tanmateix, però, Tarrasón et al. (2010) assenyalen, per a la mateixa experiència, que en aquest sòl que les propietats microbiològiques són menys sensibles als canvis inicials com a resultat de l'aplicació del fang que el sòl franc; els autors troben efecte intensificador per a la biomassa microbiana i respiració encara que en les parcel·les de sòl franc-arenós és més atenuat i no es detecta per a la biomassa inicialment (mostreig 14 dies) degut a la manca de pluja.

L'alt efecte intensificador del N aminoacídic present en les mostres finals és un resultat explicable si tenim en compte que el component proteic és el majoritari, respecte del contingut en matèria orgànica i N orgànic, dels fangs (Hattori i Mukai, 1986; Pascual et al., 1999). Això podria explicar el també elevat efecte intensificador de l'activitat GAL en les mostres finals si pensem en què aquesta activitat enzimàtica pot estar involucrada en la descomposició de polisacàrids complexos tipus glicoproteïnes.

4.4.2.2 Efectes en el contingut de: C orgànic, N aminoacídic, Carbohidrats totals i extractables

A l'inici l'efecte intensificador sobre el **Carboni orgànic** varia entre 1,2-1,9 vegades depenent del sòl i del tipus de fang de forma que l'afegit de fang augmenta significativament el contingut en MO respecte del control en tots els casos (Taula 4.26 i Figura 4.14). Les parcel·les amb fang inicialment presenten un contingut de carboni orgànic mitjà de 2,7 % C i 2,4 % C respectivament pel sòl franc i franc-arenós, valors que són pròxims als fixats en el disseny experimental.

Durant el temps controlat el contingut en MO disminueix en totes les parcel·les (excepte en el control FrO), però només les parcel·les F-C, Fr-C i Fr-T presenten un contingut final de carboni orgànic significativament inferior a l'inicial. En conjunt, la dinàmica de disminució de la MO en els diferents tractaments ha estat més accentuada en el sòl franc-arenós que en el sòl franc. En el primer cas, la minva de carboni orgànic només s'ha donat en les parcel·les amb fang i ha estat del 42 % (Fr-C), 31 % (Fr-T) i 12 % (Fr-D) de forma que només les parcel·les de fang D presenten un valor de carboni significativament superior al control. En el segon cas, el descens ha estat en mitjana del 9 %, més similar pels quatre tractaments i superior per les parcel·les F-C.

Els resultats de carboni orgànic estan globalment d'acord amb els de Tarrasón et al. (2010) on els autors descriuen, per a la mateixa experiència, la dinàmica de la MO juntament amb els valors de les propietats microbiològiques als 14, 119 i 401 dies. Les diferències detectades entre els dos sòls, on la disminució de MO ha estat més acusada en les parcel·les amb fang de sòl franc-arenós, que en les de sòl franc, és un resultat esperat d'acord amb la influència general de la textura del sòl en aquest procés i anàleg al que hem assenyalat en l'experiència en lisímetres. Els valors obtinguts sobre la variacions del contingut en carboni orgànic són difícils de comparar amb la bibliografia (són molt variables i dependents de les dosi de fang aplicades i del temps controlat). En l'experiència de Marando (2013) els valors de mineralització oscil·len entre 0-50 % depenent del tipus de sòl residual i fang.

Pel que fa a l'efecte fang, les diferències entre els comportaments dels fangs T i C era poc esperada i no s'ajusta al d'altres experiències on la menor davallada en MO correspon al residu que aporta MO més estabilitzada (Fernández, et al., 2007b i 2009; Franco-Otero et al., 2012; Marando, 2013). Tal com hem apuntat en l'experiència en lisímetres, la davallada del contingut en carboni orgànic de les parcel·les el fang C podria ser indicatiu d'un defectuós/insuficient procés d'estabilització del material a través del compostatge. Pel que fa al comportament del fang tèrmic, hem de tenir en compte aquí, però que Tarrasón et al. (2010) sobre la mateixa experiència; els autors detecten per a les parcel·les amb fang tèrmic, poca correspondència entre l'activitat microbiana i la mineralització la qual cosa és indicativa de baixa eficiència en l'ús del substrat i ho relacionen amb altres resultats sobre efectes tòxics per aquest fang. També hem de tenir present que d'acord amb Ojeda et al. (2003) les pèrdues inicials del fang aplicat a causa de l'erosió van ser més importants en les parcel·les F-T i F-C respecte a les de F-D donat que el fang D tenia una estructura més compacta.

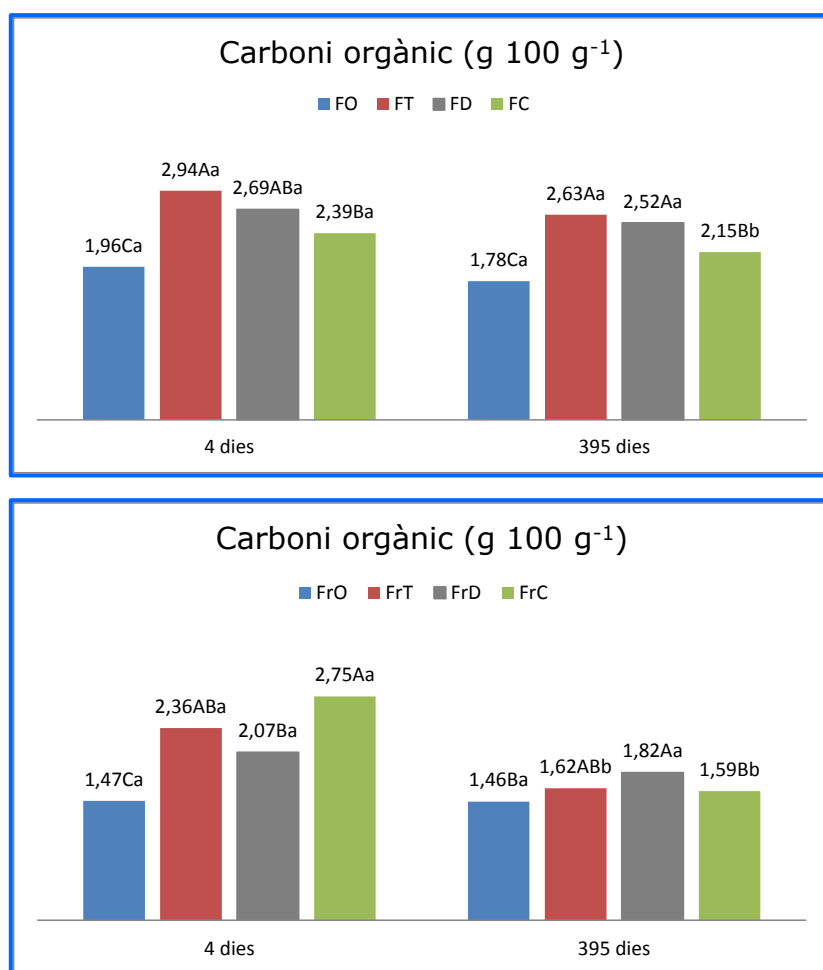


Figura 4.14 Valors de carboni orgànic en les parcel·les amb fang i en els sòl control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.

Com es pot veure en la Figura 4.15 i la Taula 4.26, el contingut en **N aminoacídic** als 395 dies resulta ser la variable final amb més efecte intensificador; així després de 395 dies, l'afegit de fang ha incrementat el N aminoacídic en promig 2,7 vegades el contingut del sòl control en el cas del sòl franc, i 1,7 vegades en el cas del sòl franc-arenós. Els continguts de N_{AA} de les parcel·les són inferiors (entre 5-10 vegades) als descrits per Marando (2013) de l'experiència de restauració de sòls amb fangs compostats i assecats tèrmicament, corresponents a un temps similar, fet segurament atribuïble a què les dosis de fangs que es van aplicar varen ser més altes (de l'ordre de 10 vegades).

L'efecte fang final és molt acusat i en ambdós casos existeixen diferències significatives entre els 4 tractaments. L'efecte fang és diferent pels dos sòls i queda expressat per $T > D > C$ en el cas del sòl franc i per $D > C > T$ en el cas del sòl franc-arenós. Els valors finals del contingut en N aminoacídic en les diferents parcel·les estan en consonància amb el diferent percentatge de mineralització del carboni pels dos sòls i indiquen que en les parcel·les de sòl franc-arenós on s'ha aplicat el fangs T i C s'ha donat més transformació de la MO.

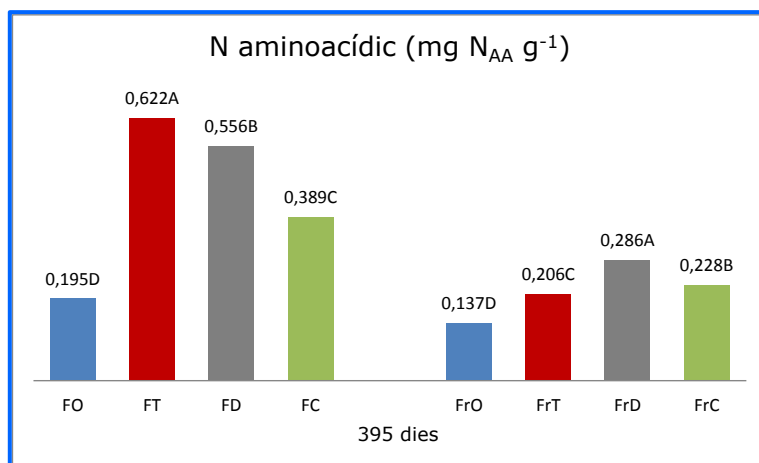


Figura 4.15 Valors de N aminoacídic en les parcel·les amb fang i en els sòl control al final de l'experiència. Valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments.

Els resultats de **Carbohidrats totals i Carbohidrats extractables** exposats en les Figures 4.16 i 4.17 es complementen amb els valors relatius al carboni orgànic de la Figura 4.18.

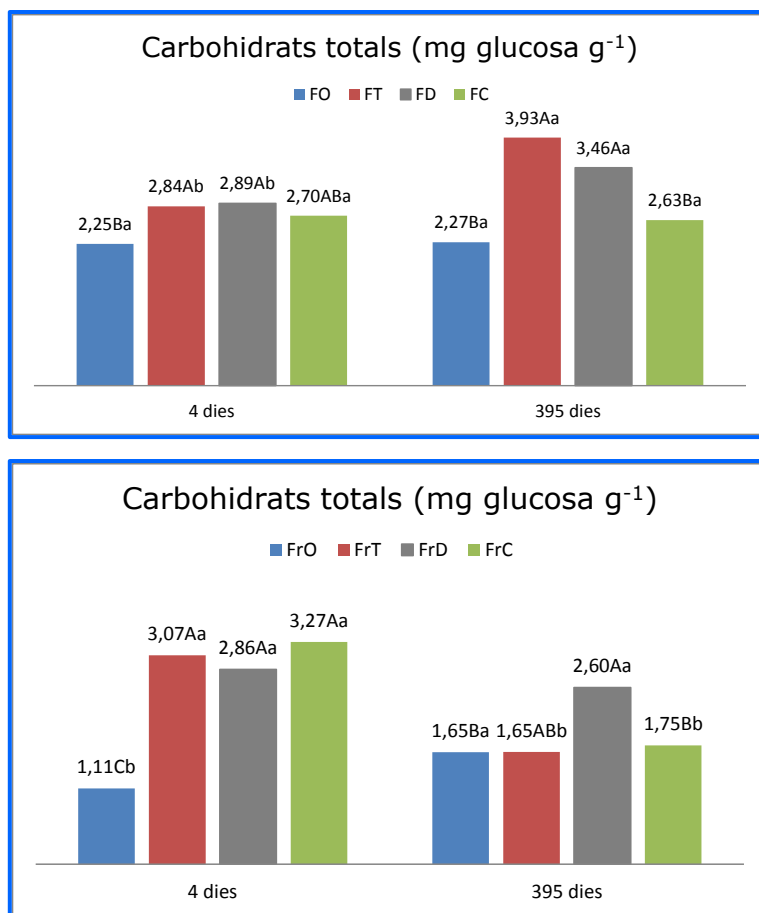


Figura 4.16 Valors de carbohidrats totals en les parcel·les amb fang i en els sòls control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.

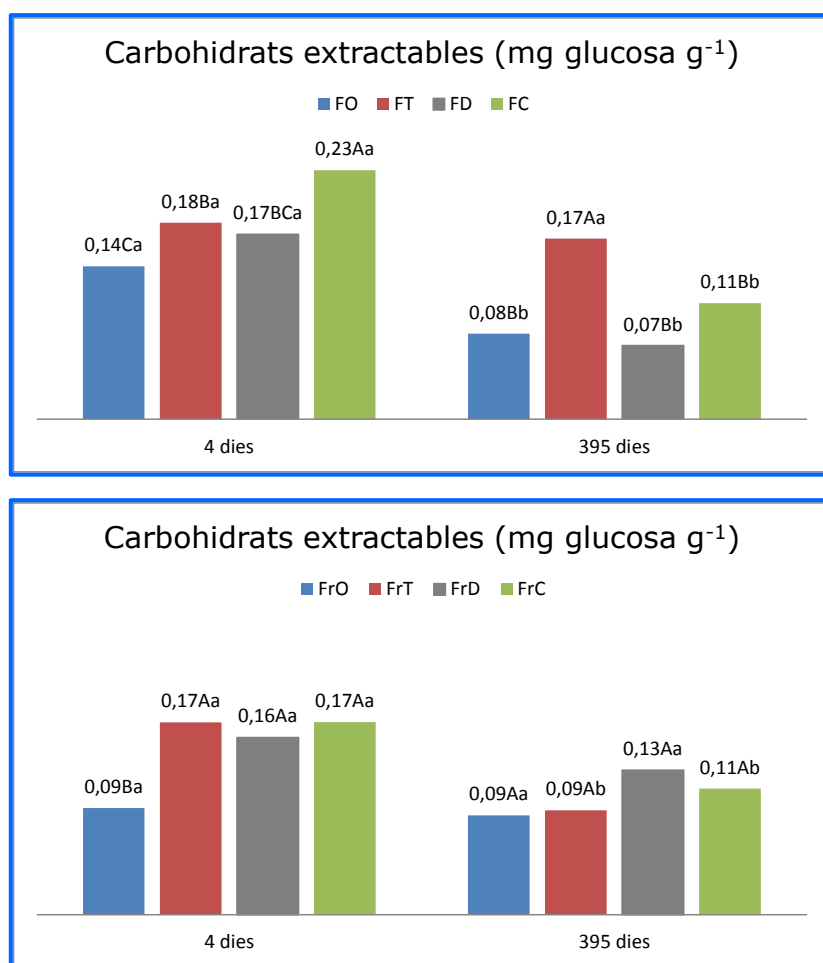


Figura 4.17 Valors de carbohidrats extractables en les parcel·les amb fang i en els sòls control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.

L'afegit del fang augmenta a l'inici entre 1,4 i 2,3 vegades el CHT dels sòls controls franc i franc-arenós respectivament (Taula 4.26). Només en el cas del sòl franc-arenós l'efecte sobre el sòl és significatiu pels tres fangs i a l'inici, no hi ha diferències entre el contingut en CHT de les parcel·les on s'han aplicat els tres fangs diferents.

La dinàmica del contingut en CHT amb el temps de cadascun dels tractaments és diferent en ambdós sòls. En el sòl franc el contingut en CHT s'incrementa significativament per FT i FD i en el sòl franc-arenós augmenta significativament pel sòl control FrO i disminueix significativament per FrT i FrC. Al final les parcel·les que han rebut fang deshidratat (en ambdós sòls) i les que han rebut fang tèrmic (només per el sòl franc) presenten contingut en CHT superior al sòl control.

El comportament del contingut relatiu de CHT (CHT/C) permet posar de manifest que i) només en el cas de les parcel·les FrC, la minva en el contingut absolut en CHT no es tradueix en una reducció del contingut relatiu de CHT/C, i ii) al final les parcel·les que presenten la MO significativament més rica en CHT, respecte dels altres tractaments, són les que han rebut fang D en el sòl franc-arenós.

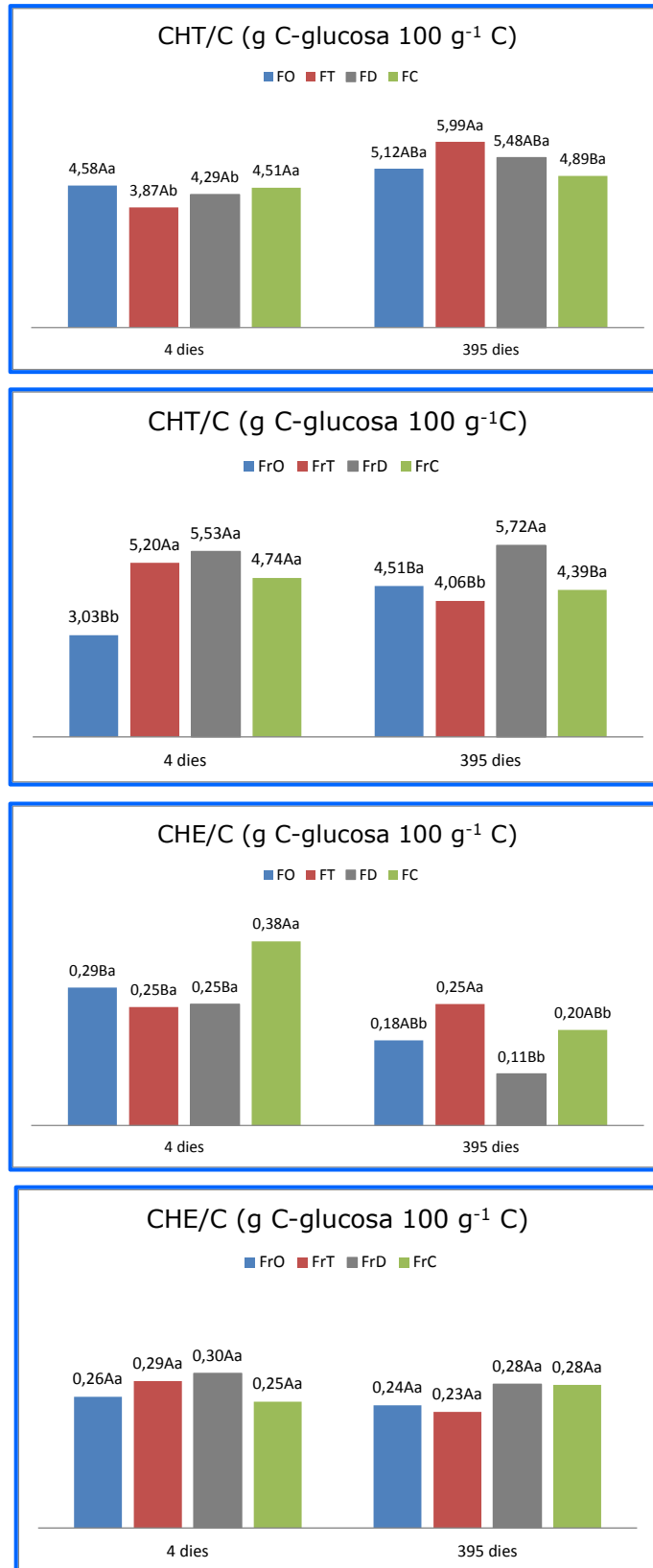


Figura 4.18 Valors de carbohidrats totals i carbohidrats extractables relatiu al carboni en les parcel·les amb fang i en els sòl control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.

L'afegit de fang augmenta a l'inici 1,4 vegades el CHE del sòl control franc i 1,8 vegades el CHE del sòl control franc-arenós (Taula 4.26). En el cas del sòl franc-arenós l'augment és significatiu per cadascun dels tres fangs.

A l'inici només es posen de manifest diferències entre els fangs aplicats en el sòl franc on destaca el contingut en CHE de les parcel·les amb fang compostat. El contingut en CHE amb el temps disminueix en tots els casos encara que per FT, FrD i el sòl control FrO els valors finals no són significativament diferents dels valors inicials. Als 395 dies, les parcel·les que han rebut fang igualen ara el contingut en CHE del respectiu sòl control, a excepció de FT que segueix sent significativament més alt.

El comportament del contingut relatiu de CHE (CHE/C) permet posar de manifest que i) inicialment només en el cas del fang compostat sobre sòl franc hi ha un augment del contingut relatiu de CHE de la MO; ii) en el sòl franc la minva en CHE del sòl també representa una minva relativa dels CHE de la MO, excepte pel cas del fang T; iii) en el sòl franc-arenós, en cap cas no hi ha minva relativa dels CHE de la MO i, iv) l'única diferència significativa en el contingut relatiu de CHE de la MO final és FT>FD, parcel·les del sòl franc.

Com a **interpretació dels resultats de carbohidrats totals i extractables** veiem que l'efecte fang es dona bàsicament en les mostres finals i per tant podem pensar que és conseqüència de la seva diferent evolució. La dinàmica dels carbohidrats totals respon, especialment en el sòl franc-arenós, al que caldria esperar, una davallada paral·lela al procés de mineralització d'acord amb la seva alta degradabilitat. Així, anàlogament al grau de mineralització la major davallada es dona per a les parcel·les FrT i FrC. Per altra banda, però, l'augment detectat en el valor de CHT per a les parcel·les de sòl franc (que a més representa enriquiment en CHT de la MO final) es pot relacionar amb i) un procés de síntesi microbiana i/o d'alliberació del polisacàrids, que formen part d'altres biomolècules, que explicaria la seva acumulació anàlogament al que hem assenyalat també pel sòl tipus argilós en l'experiència en lisímetres, i ii) el recobriment vegetal que va ser més important en el sòl franc i per les parcel·les de fang D i T (Tarrasón, 2004).

Val a dir que els resultats de continguts en carbohidrats totals de Ojeda et al. (2008) sobre estabilitat dels agregats en les mateixes parcel·les de sòl franc al cap de 2 anys es mantenen les diferències entre fangs i amb el sòl control.

Els resultats de carbohidrats extractables són un reflex dels canvis en la fracció més làbil de la MO. Així, es detecta la seva davallada que és més acusada en aquells tractaments on la disminució de carboni orgànic ha estat més important i a l'inrevés. El comportament singular de les parcel·les FT en les mostres finals es pot relacionar amb els problemes de toxicitat d'aquest fang apuntades anteriorment.

Franco-Otero et al. (2012) tampoc troben diferències en CH-solubles al cap d'un any d'aplicació de fangs a dosis semblants i Marando (2013) detecta, en barreges sòl amb fangs tèrmics i compostats, també davallada en el contingut de CHE i poca variació en el cas del contingut en CHT després de 13 mesos de l'aplicació.

4.4.2.3 Efectes en les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa

a. Canvis en les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa

Els resultats d'activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa es complementen amb els valors relatius al carboni orgànic (Figures 4.19, 4.20 i 4.21) i amb els valors del quocient amb el contingut de N aminoacídic (Taula 4.27).

L'afegit de fang incrementa l'activitat del control 1,4 vegades respecte del sòl control franc i 2,0 vegades respecte del sòl control franc-arenós. Com a conseqüència, l'afegit de fang augmenta l'activitat GLC del control i en el cas del sòl franc-arenós ho fa significativament pels tres fangs. A l'inici hi ha un important efecte fang que a més és l'invers en els dos sòls; així l'efecte fang és en el sòl franc $T > D \geq C$ i en franc-arenós, $T \leq D \leq C$. Amb el temps, la variació de l'activitat GLC també és diferent en els dos sòls: en les parcel·les de sòl franc podem dir que ha augmentat i en les de sòl franc-arenós és més accentuada i ha disminuït. Als 395 dies, l'efecte fang general és $T \geq D > C$ en ambdós sòls, i ara són les tres parcel·les de sòl franc que han rebut fang les que passen a presentar una activitat GLC significativament superior al control.

El comportament de l'activitat específica GLC/C permet posar de manifest que i) l'efecte fang inicial en el sòl franc és atribuïble al diferent contingut en MO i en el sòl franc-arenós la MO de les parcel·les amb fang D és enzimàticament més activa que les de fang T, i ii) l'efecte fang final $T \geq D > C$ no és atribuïble al diferent contingut en MO de les parcel·les.

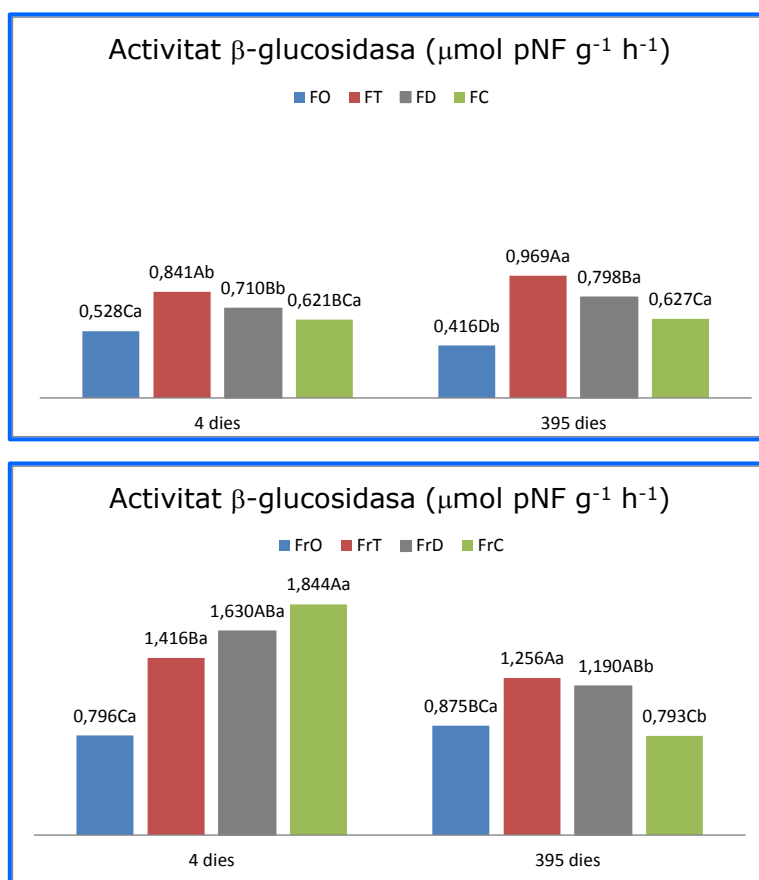


Figura 4.19 Valors d'activitat β -glucosidasa en les parcel·les amb fang i en els sòls control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.

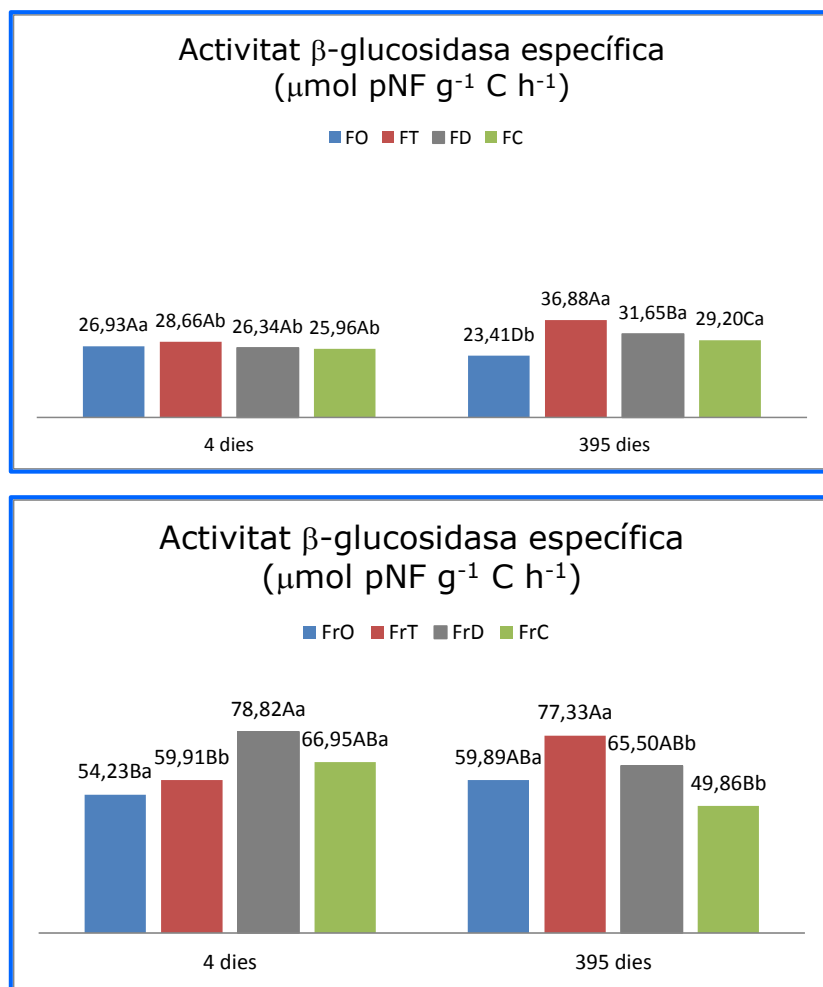


Figura 4.20 Valors d'activitat β -glucosidasa específica en les parcel·les amb fang i en els sòl control a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.

Al final de l'experiència, per l'**activitat GAL** l'efecte intensificador només existeix sobre el sòl franc i resulta ser l'activitat enzimàtica més incrementada, en promig 2,8 vegades superior al sòl control. Les parcel·les de sòl franc i fangs deshidratat i tèrmic són les que presenten l'activitat GAL més elevada, però això és degut al major contingut en MO ja que en calcular l'activitat específica GAL/C s'anul·len les diferències entre fangs.

Les parcel·les de sòl control franc-arenós presenten valors màxims de l'activitat GAL i les de fang tèrmic són les úniques en les quals els valors de GAL i GAL/C no són diferents a les del sòl control FrO. La proporció d'activitats GAL respecte de GLC és superior (9-11 %) en les mostres de sòl franc amb fang i en el sòl control franc-arenós respecte de la resta de parcel·les (5-8 %).

Al final de l'experiència i en general, els **quocients entre les activitats GLC i GAL i el N aminoacídic (GLC/N_{AA}, GAL/N_{AA})** dels sòls controls són superiors als de les barreges; destaquem, però, que per les parcel·les el sòl franc la relació GAL/N_{AA} no presenta diferències entre tractaments i les parcel·les FrT igualen GLC/N_{AA} a les del control. Les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa (valors absoluts, i relatius a carboni orgànic i N-aminoacídic) són més altes en les mostres de sòl franc-arenós que en les de sòl franc.

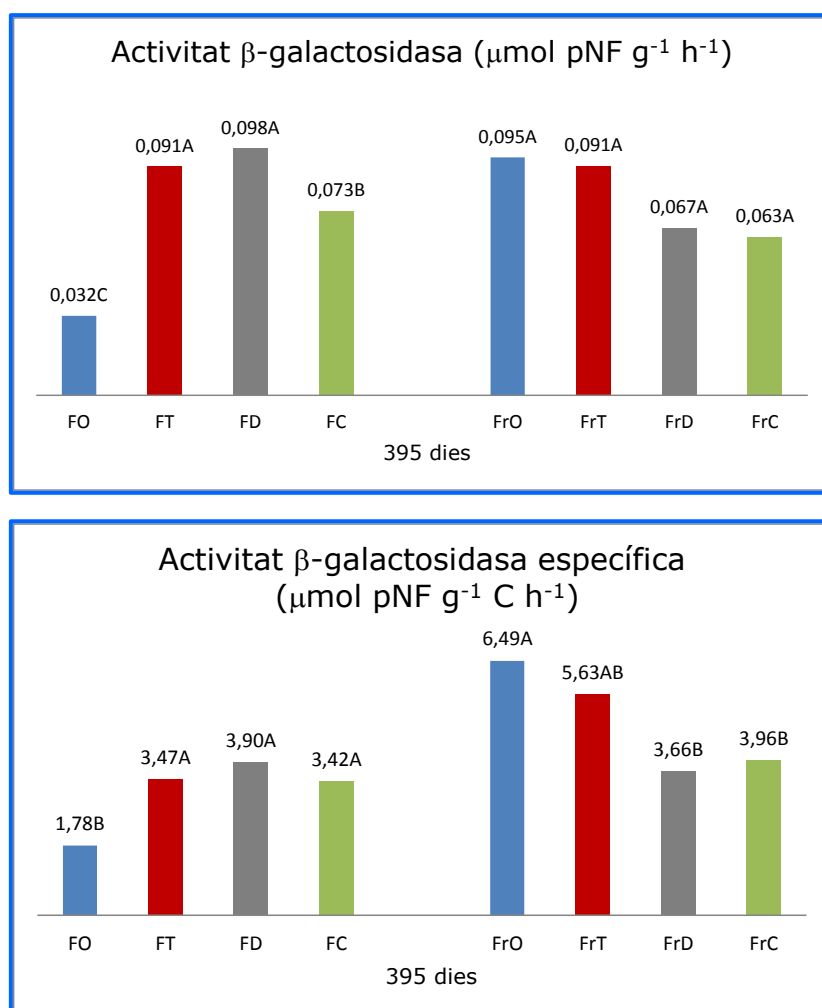


Figura 4.21 Valors d'activitat β -galactosidasa absoluta i específica en les parcel·les amb fang i en els sòl control al final de l'experiència. Per un mateix sòl, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments.

Taula 4.27. Valors del quocient entre les activitat β -glucosidasa i β -galactosidasa i el contingut en N aminoacídica en les parcel·les amb fang i en els sòl control al final de l'experiència.

Tractament	GLC/ N_{AA}	GAL/ N_{AA}	Tractament	GLC/ N_{AA}	GAL/ N_{AA}
	$\mu\text{mol pNF mg}^{-1} N_{AA} \text{h}^{-1}$			$\mu\text{mol pNF mg}^{-1} N_{AA} \text{h}^{-1}$	
FO	2,132A	0,162AB	FrO	6,375A	0,691A
FT	1,557BC	0,146B	FrT	6,103A	0,444B
FD	1,436C	0,177AB	FrD	4,157B	0,233B
FC	1,613B	0,189A	FrC	3,483B	0,277B

Dins d'un mateixa columna valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments.

La MO aportada augmenta **l'activitat GLC** dels sòls control i les diferències en els valors d'aquesta activitat a l'inici, en funció del tipus de fang i en els dos sòls, no són del tot atribuïbles a la diferent labilitat de la MO aportada i al conseqüent efecte activador de la biomassa. En el cas del sòl franc (on $T > D \geq C$) els valors de l'activitat GLC són més reflex de la quantitat de la MO aportada pels fangs que de la seva diferent labilitat ja que desapareix la gradació quan considerem l'activitat específica GLC/C. En el cas del sòl franc-arenós (on $T \leq D \leq C$) creiem que les diferències són més representatives de l'activitat GLC en els fangs purs ja que segueix la mateixa gradació. Suposem que l'aport de MO rica en aquesta activitat per part del fang a un sòl enzimàticament actiu, ha propiciat efecte suma de les activitats GLC sòl+fang que explicaria l'alt efecte intensificador inicial per sobre del detectat pel carboni orgànic. Corroboren aquesta hipòtesi que i) el tractament FrT, on el fang tèrmic quasi no aporta activitat β -glucosidasa, i el control Fr presenten inicialment la mateixa activitat específica; ii) l'activitat GLC de les parcel·les FrD i FrC disminueixen molt amb el temps, i iii) l'efecte estimulador dels fangs sobre les propietats microbiològiques del sòl franc-arenós no es detecta per la biomassa en el primer mostreig d'acord a Tarrasón et al. (2010).

En el sòl franc els valors finals de l'activitat GLC específica, significativament superiors als inicials, es pot relacionar amb l'augment de cobertura vegetal amb el temps ja que la vegetació té una influència positiva sobre les activitats enzimàtiques (Ros et al., 2003; Marando, 2013). Al final les diferències entre el sòl control franc i les parcel·les amb fang són encara un reflex de la diferent labilitat de la MO aportada inicial ($T > D \geq C$) i de la baixa dinàmica de transformació de la MO en aquest sòl. En el sòl franc-arenós hem de pensar que els canvis de l'activitat GLC són conseqüència de la pèrdua d'additivitat comentada anteriorment pels fangs deshidratat i compostat o sigui de la pèrdua de matèria orgànica enzimàticament activa aportada pel fang amb el temps. Al final hi ha poques diferències en l'activitat de la matèria orgànica de les diferents parcel·les i està d'acord amb la major dinàmica de transformació en aquest sol.

Les diferències en l'efecte intensificador final detectat sobre **l'activitat GAL** sembla indicar que no és una activitat pròpia del sòl franc, però si del sòl franc-arenós i que en aquest sòl és superior en les de fang tèrmic on pot haver estat més important l'efecte activador de la biomassa. Creiem que aquest resultat junt amb la major proporció GAL/GLC en el sòl franc-arenós pot estar relacionat amb i) la diferent microflora present en ambdós sòls, especialment amb l'abundància de fongs i llevats en el sòl franc-arenós, i ii) el tipus de vegetació ja que el sòl franc-arenós és la d'un sòl forestal.

b. Caracterització de l'activitat β -glucosidasa en les mostres finals: termoestabilitat i valor de K_M

D'acord als objectius, en aquest apartat presentem en els sòls control i en les barreges sòl-fang corresponents als 395 dies, els valors de termoresistència i K_M de l'activitat β -glucosidasa (Taula 4.28).

D'acord al test de t, valors de termoestabilitat superiors al 65 % no comporten diferències entre les activitats GLC del sòl i del sòl sotmès a 85°C. Globalment, les mostres amb sòl franc es poden considerar més termoestables que les que tenen sòl franc-arenós. Pel que fa als valors de K_M , són molt semblants en totes les mostres finals.

Taula 4.28. Valors de termoestabilitat i de K_M de l'activitat β -glucosidasa en les mostres finals (395 dies) de l'experiència en parcel·les.

Tractament	Termoestabilitat % (*)	K_M mM	Tractament	Termoestabilitat %	K_M mM
FO	79	3,5	FrO	65	2,4
FT	82	3,3	FrT	69	2,1
FD	76	2,3	FrD	71	2,0
FC	81	2,8	FrC	72	2,4

(*) Percentatge d'activitat de la mostra escalfada respecte de la mostra no escalfada. En cap cas l'activitat de la mostra escalfada és significativament diferent de l'activitat en la mostra no escalfada d'acord al test de t.

Els valors de termoestabilitat per la β -glucosidasa són similars als de la bibliografia Miller i Dick (1995) i semblen afavorits per la presència d'argila. Els valors de K_M per la β -glucosidasa són del l'ordre a les descrites per Eivazi i Tabatabai (1988) i indiquen que l'afinitat de l'enzim pel substrat és semblant en tots els tractaments i s'ha vist poc alterada per l'addició de fang. Els resultats de termoestabilitat i K_M no ens permeten deduir diferències, pel que fa a la caracterització de l'activitat GLC entre les mostres finals de les diferents parcel·les. Aquest resultat indica que el grau d'estabilització de l'enzim en les mostres finals que han rebut fang és molt semblant a la que existeix en el sòls controls.

4.4.2.4 Efectes en les activitats enzimàtiques proteolítica de BAA i ureàsica

Els resultats d'activitats enzimàtiques proteolítica de BAA i ureàsica de les Figures 4.22 i 4.24 es complementen amb els valors relatius al carboni orgànic (Figures 4.23 i 4.25) i amb els valors del quocient amb el contingut de N aminoacídic (Taula 4.29).

L'afegit de fang incrementa l'activitat proteolítica de BAA 1,4 vegades respecte d'ambdós sòls controls (Taula 4.26) i globalment podem dir que l'afegit de fang no hi ha diferència significativa per l'activitat proteolítica de BAA entre sòl control i sòl amb fang. A l'inici l'efecte fang en sòl franc és $T > D = C$ i en el franc-arenós $T = D < C$.

Amb el temps l'evolució de l'activitat BAA és diferent en els dos sòls: en les parcel·les de sòl franc augmenta significativament en tots els casos i en les de sòl franc-arenós disminueix significativament en les parcel·les amb fang. Als 395 dies es manté el mateix efecte fang descrit inicialment i només en les parcel·les de sòl franc que han rebut fang tèrmic, l'activitat és significativament superior al control.

El comportament de l'activitat específica BAA/C permet posar de manifest que i) l'efecte fang inicial en el sòl franc no és atribuïble al diferent aport en MO i en canvi en el sòl franc-arenós si que ho és ja que no hi ha diferència entre les activitats específiques, i ii) al final, l'activitat enzimàtica específica de les parcel·les que han rebut fang són iguals entre sí i inferiors a la dels controls, a excepció de les parcel·les de Fr-C que l'igualen.

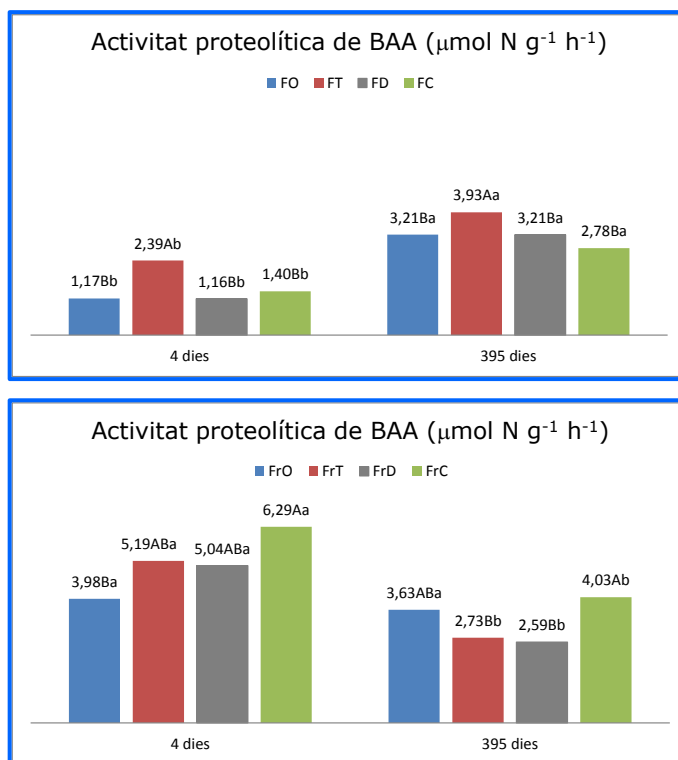


Figura 4.22 Valors d'activitat proteolítica BAA en les parcel·les amb fang i en els sòls controls a l'inici i al final de l'experiència.

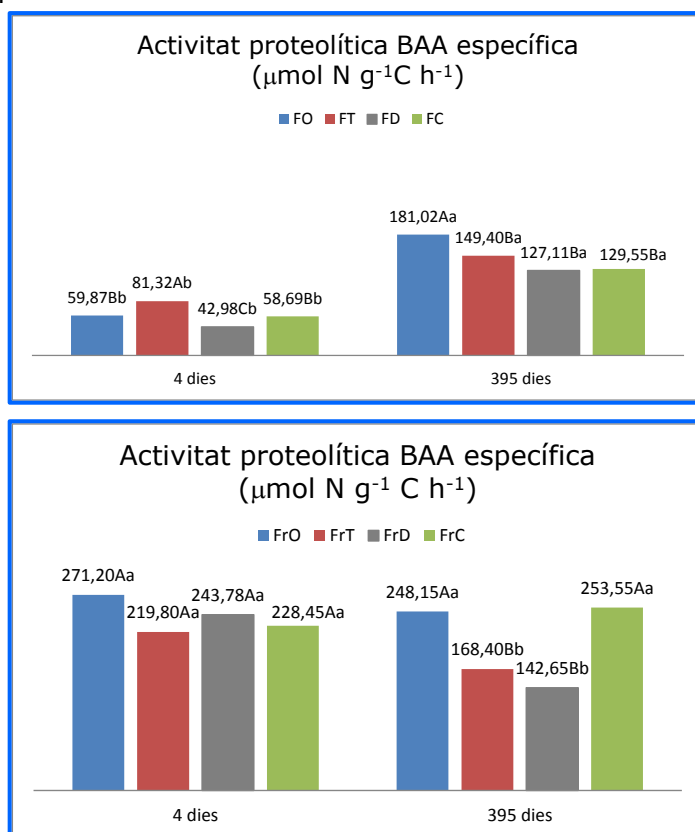


Figura 4.23 Valors d'activitat específica proteolítica BAA en les parcel·les amb fang i en els sòls controls a l'inici i al final de l'experiència.

Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.

L'afegit de fang incrementa en promig inicialment **l'activitat ureàsica** del control 1,4 vegades en les parcel·les de sòl franc i 1,9 vegades en les de franc-arenós (Taula 4.26). A l'inici l'efecte fang és més acusat en el sòl franc-arenós (on $T < D < C$) que per el sòl franc (on $T = D = C$). Amb el temps l'evolució de l'activitat ureàsica és diferent en els dos sòls: en les parcel·les de sòl franc destaca l'augment per les parcel·les amb fang tèrmic i en les de sòl franc-arenós disminueix significativament en totes les parcel·les. Als 395 dies l'efecte fang desapareix i només resta diferència significativa entre valors de les parcel·les de sòl franc que han rebut fang tèrmic que són significativament superiors al control.

El comportament de l'activitat específica UR/C permet posar de manifest que i) l'efecte fang inicial en el sòl franc-arenós no és atribuïble al diferent aport en MO ja que es mantenen les diferències entre les activitats específiques i en canvi en el sòl franc si que són degudes al contingut en MO; ii) al final, l'alta activitat enzimàtica específica de les parcel·les FT no és atribuïble al major contingut en MO i, iii) al final, la MO de les parcel·les FrC és més rica en activitat UR i significativament diferent de FrD.

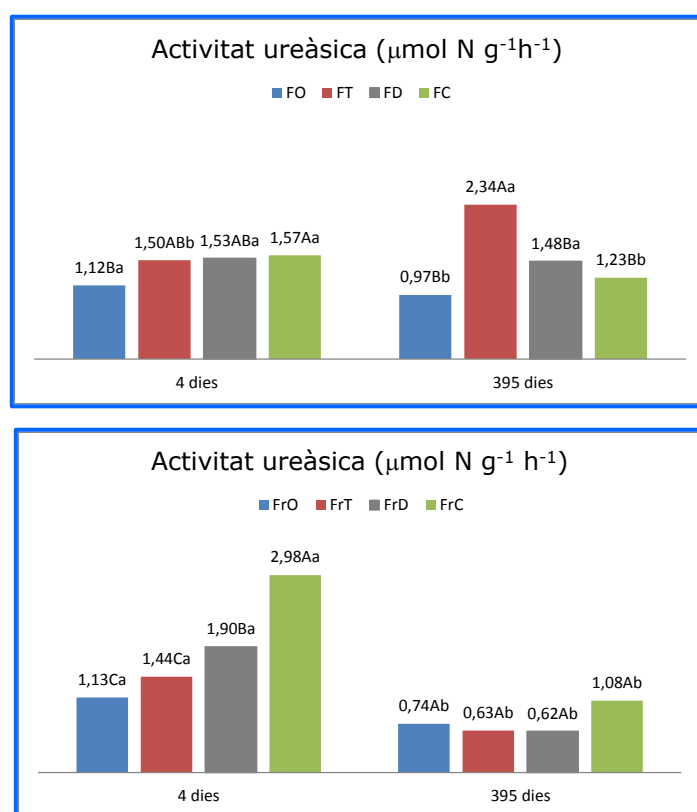


Figura 4.24 Valors d'activitat ureàsica en les parcel·les amb fang i en els sòls controls a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.

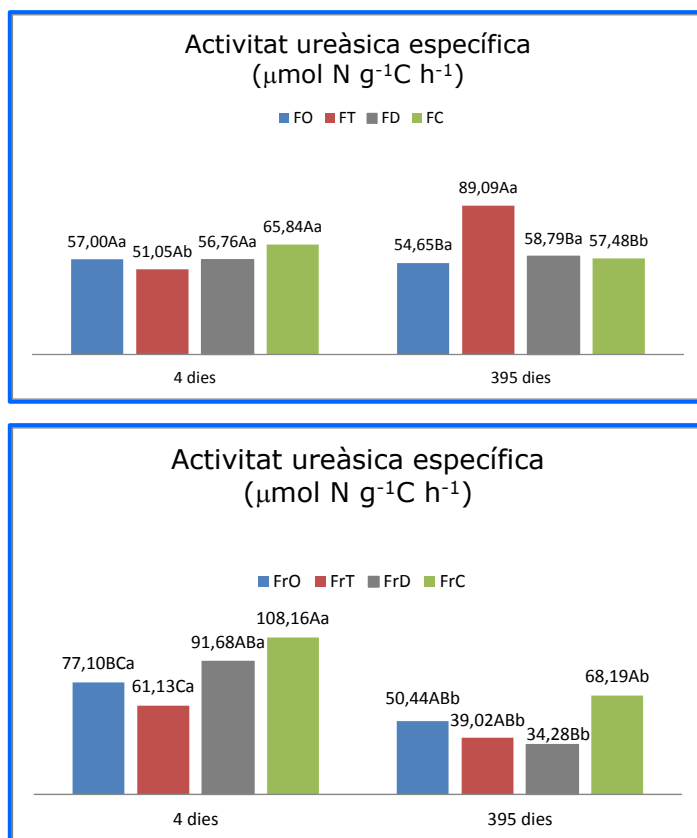


Figura 4.25 Valors d'activitat específica ureàsica en les parcel·les amb fang i en els sòls controls a l'inici i al final de l'experiència. Per un mateix temps, valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments. Per un mateix tractament, valors seguits de la mateixa lletra minúscula indica que no hi ha diferència significativa entre temps.

Als 395 dies, els **quocients entre les activitats BAA i UR i el N aminoacídic (BAA/N_{AA}, UR/N_{AA})** dels sòls controls són superiors als de les barreges, a excepció de UR/N_{AA} on les parcel·les amb fang tèrmic i compostat igualen els valors del sòl control franc-arenós.

Taula 4.29. Valors del quocient entre les activitat proteolítica de BAA i ureàsica i el contingut en N aminoacídic en les parcel·les amb fang i en els sòl control al final de l'experiència.

Tractament	BAA/N _{AA}	UR/N _{AA}	Tractament	BAA/N _{AA}	UR/N _{AA}
	µmol N mg ⁻¹ N _{AA} h ⁻¹			µmol N mg ⁻¹ N _{AA} h ⁻¹	
FO	16,49A	4,98A	FrO	26,42A	5,37A
FT	6,31B	3,76B	FrT	13,29BC	3,08AB
FD	5,77B	2,67C	FrD	9,05C	2,18B
FC	7,16B	3,18BC	FrC	17,71B	4,76A

Dins d'un mateixa columna valors seguits de la mateixa lletra majúscula indica que no hi ha diferència significativa entre tractaments.

L'activitat enzimàtica BAA queda augmentada a l'inici per l'aport de la MO dels fangs, però en aquest cas és menys important l'efecte intensificador (especialment sobre el sòl franc-arenós ja que l'activitat del sòl control és més alta) i desapareix amb el temps. Aquest comportament s'ha de relacionar amb què és una activitat poc correlacionada amb el contingut de carboni orgànic, com hem vist anteriorment.

L'efecte fang inicial és coherent amb les característiques dels posttractaments del fang deshidratat ja que provoquen un augment de la proporció de pèptids/proteïna en els fangs tèrmic i compostat (Mejía, 2005). La davallada detectada en els tractaments amb fang del sòl franc-arenós és coherent amb una disminució en la concentració de pèptids capaç d'activar la síntesi de l'enzim, procés que s'ha donat paral·lelament al de mineralització de la MO observat en aquestes parcel·les. En el cas del sòl franc, els valors finals d'activitat proteolítica de BAA significativament superiors als inicials per totes les parcel·les els podem relacionar amb què la mineralització ha estat menor i també amb la major incidència de la cobertura vegetal. Al final, només el tractament que ha sofert més mineralització de la matèria orgànica (FrC) i per tant el que presumiblement conté la més estabilitzada, és el que anivella l'activitat específica BAA/C amb la del sòl control.

L'activitat enzimàtica UR també queda augmentada des de l'inici per l'aport de la MO dels fangs indicant que en aquest cas no es dona inhibició d'aquesta activitat.

L'efecte fang inicial està poc relacionat amb la labilitat de la MO dels fangs i la conseqüent activació de la biomassa del sòl, sinó que fa pensar que sigui més conseqüència de l'aport de MO activa per part dels fangs, especialment del fang compostat (Moreno et al., 2007). Els valors finals en el cas del sòl franc-arenós indicarien que l'activitat minva amb el temps, però que al final, l'activitat específica UR/C segueix sent més elevada on suposadament l'aportació de MO enzimàticament activa ha estat més important. Contràriament, els valors finals en el cas del sòl franc indiquen que l'activitat UR s'ha desenvolupat amb el temps i especialment en el cas del fang tèrmic. Aquest fet podria estar relacionat amb el menor grau de transformació del N aminoacídic en aquestes parcel·les que comportaria l'acumulació de formes de N capaces d'estimular la síntesi d'aquest enzim. Aquest resultat és coincident amb els de Fernández et al. (2007b i 2009) i amb els de Franco-Otero et al. (2012).

Si comparem els nostres resultats de l'efecte final de l'aplicació de fangs sobre les activitats enzimàtiques BAA i UR en experiències similars troben resultats coincidents en el cas de Franco-Otero et al. (2012) i no coincidents en els cas de Ros et al. (2006) i Bonmatí et al. (2000). Aquestes discrepàncies s'expliquen si tenim en compte factors importants de l'assaig com és les successives aplicacions de fangs en el primer cas i la seva durada en el segon.

4.4.2.5 Efectes posttractaments fangs sobre les característiques finals de les mostres

Per a descriure comparativament les característiques bioquímiques de les mostres finals presentem els gràfics radials amb el conjunt de variables estandarditzades (Hoffman et al., 2003; Miralles et al., 2007). Les Figures 4.26 i 4.27 representen les variables absolutes i relatives al carboni orgànic i al N aminoacídic pels quatre tractaments i les variables relatives només per les parcel·les amb fang separatament per cadascun del dos sòls.

Parcel·les finals amb el sòl franc:

En el diagrama radial el control i els tres tractaments descriuen línies bastant concèntriques amb la gradació $FT > FD > FC > FO$, de forma que el tractament FT presenta pràcticament màxims per totes les variables; les variables segueixen un comportament general paral·lel al contingut en carboni orgànic, però destaca comparativament l'alta activitat enzimàtica BAA del sòl control i de les parcel·les pel tractament fang deshidratat el valor baix de CHE i alt per l'activitat GAL. Si traiem la influència del contingut en carboni orgànic i N-aminoacídic, i comparem les diferències qualitatives de la matèria orgànica dels sòls veiem que les parcel·les del sòl control es diferencien de les que han rebut fang especialment per la superior activitat BAA i per l'alta concentració de les altres activitats en la fracció proteica. Entre les parcel·les que han rebut fangs destaca les del fang tèrmic respecte dels altres dos fangs, el deshidratat i el compostat, que ara resulten més semblants. Les de fang tèrmic segueixen tenint major contingut relatiu de la majoria dels paràmetres (CHT i CHE i activitats específiques GLC, BAA i UR). Amb l'aplicació del fang deshidratat trobem que al final la matèria orgànica és la menys enzimàticament activa, excepte per l'activitat GAL. Les parcel·les que han rebut el fang compostat presenten la fracció proteica amb valors superiors d'activitat enzimàtica.

Parcel·les finals amb el sòl franc-arenós:

Contràriament en aquest cas el diagrama radial del control i els tres tractaments no descriuen línies concèntriques sinó que cada tipus de mostra orienta els màxims cap a unes variables determinades: el control FrO cap a les activitats BAA i GAL, les parcel·les de fang compostat FrC cap a les activitats BAA i UR, les parcel·les amb fang assecat tèrmicament FrT cap a les activitats GLC i GAL i les parcel·les amb fang deshidratat cap a carboni orgànic, N aminoacídic i carbohidrats (CHT i CHE) . Les diferències no es poden explicar pel diferent contingut en carboni orgànic i N aminoacídic de les mostres ja que en el gràfic de les variables relatives observem que es mantenen, tot i que (a diferència dels tractaments amb el sòl franc) es pot detectar que, qualitativament, la MO del control és semblant a les de fangs. Es confirma que les parcel·les que han rebut fang deshidratat tenen una matèria orgànica amb alt contingut en carbohidrats i amb baixa activitat enzimàtica, les de fang tèrmic contenen matèria orgànica on predominen les activitats enzimàtiques relacionades amb el cicle del C (GLC i GAL) i en les de fang compostat, al revés amb les relacionades amb el cicle del N (BAA i UR).

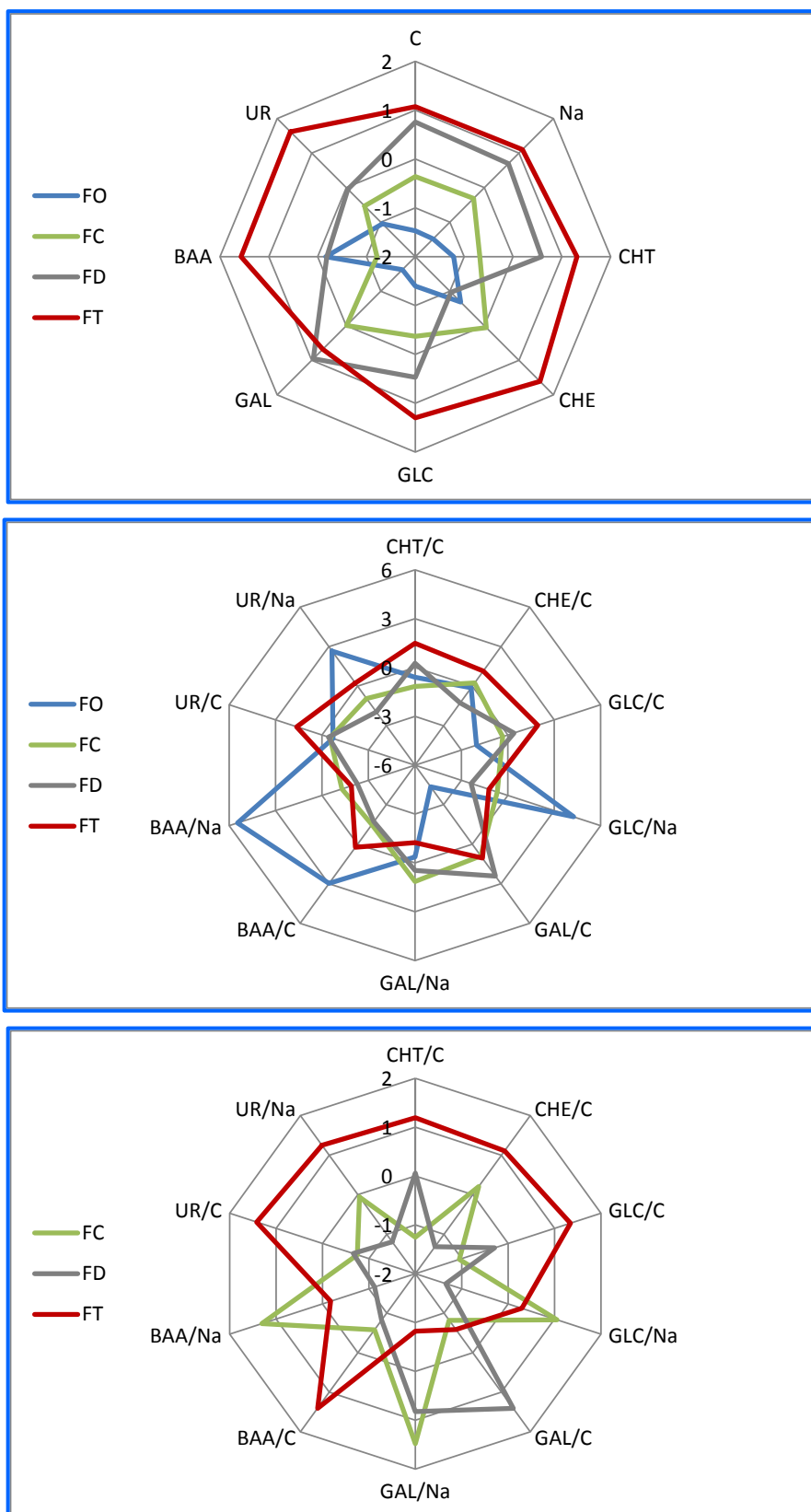


Figura 4.26 Representacions radials del conjunt de paràmetres bioquímics absoluts i relatius al carboni orgànic i al N aminoacídic de les mostres finals (a diferent escala quan s'inclou en sòl control) en les parcel·les de sòl franc.

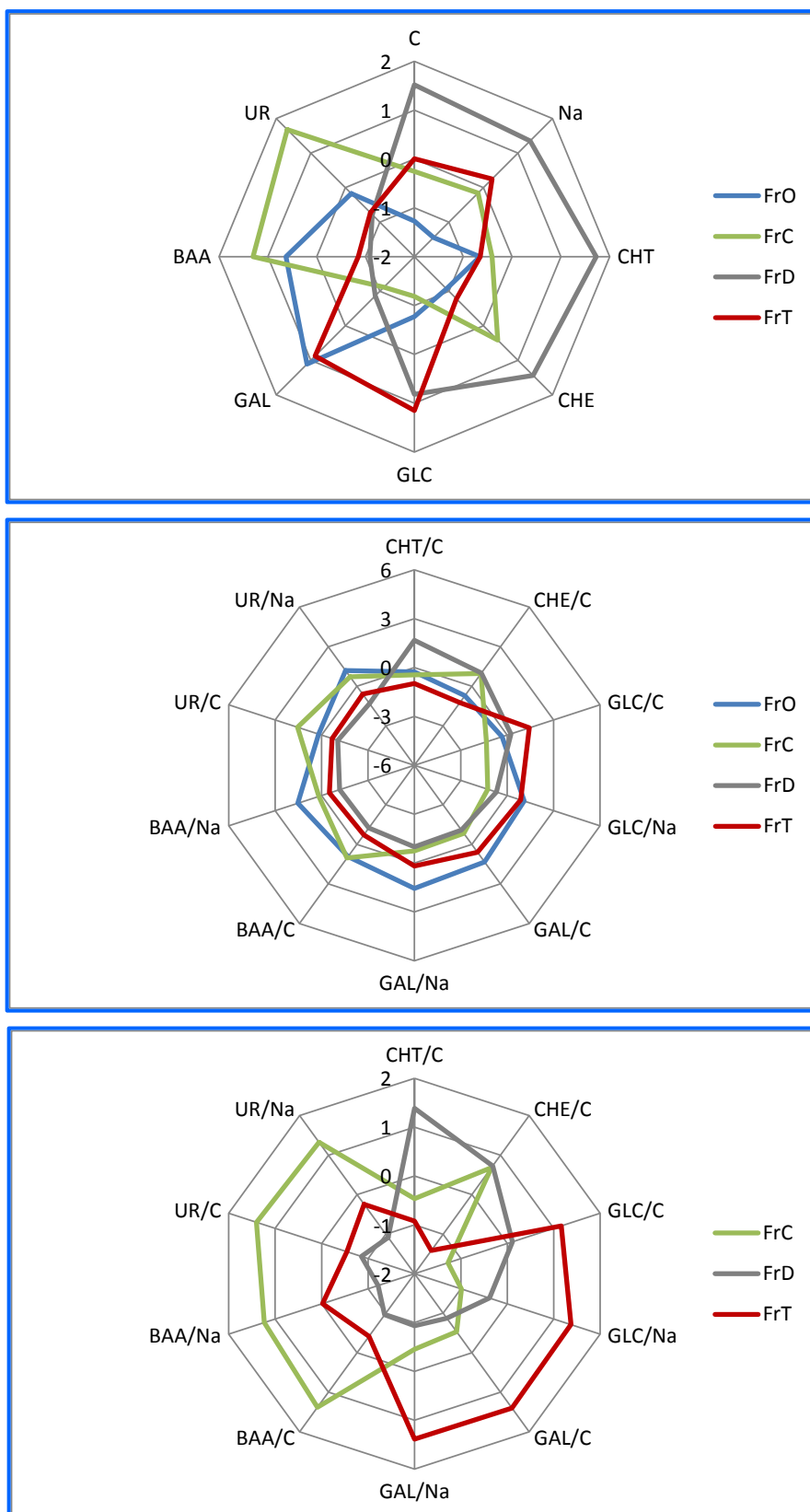


Figura 4.27 Representacions radials del conjunt de paràmetres bioquímics absoluts i relatius al carboni orgànic i al N aminoacídic de les mostres finals (a diferent escala quan s'inclou en sòl control) en les parcel·les de sòl franc-arenós.

Els diagrames radials permeten posar de manifest les diferències entre la MO dels dos sòls controls apuntada anteriorment. El lligam entre les activitats enzimàtiques GAL i BAA en el sòl franc-arenós es pot associar amb la més alta proporció de fongs i llevats i/o amb la vegetació característica del sòl forestal (Tarrasón et al., 2010) com hem detectat en l'estudi dels sòls naturals (capítol 3).

La MO de les parcel·les de sòl franc on s'ha aplicat fang presenten al final unes característiques bioquímiques atribuïbles a una matèria orgànica menys madura que la fa diferent de la del sòl control. Per una banda, presenten una menor activitat enzimàtica BAA que és característica de sòls amb MO estable (Bonmatí, 1998). Per altra banda, presenten proteïna menys enzimàticament activa com a conseqüència dels continguts superiors de N-aminoacídic. Respecte de les diferències entre els fangs aplicats trobem que comparativament i) la MO de les parcel·les on s'ha aplicat el fang tèrmic sembla ser més làbil i més enzimàticament activa que la dels fangs deshidratat i compostat, i ii) la MO de les parcel·les amb fang compostat presenta proteïna amb més activitat enzimàtica (excepte activitat UR).

Contràriament, la MO de les parcel·les de sòl franc-arenós on s'ha aplicat fang presenten, al final, unes característiques bioquímiques més semblants a les del sòl control. Aquest fet és coherent amb la major dinàmica de transformació detectada en aquest cas. El compostatge del fang deshidratat presenta característiques semblants a la del control pel que fa a les activitat relacionades amb el cicle del N (BAA i UR), però inferiors pel que fa al cicle del C (GLC i GAL). L'assecatge tèrmic té un comportament invers a l'anterior. Veiem doncs, que els dos posttractaments del fang deshidratat comporten, al final, una matèria orgànica menys làbil i més enzimàticament activa, però amb trets diferencials.

En ambdós casos constatem que els efectes sobre els paràmetres bioquímics al cap del temps estudiat són menys transitoris que els paràmetres microbiològiques pels quals Tarrasón (2010), en l'estudi de la mateixa experiència, no troba diferències.

4.4.3 Comparació entre els resultats de les experiències en lisímetres i en parcel·les i amb els resultats dels sòls naturals

Per comparar els resultats obtinguts a través de les **dues experiències en lisímetre i en parcel·les** tenim present, en primer lloc, que forçosament han de venir condicionats per les característiques del propi disseny experimental. A més a més, en el cas de l'experiència en lisímetres els resultats són conseqüència de partir d'uns sòls controls de característiques molt pobres i d'una alta dosi de fang aplicada; contràriament, en el cas de l'experiència en parcel·les partim d'uns sòls controls amb més matèria orgànica i la dosi de fang és de l'orde de 10 vegades inferior a l'anterior ja que s'apliquen com a esmena orgànica.

Resumim a continuació el contrast dels resultats en allò que es refereix al rang de valors obtingut pels diferents paràmetres, així com, als canvis detectats amb el temps.

Pel que fa als valors dels paràmetres controlats podem dir que:

- ✓ L'efecte intensificador inicial i final és més alt i alhora també més desigual entre paràmetres en l'experiència en lisímetres respecte de l'experiència en parcel·les.
- ✓ El rang de valors per carboni orgànic, carbohidrats totals i extractables és similar entre les mostres de les experiències en lisímetres i parcel·les tot i que s'assoleixen valors extrems més alts en les mostres de lisímetres.
- ✓ Les mitjanes i els rang de valors de les relacions CHE/CHT i CHE/C són superiors en les mostres en lisímetres respecte de l'experiència en parcel·les.
- ✓ Els valors de l'activitat enzimàtica β -glucosidasa, β -galactosidasa i especialment la proteolítica de BAA, total i específica, són inferiors en les mostres de lisímetres respecte de les mostres de les parcel·les.
- ✓ Contràriament el rang de valors de l'activitat ureàsica total i específica per a les mostres de lisímetres presenta un extrem superior més alt que les mostr de parcel·les.
- ✓ El rang de valors per el contingut en N aminoacídic és superior en les mostres en lisímetres respecte de l'experiència en parcel·les.
- ✓ Les característiques cinètiques de l'activitat β -glucosidasa en els sòls controls queden més alterades per l'aplicació de fang en el cas de l'experiència en lisímetres que en l'experiència en parcel·les.

Pel que fa als canvis en els valors dels paràmetres controlats podem dir que:

- ✓ El contingut en carboni orgànic disminueix amb el temps controlat en ambdues experiències i el rang de valors del percentatge de mineralització és similar a excepció del màxim detectat per les barreges S-C dels lisímetres.
- ✓ La disminució de la matèria orgànica aportada pels fangs en les dues experiències es veu afavorida per la textura més arenosa respecte de la més argilosa.
- ✓ El contingut en CHE disminueix amb el temps controlat només en l'experiència en parcel·les.
- ✓ El contingut en CHT presenta tendència a augmentar en els casos d'aplicació de fang en el sòl de textura argilosa per ambdues experiències.
- ✓ Les activitats enzimàtiques presenten una tendència general a disminuir amb en temps, a excepció de les mostres de parcel·les de sòl franc i de l'activitat UR en les mostres procedents de lisímetres on augmenten.
- ✓ En ambdues experiències per l'activitat proteolítica de BAA es perd l'efecte intensificador dels fang respecte del sòl control amb el temps controlat.

La dosi alta de fang aplicada en l'experiència en lisímetres condiciona els valors superiors del rang de valors trobats pel que fa al carboni orgànic, al N aminoacídic i als carbohidrats. Pel que fa als valors de les activitats enzimàtiques és important el tenir en compte l'activitat de partida dels sòls controls que és molt baixa en la experiència en lisímetres. Respecte de les diferències entre els valors inicials i finals podem dir que venen marcades per la presència de vegetació en el cas de l'experimentació en parcel·les. A més a més, hem de tenir present que l'especial dinàmica de l'activitat ureàsica en les mostres dels lisímetres, que semblaria ser una activitat enzimàtica desenvolupada durant la incubació en algunes barreges, pot estar relacionada amb els condicionants físics de les barreges, com hem explicat anteriorment. En ambdues experiències es posa de manifest la influència de l'argila en la protecció dels carbohidrats i en la minva del procés de mineralització.

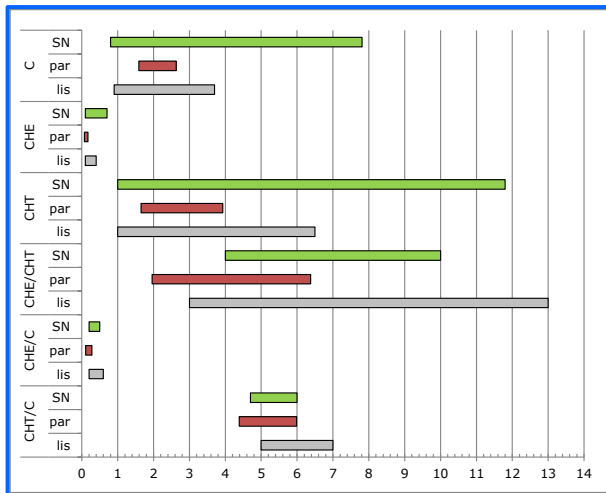
Pel que fa a la comparació de **les dues experiències d'aplicació de fangs amb l'estudi dels sòls naturals** presentem la Figura 4.28 que conté els rangs de valors pels diferents paràmetres bioquímics estudiats, tant els directes com els relatius a carboni.

La comparació dels rangs de valors entre les parcel·les on s'han aplicat fangs després de 395 dies i els sòls naturals venen condicionats pel nivell de matèria orgànica, i així, les parcel·les s'han de situar en el rang baix de contingut de carboni orgànic dels sòls naturals estudiats. Com a conseqüència, també es situen en el rang baix els valors de CHE i CHT i de les activitats GLC, GAL i UR encara que, considerant els valors relatius a carboni, els rangs són molt més semblants i per l'activitat GLC/C les parcel·les superen l'extrem superior del rang de sòls naturals.

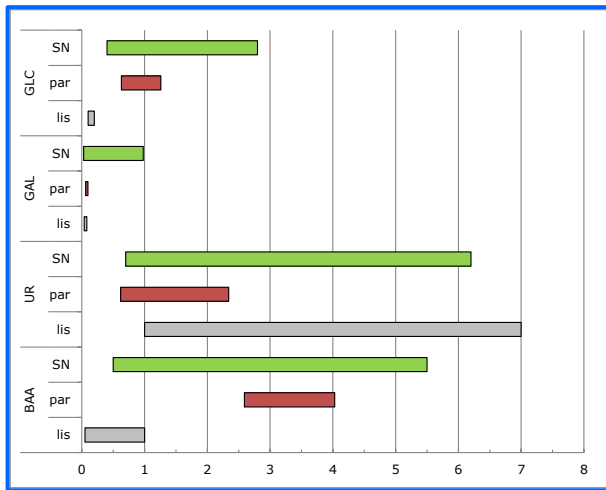
Aquest comportament general no es compleix per l'activitat enzimàtica proteolítica de BAA on els valors per les parcel·les amb fang es situen a la part alta dels rang de valors per sòls naturals i el superen en el cas de l'activitat específica. Aquest comportament creiem que és conseqüència de i) l'alta activitat proteolítica de BAA en els sòls controls de l'experiència en parcel·les, especialment del sòl franc-arenós, i ii) aquests nivells alts d'activitat proteolítica de BAA en les mostres de les parcel·les es detecten per un nivell de MO més baix si ho comparem amb el dels sòls naturals. Aquest resultat posa de manifest la manca de correlació entre el nivell de MO i aquesta activitat enzimàtica, que ja hem descrit d'acord amb la bibliografia.

Pel que fa a la **correspondència entre les parcel·les i els sòls naturals** cal tenir en compte que partim de sòls controls Fo i FrO que tenen característiques similars als descrits per VC i IG (capítol 3) (encara que el sòl franc-arenós no seria tant assimilable a aquests dos sòls naturals donada la textura i l'absència de carbonats); els dos controls presenten, però, un nivell més baix de matèria orgànica que els sòls naturals VC i IG i també de CHT, CHE, GLC GAL i UR. Contràriament, l'activitat BAA és més alta, especialment pel sòl control franc-arenós (que s'assimilaria més al sòl natural LT). Considerant les activitats específiques aquestes sí que es corresponen més amb les d'aquests dos sòls VC i IG, però sobresurten els valors de les activitats GLC/C i BAA/C del sòl control franc-arenós.

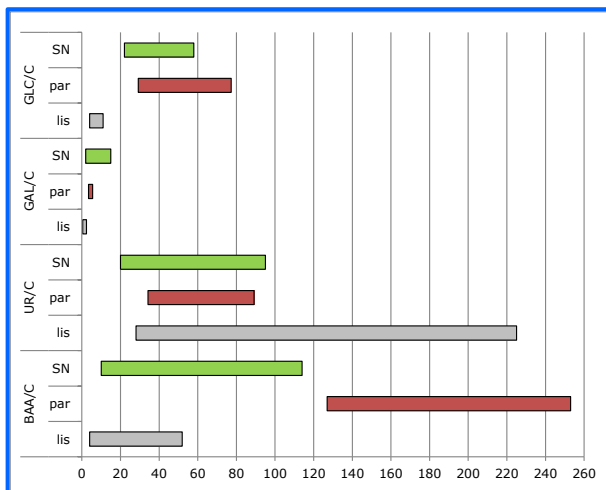
Les parcel·les amb fang als 395 dies també presenten valors d'activitat BAA total i específica superiors als sòls naturals comparats VC i IG. Les parcel·les amb fang tèrmic són les que més incrementen els valors de totes les variables (sis per les de sòl F-fang i tres per a les de sòl Fr-fang) de forma que arriben a ser més similars a aquests dos sòls naturals de referència VC i IG.



C i CHE/CHT (g 100 g⁻¹)
 CHE i CHT (mg glucosa g⁻¹)
 CHE/C i CHT/C (g C-glucosa 100 g⁻¹ C)



GLC i GAL (μmol pNFg⁻¹ h⁻¹)
 UR i BAA (μmol N g⁻¹ h⁻¹)



GLC/C i GAL/C (μmol pNF g⁻¹ C h⁻¹)
 UR/C i BAA/C (μmol N g⁻¹ C h⁻¹)

Figura 4.28 Esquema comparatiu dels rangs de valors dels diferents paràmetres en els sòls naturals (SN) (excepte PN), les mostres sòl-fang finals (267 dies) de l'experiència en lisímetres (lis) i les mostres finals sòl-fang (295 dies) de l'experiència en parcel·les (par).

4.5 CONCLUSIONS

A partir de l'experiència en lisímetres:

- I. L'aport de fangs augmenta, al cap de 267 dies, el contingut en carboni orgànic i N aminoacídic dels dos sòls control i la matèria orgànica és proporcionalment més rica en carbohidrats totals.
- II. L'afegit de fangs augmenta, al cap de 267 dies, les activitats enzimàtiques β -glucosidasa, β -galactosidasa, proteolítica de BAA i ureàsica respecte als dos sòls control. Podem afirmar, doncs, que l'aport dels fangs augmenta la potencialitat dels sòls control d'obtenir formes assimilables de C i de N.
- III. L'afegit de fangs augmenta, al cap de 267 dies, l'activitat ureàsica de la matèria orgànica i de la fracció proteica dels sòls control. Podem afirmar doncs que l'aport dels fangs contribueix a la potencialitat de la matèria orgànica d'obtenir N assimilable a partir de compostos amida no proteics.
- IV. Al cap de 267 dies, els valors superiors dels paràmetres bioquímics estudiats corresponen als sòls amb fang assecat tèrmicament i els inferiors als sòls amb fang compostat.
- V. Al cap de 267 dies, les característiques bioquímiques dels sòls amb fang deshidratat són el més dependents de la dosi de fang aplicada, especialment en el cas d'aplicació al sòl argilós.

A partir de l'experiència en parcel·les:

- I. Al cap de 395 dies, l'aplicació dels fangs ha incrementat el contingut en carboni orgànic i N aminoacídic del sòl control franc.
- II. Al cap de 395 dies, en el cas del sòl franc-arenós, l'aplicació dels fangs ha incrementat el contingut en N aminoacídic del sòl control i només l'aplicació del fang deshidratat ha incrementat el contingut en carboni orgànic del sòl control i la matèria orgànica s'ha enriquit en carbohidrats totals.
- III. Al cap de 395 dies, l'aplicació dels fangs ha augmentat les activitats enzimàtiques β -glucosidasa, β -galactosidasa respecte al sòl control franc i també l'activitat β -glucosidasa, β -galactosidasa de la matèria orgànica. Podem afirmar, doncs, que l'aport de fangs ha augmentat la capacitat de la matèria orgànica del sòl franc d'hidrolitzar carbohidrats.
- IV. Al cap de 395 dies, l'aplicació de fang assecat tèrmicament ha augmentat l'activitat enzimàtica ureàsica respecte al sòl control franc i també l'activitat ureàsica de la matèria orgànica. Podem afirmar doncs que l'aport de fang assecat tèrmicament ha augmentat la potencialitat de la matèria orgànica del sòl franc d'obtenir N assimilable a partir de compostos amida no proteics.
- V. Al cap de 395 dies, l'activitat proteolítica de BAA de la matèria orgànica de les parcel·les amb fang d'ambdós sòls és inferior a la dels sòls controls a excepció del sòl franc en les que s'ha aplicat fang compostat.
- VI. Les mostres finals de les parcel·les amb fangs presenten valors de carboni orgànic, carbohidrats totals, carbohidrats extractables i de les activitats β -glucosidasa, β -galactosidasa i ureàsica que se situen a la banda baixa del rang de valors de l'estudi dels sòls naturals i valors de l'activitat enzimàtica BAA que les situa a la banda alta.

A partir d'ambdues experiències:

- I. El contingut en N aminoacídic en les mostres finals és l'únic paràmetre que presenta capacitat per diferenciar significativament els diferents tractaments assajats per cadascun dels dos sòls.
- II. La disminució de la matèria orgànica amb el temps és més acusada amb l'aplicació del fang compostat respecte dels fangs deshidratat i assecat tèrmicament.
- III. Quan els fangs s'apliquen en un sòl tipus argilós es detecta un fre en l'evolució esperada de la matèria orgànica, que és menys acusat en el cas del fang compostat que amb el fang assecat tèrmicament.
- IV. Els valors finals de N aminoacídic en els sòls on s'ha aplicat fang posttractat són significativament diferents al del fang deshidratat; en el cas del fang assecat tèrmicament els valors són significativament superiors als del fang deshidratat i en el cas del fang compostat són significativament inferiors.
- V. El valor de la K_M de l'enzim β -glucosidasa en les mostres finals és semblant i no acusa l'aplicació de fang.
- VI. L'aport de fang deshidratat sotmès a posttractament afecta a les característiques finals de les mostres de forma que i) l'assecatge tèrmic proporciona un fang amb més matèria orgànica làbil que accelera el procés inicial de descomposició de la matèria orgànica, i ii) el compostatge proporciona un fang amb una matèria orgànica no tan làbil, però amb més activitat enzimàtica, la qual cosa es tradueix amb el temps en què la matèria orgànica restant sigui més estable.

Metodologia Analítica Associada als Paràmetres Estudiats



5 METODOLOGIA ANALÍTICA ASSOCIADA ALS PARÀMETRES ESTUDIATS

5.1 INTRODUCCIÓ

Com a introducció d'aquest capítol presentem un repàs bibliogràfic sobre els mètodes analítics dels paràmetres en sòls estudiats en la tesi: carboni orgànic, nitrogen aminoacídic, carbohidrats totals i extractables i les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa.

5.1.1 Mètodes de determinació de Carboni orgànic

En aquest apartat fem bàsicament referència a la metodologia analítica del carboni orgànic en mostres de sòls, però incloem també al final aspectes sobre la determinació en mostres de residus orgànics.

Els mètodes de quantificació del contingut en carboni orgànic del sòl han estat àmpliament estudiats i recentment han pres rellevància amb els estudis sobre el paper dels sòls en el canvi climàtic (Gehl i Rice, 2007). Alhora, però, aquests estudis han posat de manifest mancances metodològiques i també necessitats d'estandardització de molts aspectes analítics que dificulten l'obtenció de dades fiables sobre els valors de carboni dels sòls. Entre aquests aspectes trobem: les tècniques d'anàlisi, el mostreig, la quantificació del carboni de la biomassa microbiana, els valors de densitat aparent, l'escala de valors i la confecció de bases de dades (Kimble et al., 2001; Camps-Arbestain et al., 2004; Macias et al., 2004; Alcañiz et al., 2005).

Tal com hem avançat en la introducció el carboni orgànic es pot estimar d'acord amb els procediments de C-total o bé per oxidació (C-oxidable). Els procediments de C-total analitzen totes les formes presents de C i comporten la seva conversió a CO_2 mitjançant la combustió humida o seca i la posterior quantificació del CO_2 . La determinació de C orgànic per oxidació (C-oxidable) es basa en la mesura de la quantitat d'agent oxidant que ha reaccionat. Els procediments de C-total analitzen totes les formes presents de C, per tant s'ha de tenir en compte el C inorgànic, i les d'oxidació, recuperen una proporció variable de C elemental i alguns procediments quantitats variables del C orgànic contingut en l'humus, depenent de les condicions en que es porti a terme la reacció (Nelson i Sommers, 1982). En aquest apartat descrivim les característiques de les dues vies, C-total i C-oxidable. Hem de tenir en compte que hi ha una important característica de tipus operatiu que les diferencia de partida: per l'anàlisi del C-total es necessita d'un equipament instrumental i per tant té un cost associat important i en canvi pel C-oxidable no i per tant és més ràpid i simple i per això és el més tradicionalment utilitzat. Com a contrapartida, cal esmentar que consumeix compostos de Cr (VI), reactiu nociu i contaminant. Al final d'aquest apartat citem també les noves tecnologies associades a la mesura de les formes de C en sòls.

5.1.1.1 Carboni total

Per a la determinació del contingut en Carboni total en sòls es poden seguir dues vies que són la via seca i la via humida.

- La via seca es basa en la combustió de la mostra en un forn a altes temperatures que provoca l'oxidació del carboni i la descomposició tèrmica dels carbonats. Les condicions han d'assegurar la conversió quantitativa de

totes les formes de C a CO₂. Existeixen múltiples metodologies atenent a: tipus de forn emprat, temperatura, necessitat de catalitzadors, automatisme dels aparells i sistema de quantificació del CO₂. La mostra de sòl s'escalfa en un forn per diferents sistemes i a una temperatura entre 1000°C-1500°C. És habitual afegir catalitzadors (com CuO, Fe, Sn o V₂O₅) per aconseguir la combustió completa de les formes de C, i també després del forn, per assegurar la conversió completa del CO a CO₂. Cal tenir present que quan la T és baixa la combustió pot no ser del tot satisfactòria per sòls amb carbonats alcalinoterris ja que aquests minerals desprenen CO₂ de forma lenta (950°C); en canvi en els d'alta temperatura la conversió dels carbonats és ràpida i quantitativa. Les possibilitats de determinació del CO₂ alliberat són: l'adsorció i posterior mesura gravimètrica o bé per volumetria de neutralització, la lectura manomètrica i la quantificació instrumental conductimètrica, per IR i per cromatografia de gasos (C.G). En els aparells d'anàlisi elemental es determina el C simultàniament al N i H. Com a característiques generals els procediments d'anàlisi de Carboni-total per via seca requereixen una trituració molt fina de la mostra de sòl (0,100-0,150 mm) per obtenir resultat reproduïbles, es treballa amb un pes de mostra d'entre 0,5-1 g que es manipula acuradament amb pinces i són importants les condicions de neteja extrema del material i del laboratori.

- El procediment d'anàlisi del C-total per via humida es conegut com el mètode de Allison i es fa amb un muntatge de laboratori que permet la digestió de la mostra amb una barreja de reactius àcids i oxidants (H₂SO₄ i H₃PO₄ i K₂Cr₂O₇) a la T de 210°C i la mesura del volum de CO₂ total després.

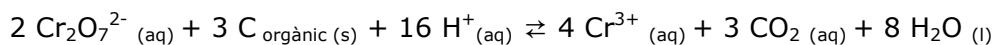
Si la mostra de sòl no conté C inorgànic (CI) el resultat de l'anàlisi de C-total correspondrà al contingut en C orgànic. Si les mostres tenen carbonats s'ha de fer, amb una altra mostra, l'anàlisi de C inorgànic i trobar el C orgànic per diferència; aquest sistema té, però, l'inconvenient dels errors inherents a la determinació per diferència. Alternativament també és pot fer únicament la determinació de C-total, però amb la mostra prèviament pretractada amb àcid (H₂SO₃ o bé amb HPO₃ primer a T ambient i després escalfant) per eliminar els carbonats. En ambdós casos s'ha de tenir present que en les mostres amb dolomita el tractament àcid suposa una més lenta i difícil transformació completa de CI a CO₂. Per Bisutti et al. (2004) la presència del CI és un dels principals inconvenients de la determinació del C orgànic per l'atac poc quantitatiu dels carbonats que provoca gran variabilitat en els resultats, i per les possibles pèrdues de formes orgàniques solubles i/o volàtils. Recentment han aparegut estudis sobre una altra opció per determinar les dues formes de carboni (C orgànic i C inorgànic) en sòls simultàniament a través de la instrumentació associada a la tècnica anomenada SRDTC (Single-Run Dual Temperature Combustion) que permet el treball a dues temperatures (Bisutti et al., 2007).

A nivell de **normatives**, la determinació de Carboni-total en mostres de sòls segueix la via seca i està descrita a la norma UNE 77321:2003 (*Norma española de calidad de suelo determinación de carbono orgánico y carbono total mediante combustión seca (anàlisis elemental)*) (que és equivalent a la ISO10694:1995 *Soil Quality-Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)*). D'acord amb aquesta norma la combustió es fa a una T_≥900°C, en corrent de gas que contingui O₂ i la quantificació del CO₂ format queda subjecta al tipus d'instrumental. Contempla

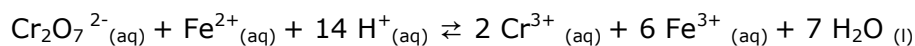
dues variants per obtenir el valor de C orgànic: per diferència amb el valor de CI (UNE 77317:2001 *Calidad de suelo. Determinación del contenido en carbonato. Método volumétrico*, equivalent a la ISO 10693:1995) i per l'eliminació del CI per pretractament amb àcid (concretament HCl 4 M durant 4 hores a temperatura ambient i 16 hores a 60-70°C). També contempla l'opció de determinació per separat del C orgànic i CI, a diferent temperatura, que permeten certs aparells. El pretractament de mostres de sòl s'especifica a la norma UNE 77303:1997 (*Calidad de suelo. Pretratamiento de muestras para l'anàlisi físico-químico*) equivalent a la ISO 11464:1994 (*Soil quality. Pre-treatment of samples for physico-chemical analysis*). S'utilitza la fracció de partícules <2 mm de mostres assecades a l'aire i s'analitza una submostra representativa que s'hagi triturat i tamisat fins a <0,250 mm. Es proposen com a patrons per a la calibració: acetanilida (C₈H₉NO, atropina C₁₇H₂₃NO₃, CaCO₃, grafit o hidrogen ftalat de potassi (C₈H₅KO₄). La repetibilitat és del 1-5 % per valors alts de C orgànic i més alta per C-total que per C orgànic (arriba al 10 % per sòls amb baix contingut, valor C≈0,25 %).

5.1.1.2 Carboni oxidable

La via de determinació directa del carboni orgànic per oxidació es basa en la reacció química quantitativa entre el reactiu oxidant Cr (VI) (generalment, dicromat de potassi) i el carboni dels compostos orgànics, en medi àcid, amb posterior determinació del reactiu dicromat sobrant per volumetria (de retrocés) o per colorimetria. Pel procés quantitatiu es considera que el número d'oxidació mitjà del C dels compostos orgànics del sòl val zero (es considera que es comporta com un hidrat de carboni O/H=2) i la reacció d'oxidació-reducció (forma iònica) corresponent al tractament de la mostra és:



Respecte del sistema de quantificació, la determinació volumètrica es basa en la següent reacció redox de l'excés de l'oxidant amb sal de Fe²⁺ (habitualment sal de Mhor, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O):



Com a indicador primer es va proposar la difenilamina (E⁰=0,76 V) junt amb H₃PO₄, NaF o HF per millorar el punt final. També s'utilitza la o-fenantrolina (E⁰=1,06 V) amb o sense H₃PO₄ pel valor més alt i més adequat de potencial i N-fenil antranílic (E⁰=1,08 V). El mètode de quantificació colorimètrica, si bé requereix una filtració o centrifugació prèvia, es pot portar a terme amb un autoanalitzador. Es basa en la mesura de l'Absorbància a 600 nm del color verd degut a la concentració de l'ió Cr³⁺(aq) present i la calibració es fa amb patrons de glucosa.

L'aspecte més controvertit i més estudiat d'aquest mètode és el procés oxidatiu de la MO en el tractament de la mostra, donada la variabilitat de factors experimentals que condicionen el grau d'oxidació del carboni orgànic del sòl i les possibles interferències

de compostos amb caràcter oxidant o reductor que poden estar presents en les mostres de sòl. Cal també tenir en compte els problemes derivats de l'assumpció d'un grau d'oxidació en mitjana del C en la MO (Nelson i Sommers, 1982, Jackson, 1982; Saña, 1985). Com a solució oxidant s'utilitza l'anomenada barreja sulfocròmica de dicromat potàssic i àcid sulfúric (les concentracions més habituals són 0,16-0,35 N en $K_2Cr_2O_7$ i 15-25 N en H_2SO_4) i també pot ser d'àcid cròmic. El mètode original de Schollenberger del 1927 ha derivat en múltiples variants posteriors, especialment en les condicions de la digestió com resumeix la Taula 5.1.

Taula 5.1. Principals característiques de les diferents mètodes d'anàlisi del carboni oxidable en sòls (elaboració pròpia a partir de Nelson i Sommers, 1982).

Referència del mètode	Concentració (N) dels reactius en la digestió			Condicions experimentals del tractament de mostra
	$K_2Cr_2O_7$	H_2SO_4	H_3PO_4	
Schollenberger (1927)	0,350	36,0		175°C (poc temps)
Tyurin (1931)	0,400	18,0		155-170°C
Walkley-Black (1934)	0,330	25,0		30 min sense escalfar (T del calor dilució=120°C)
Anne (1945)	0,160	22,0		T d'ebullició (depèn de la concentració de l'àcid) i temps entre 20 min-2 hores
Tinsley (1950)	0,400	15,0	9,0	
Mebius (1960)	0,267	20,0		
Kalembasa-Jenkinson (1973)	0,200	18,0	5,0	
Nelson-Sommers (1975)	0,400	21,6		30 min a 150°C amb reflux
Mebius modificat (1975)	0,200	21,6		30 min a 150°C amb reflux
Yeomans (1988) <i>Mebius modificat</i>	0,200	21,6		30 min a 150°C en tubs Kjeldhal

Aquestes variants metodològiques, posteriors al mètode original, demostraren la importància del temps i temperatura, a la que es manté en contacte el sòl i la barreja sulfocròmica, en l'extensió de l'oxidació i per tant en el resultat i es va posar de manifest la necessitat d'estandarditzar aquestes condicions. Walkley i Black (1934) recomanaren no fer aportació de calor externa, considerant que la temperatura a la que s'arriba pel propi escalfament de la mostra, degut a la calor de dilució de l'àcid sulfúric, podria ser suficient per oxidar el C orgànic. Posteriors treballs demostraren que es necessita aplicar un cert temps i temperatura d'escalfament per aconseguir l'oxidació complerta (tenint com a limitació que el dicromat es descomposa per sobre 150°C). Actualment es considera que existeixen dues variants metodològiques importants: la que realitza la reacció redox sense aportació de calor i per tant no assegura que tot el C orgànic present en el sòl sigui oxidat, i la que aplica condicions més dràstiques amb calor externa i on totes les formes de C orgànic són oxidades. En la primera de les opcions (coneguda com a Walkley-Black) es necessita d'un factor de

correcció anomenat factor de recuperació que converteix el valor experimental de C oxidable en C orgànic; en la segona no necessitem aplicar cap factor de recuperació ja que existeix correspondència entre el C-oxidable i els valors de C-total per via seca o bé humida (Nelson i Sommers, 1982).

El valor del factor de recuperació derivat de l'aplicació del mètode Walkley-Black ha estat també objecte de molts estudis. En els primers treballs experimentals del mètode (Walkley i Black, 1934; Walkley, 1935) es va trobar com a mitjana, per un grup de 20 sòls, una recuperació del 76 %-77 % i aquests autors van proposar com a valor de factor de recuperació el de 1,32-1,30. Estudis posteriors aportaren resultats molt variables pel grau d'oxidació del carboni en aquestes condicions. D'acord als resultats de diferents treballs (Taula 5.2) per un sòl individual el factor de recuperació pot oscil·lar entre 1,09-2,27 i en mitjana, per un grup de sòls, entre 1,19-1,33.

Taula 5.2. Valors pel factor de recuperació del C orgànic seguint mètode de Walkley-Black (Nelson i Sommers, 1982).

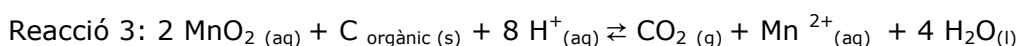
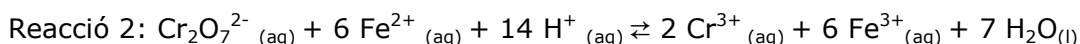
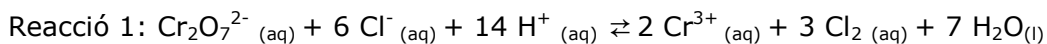
Referència del mètode	Número de sòls estudiats	Recuperació de C orgànic (%)		Factor de recuperació
		interval	mitjana	
Allison (1960)		63-86		1,16-1,59
Bremner-Jenkinson (1960)	15	57-92	84	1,19
Richter (1973)	12	79-87	83	1,20
Nelson-Sommers (1975)	10	44-88	79	1,27
Kalembasa-Jenkinson (1973)	22	46-80	77	1,30
Orphanos (1973)	12	69-79	75	1,33

Actualment en els mètodes que apliquen condicions mínimes d'escalfament, que tenen l'avantatge de ser un mètode ràpid i simple, s'assumeix que comporten una oxidació variable i que el factor de correcció mitjà, encara que no sigui molt fiable per un sòl individual, és vàlid per un conjunt de sòls ja que es correspon amb els valors obtinguts per altres vies (C-total per via seca o via humida). Nelson i Sommers (1982) consideren que el factor de recuperació s'ha de buscar per a cada grup de sòls, però quan no es coneix, s'utilitza el valor de 1,30 ($f=1,298$ que significa un 77 % de recuperació). Rosell et al. (2001) consideren que el factor més usual és el de 1,33 (*creiem que hauria de ser 1,32*) ja que aproximadament es recupera (sense escalfament) el 76 % del C orgànic total. També s'ha de tenir present que no es considera correcta la quantificació del C orgànic d'un sòl per via oxidació directa si és important la proporció de material molt carbonitzat. La recuperació del C elemental és baixa (del 2-11 % del C^0) si no s'escalfa la dissolució i els resultats, si es perllonga l'escalfament, són variables. En aquest sentit, la diferència entre el C-total i el C-oxidable es considera, en el treball de Macias et al. (2004) sobre el contingut en carboni en sòls de Galícia, com "black carbon" més la fracció de C orgànic recalitrant.

En la reacció d'oxidació del carboni s'ha de considerar la possible interferència dels reductors Cl^- , Fe^{2+} (i també Fe^0), Mn^{2+} i S^{2-} i dels òxids de manganès (IV) oxidants presents en les mostres de sòl (Nelson i Sommers, 1982; Jackson, 1982; Saña, 1985; Porta et al., 1986; Rosell et al., 2001; Macias et al., 2004). En el primer cas, les interferències comportaran un error positiu (reaccions 1 i 2) i per tant valors elevats

de C-oxidable; és en aquest sentit que, Macias et al. (2004) tenen en compte que el valor del factor de conversió de C-oxidable a C-total, a part de la variabilitat ja esmentada, també pot ser inferior a 1 ja que en realitat el que es determinen són les substàncies reductores del sòl.

La presència de clorurs s'evita si es renta el sòl o bé si precipita com a $\text{AgCl}_{(s)}$ afegint $\text{Ag}_2\text{SO}_{4(s)}$ en el reactiu de digestió. La concentració de Fe^{2+} en el sòl és molt baixa en un sòl ben airejat i disminueix quan s'asseca el sòl i passa a Fe^{3+} . En el cas dels òxids de manganès es poden donar errors negatius ja que poden competir amb el dicromat (reacció 3).



Altres dos punts a considerar en la metodologia són: el consum de més del 75 % del dicromat, que baixa el potencial d'oxidació de la barreja i pot no donar-se l'oxidació completa i la grandària de la partícula de la mostra, ja que quan més fina més alt és el resultat (Saña, 1985).

Finalment resumim en forma de Taula 5.3 comparativa les característiques dels tres protocols més utilitzats per a la determinació del C oxidable en sòls d'acord amb el procediment de Walkley-Black.

Taula 5.3. Comparativa de les condicions experimentals de determinació de C-oxidable d'acord al mètode de Walkley-Black descrits en tres referències bibliogràfiques: España, 1993, Porta et al., 1986 i Nelson i Sommers, 1982.

	España, 1993	Porta et al., 1986	Nelson i Sommers, 1982
Especificacions de la mostra	0,5-2 g de sòl terra fina triturada	0,5-1 g de sòl pulveritzat fins <0,2 mm	Pes equivalent a 10-25 mg C grandària <0,5 mm
Reactius oxidació	10 mL $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N 20 mL H_2SO_4 96%		
Condicions oxidació	sense escalfar i temps de contacte de 30 minuts		
Condicions valoració	200 mL aigua 10 mL H_3PO_4 conc.	100 mL aigua 10 mL H_3PO_4 conc.	200 mL aigua 10 mL H_3PO_4 conc. i filtrar
Reactius valoració	Sal de Mhor 0,25 N Difenilamina Fer blanc	Sal de Mhor 0,25 N Ortofenantrolina Fer blanc	FeSO_4 0,25 N Ortofenantrolina Fer blanc
Interferències i errors	Cl^- : H_2SO_4 amb Ag_2SO_4 25 g/L 6 % per Mn	Cl^- : H_2SO_4 amb Ag_2SO_4 2 % 0,1 % per Cl^- al 1 % 6 % per Mn^{2+} Fe^{2+}	NO
Factor de recuperació	NO	77 % = 1,29	1,30

La normativa que estableix la determinació del C-oxidable és la ISO14235:1998 (*Soil quality. Determination of organic carbon by sulfochromic oxidation*) (Jensen et al., 2003). Es segueix el mateix pretractament de la mostra, l'oxidació es fa amb dicromat i sulfúric a 135°C durant 30 minuts i la quantificació és colorimètrica ($\lambda=585\text{nm}$). Assenyalen les possibles interferències del Fe^{2+} i del Cl^- (recomanen que la mostra no

contingui més de 0,7 mg de Cl^- per cada 2 mg de C). Pel que fa al factor de recuperació, per estimar el carboni orgànic total, s'especifica que cal multiplicar el resultat per un factor que depèn del sòl i que aquest factor pot oscil·lar entre 1,7 i 2,5 per a sòls agrícoles. També especifica, però, que d'acord als estudis de comparació entre el C-oxidable i els valors de C-total (obtinguts amb la ISO10694:1995) el 95 % del carboni orgànic és oxidat (Jensen et al., 2003).

Per últim, i tenint en compte que els mètodes convencionals de laboratori presenten una sèrie de limitacions i requereixen una inversió en temps i treball i a més a més, problemes lligats a la presa de mostra i a variabilitat espacial i temporal, volem fer esment de les **noves tècniques per carboni en sòls de mesura *in situ***. Aquestes tècniques representen avantatges respecte de les analítiques: més ràpides i menys costoses i redueixen error de presa de mostra i de laboratori i permeten determinar àrees més grans, i de forma més repetitiva i seqüencial. En primer lloc cal dir que a través de Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) s'han obtingut bones prediccions que permeten treballar en un futur en la mesura directa al camp amb un sensor portàtil. Per altra banda, són importants els avenços en *Làser Induced Breakdown Spectroscopy* (LIBS) i en *Inelastic Neutron Scattering* (INS). La primera tècnica que s'està aplicant per determinar metalls, N i C-total en sòls es basa en espectroscòpia atòmica d'emissió ja que es sotmet la mostra a un làser intens que emet llum característica dels elements que componen la mostra. Per la segona tècnica s'obté en l'espectre de raigs gamma de la mostra de sòl un pic característic de l'àtom de C amb intensitat relacionada amb la concentració (Gehl i Rice, 2007).

En mostres de **residus orgànics** la determinació de C orgànic contempla també la doble via esmentada per mostres de sòls ja que històricament la metodologia analítica es va desenvolupar posteriorment. Tanmateix, d'acord amb Saña (1985), (autor d'un dels primers treballs sobre la metodologia analítica associada a la caracterització de la fracció orgànica de fangs de depuradora) l'extrapolació dels mètodes d'anàlisi de MO en sòls als residus orgànics ha de tenir en compte una sèrie de limitacions. Pel que fa a la determinació de C per via seca destaca com a inconvenient el baix pes de mostra que pugui representar un material tan heterogeni i una incompleta descomposició dels carbonats protegits per la MO. Pel que fa als principals factors que afecten l'oxidació humida del C en sòls i en fangs en comparació amb la via seca detalla tres factors:

- L'oxidació incompleta del C deguda al grau d'aromatització dels compostos que formen la MO (relació C/H) que dependrà de l'origen i del seu estat d'evolució; així un alt contingut de N orgànic, especialment en fangs de digestió aeròbica, comporta gran resistència a l'oxidació complerta.
- La presència de compostos (o ions reductors) de manganès, ferro o sofre. En fangs el Mn es troba en poca quantitat i el Fe es presenta en forma de Fe^{3+} . En fangs de digestió anaeròbica el nivell de S total (S^{2-} , SO_4^{2-} o bé formes reduïdes com S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_x\text{O}_6^{2-}$ (que passen fàcilment a sulfat en l'estabilització aeròbica o en l'assecat en erves) és del 1,51 % en mitjana i la fracció que pot interferir (S^{2-}) és poc important.
- Grau d'oxidació inicial (relació O/H o C/O). Si el compost oxidat es pobre en oxigen els errors són per excés ja que igual quantitat de dicromat oxida menys C i si és ric en oxigen els errors són per defecte. El mètode de càlcul establert pot ser vàlid per substàncies naturals complexes on aquests errors es compensen, però no per substàncies o grups definits de substàncies.

A causa d'aquestes limitacions i com a alternativa, és freqüent determinar el contingut de MO en residus orgànics per gravimetria indirecta (mesura de la pèrdua de pes de la mostra calcinada a una temperatura d'entre 470-560°C) i fer la conversió a C orgànic a través d'un factor. De la mateixa manera que en mostres de sòls, existeix bibliografia sobre la variabilitat dels factors que correlacionen els valors de C-total amb C-oxidable i de MO amb C-orgànic per grups de mostres que s'utilitzen com a adobs orgànics (Navarro et al., 1991 i 1993; Huerta et al., 2010).

La determinació normalitzada de carboni orgànic total en mostres de residus orgànics es descriu a la norma és UNE-EN13137:2002 (*Caracterización de residuos. Determinación de carbono orgánico total (TOC) en residuos, lodos y sedimentos*). Es determina el contingut de C-total per combustió a una temperatura que pot oscil·lar entre 900°C-1500°C i on poden utilitzar-se catalitzadors i/o modificadors per assegurar la combustió completa. Per obtenir el valor de C orgànic proposen dos procediments: l'anomenat A indirecte (per diferència entre CT i CI) i el B directe (amb pretractament amb àcid inorgànic no oxidant) i deixa obert el sistema instrumental de quantificació: IR, gravimetria, culombimetria, conductimetria, i detecció per conductivitat tèrmica o ionització de flama després de la reducció del CO₂ a CH₄. El procediment B pot donar resultats erronis si en l'acidificació es donen reaccions laterals o desprenen substàncies volàtils. Per altra banda, per obtenir resultats reproduïbles es requereix de molta experiència en el pretractament.

Finalment hem de fer referència als resultats dels diferents grups d'estudi que, a nivell europeu, varen treballar sobre la normalització de mètodes d'anàlisi de sòls i residus orgànics englobats com a *Proyecto Horizontal*. Respecte de la determinació de Carboni orgànic es va treballar amb l'objectiu d'ampliació de la norma UNE-EN13137:2002 en una sola normativa aplicable tant a mostres de residus com de sòls (Jensen et al., 2003). D'acord a l'informe final del projecte, les variacions introduïdes a la norma EN13137:2002 són poques, però cal destacar que els obtinguts pel procediment B (mètode directe) no es poden considerar fiables excepte pels laboratoris que tinguin molta experiència i pels que recomana disposar d'un procediment automatitzat de pretractament de mostra (Horizontal, 2007).

5.1.2 Mètodes d'anàlisi de Nitrogen aminoacídic

En l'anàlisi d'aminoàcids (AA) en el sòl s'ha de diferenciar els continguts de AA-lliures i dels AA-totals; així es contemplen dos tipus de tractament de mostra, una extracció pels AA-lliures i una hidròlisi pels AA-totals i un procés anàleg de quantificació per a les dues fraccions. Els AA lliures s'analitzen després d'un procés d'extracció amb una sal de Ba²⁺ o de NH₄⁺ que interaccionen amb l'associació AA-argila. Per a analitzar el N proteic, les condicions de la hidròlisi no han estat estandarditzades i les variables són: tipus i concentració de l'àcid, temps i temperatura, relació volum àcid/pes de sòl i pretractament. Les condicions generals són: HCl 6 M a 110 °C , durant 6-24 hores i es pot realitzar amb diversos sistemes (reflux, tubs tancats i microones). Cal tenir en compte que aquest procés afecta a alguns AA; així Gln i Asn es recuperen com a Glu i Asp, el Trp es destrueixen, la Met pot oxidar-se i Tyr, Ser i Thr presenten recuperacions baixes (Stevenson, 1982; Kögel-Knabner, 2006).

Respecte dels sistemes de quantificació, els mètodes clàssics es basen en la reacció colorimètrica de la ninhidrina (i el resultat és el N aminoacídic) i els que permeten una separació i identificació dels diferents AA (cromatografia en capa fina, iònica i HPLC i cromatografia de gasos) (Stevenson, 1982). El mètode més usual d'anàlisi

cromatogràfica d'AA és HPLC amb derivatització (habitualment precolumna) ja que només els AA aromàtics tenen absorció a l'UV. A través de la reacció de derivatització es sintetitzen els derivats apolars que es poden separar en columnes de fase reversa amb eluents d'apolaritat creixent. Les principals reaccions de derivatització són cinc: amb el clorur de 1-dimetilaminonaftalè-5-sulfonil (clorur de dansil), amb o-ftaldehid (OPA) i 2-mercaptoetanol, amb fenilisotiocianat (P.I.T.C , reactiu de Edman), amb 9-fluorenilmetilcloroformiat (F.M.O.C.) i amb 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (AQC) i les característiques dels respectius mètodes cromatogràfics associats es resumeixen en la Taula 5.4 (LLiberia, 1996).

Taula 5.4. Resum de les característiques dels principals mètodes d'anàlisi d'aminoàcids en sòls per HPLC (LLiberia, 1996).

Mètode		1	2	3	4	5
Reactiu derivatitzant		DANS/DABS	OPA	PITC	Fmoc	AQC
Reacció	pH reacció	Tampó bicarbonat 8-10	Tampó borat 9,5		Tampó borat 8-8,5	Tampó borat 8,8
	Temps reacció	35-60 min	35-50 min	Llarg i laboriós	1 minut	1 minut
Cromatografia	Columna	C8 C18	C8 C18	C8 C18	C8 C18	C18
	Detecció	UV 254 nm VIS 425 nm Fluorescència $\lambda_{ex} = 250 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 470 \text{ nm}$ Quimioluminiscència	Fluorescència $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$ Sense senyal de l'excés de reactiu	UV 254 nm	UV 254 nm Fluorescència $\lambda_{ex} = 265 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 310 \text{ nm}$ Senyal de l'excés de reactiu	UV 248 nm Fluorescència $\lambda_{ex} = 250 \text{ nm}$ i $\lambda_{em} = 395 \text{ nm}$ Hidròlisi de l'excés de reactiu
	Derivats	Sensibles llum/més estables	Poc estables	Estables	Molt estables	Estables una setmana
	Temps separació	Alt/més baix i millor resolució	35-50 min	Curt 12 min		
	Altres	Sensibilitat alta/baixa Pot formar-se més d'un derivat	Sensibilitat alta Únics , però només AA primaris	AA primaris i secundaris	Sensibilitat alta AA primaris i secundaris	Sensibilitat alta AA primaris i secundaris

DANS/DABS, clorur de 1-dimetilaminonaftalè-5-sulfonil; OPA, o-ftaldehid ; PITC fenilisotiocianat (reactiu de Edman); Fmoc, 9-fluorenilmetilcloroformiat; AQC, 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat.

5.1.3 Mètodes de determinació de Carbohidrats totals i Carbohidrats extractables

L'anàlisi dels carbohidrats totals del sòl comporta una hidròlisi dràstica dels polisacàrids i d'altres polímers per alliberar les unitats components i posterior quantificació amb o sense separació dels monòmers. El contingut en carbohidrats extractables determina només una fracció del contingut total, les formes solubles i

suposa el tractament de la mostra de sòl amb un extractant suau. La quantificació del contingut en monosacàrids de l'hidrolitzat o de l'extracte proporciona el contingut en carbohidrats i amb la separació, que requereix d'una metodologia instrumental cromatogràfica, s'obté a més el perfil de la composició en monosacàrids.

Pel que fa a la determinació dels **carbohidrats totals**, per la hidròlisi el reactiu àcid més àmpliament utilitzat és el H_2SO_4 . Les condicions experimentals de concentració de l'àcid, temps i temperatura i sistema de realització són importants de cara a controlar el grau hidròlisi desitjat i per aquest motiu s'han de seleccionar amb cura. El criteri de màxima efectivitat s'ha de fer compatible amb el de mínima degradació ja que a l'hora de realitzar el tractament àcid i en calent durant un temps prolongat s'ha de tenir present que l'estabilitat dels monosacàrids és: hexoses > desoxihexoses > pentoses > àcids urònics (Cheshire, 1979). Per a la hidròlisi dels components cel·lulòsics es requereix una concentració més elevada d'àcid i unes condicions més dràstiques que per a la descomposició de les hemicel·luloses; així si es sotmet la mostra a unes condicions d'hidròlisi més suaus amb àcid diluït es pot tenir una estimació dels carbohidrats no cel·lulòsics, que correspon a polisacàrids vegetals no estructurals i a microbians extracel·lulars.

La hidròlisi més efectiva per sucres neutres és la proposada per Oades (1970) que consta de tres etapes: la primera amb H_2SO_4 2,5 M (20 minuts) que hidrolitza els més fàcilment hidrolitzables, la segona amb H_2SO_4 12 M en fred i la tercera rebaixant la concentració a 0,5M i en calent. Per a les determinacions de rutina n'hi ha, però prou amb el procediment que inclou només les dos últimes etapes. Així el mètode més usual de referència és el mètode proposat per Cheshire (Cheshire i Mundie, 1966; Cheshire 1979) com a òptim per màxima efectivitat i estabilitat (encara que subestima pentoses i desoxihexoses); conté dues fases, una primera de predigestió o extracció a temperatura ambient amb H_2SO_4 12 M durant 16 hores i una segona fase d'hidròlisi a reflux a 100°C amb H_2SO_4 0,5 M durant 5 hores.

Cal afegir aquí que del control de les condicions experimentals s'han establert protocols d'hidròlisi parcial dels polisacàrids; així, amb una gradació de la força dels reactius hidrolítics es poden obtenir fraccions dels polisacàrids presents al sòl el resultat de les quals s'ha relacionat amb els diferents tipus de polisacàrids. En aquest sentit es diferencien els carbohidrats no cel·lulòsics (els que s'obtenen amb la hidròlisi amb H_2SO_4 2,5 M dels cel·lulolítics (amb el doble tractament H_2SO_4 12 M + H_2SO_4 0,5 M) (Chantigny i Angers, 2008) o bé cristal·lins i no cristal·lins d'acord a Kogel-Knabner (1995).

Com a modificacions posteriors al mètode de referència trobem la de Piccolo et al. (1996) que proposen eliminar la predigestió amb sulfúric concentrat, perquè causa degradació de monosacàrids i faciliten la realització substituint el reflux per l'agitació, i la més recent de Martens i Loeffelmann (2002). Aquests autors qüestionen el mètode de referència tenint en compte que les millores dels mètodes de quantificació instrumentals actuals, especialment de la cromatografia iònica, permeten avaluar el grau d'efectivitat de la hidròlisi; proposen H_2SO_4 concentrat 18 M durant 15-30 min i una segona fase d'hidròlisi en autoclau H_2SO_4 1-1,5 M i obtenen una recuperació que oscil·la entre el 82-97 % amb cel·lulosa pura i amb mostres de plantes i sòl.

El tractament posterior de l'hidrolitzat comporta eliminació de l'àcid per precipitació com a $BaSO_4$ (amb hidròxid o carbonat), la separació del precipitat i la neutralització final. S'ha de rentar el precipitat amb aigua calenta o amb àcid acètic diluït per aconseguir millor recuperació de sucres coprecipitats. Els punts crítics d'aquest pas és

que el color dels extractes no és eliminat del tot i que alguns sucres és perden en el precipitat. Alternativament s'ha proposat l'eliminació de les interferències amb resines de bescanvi on es poden eluir separatament sucres neutres d'àcids urònics; si es fa a través de C actiu a més l'extracte no surt colorejat (Cheshire, 1979; Stevenson, 1982)

L'àcid trifluoroacètic (TFA) també va ser proposat com reactiu adient per als polisacàrids presents en el sòl. El seu avantatge és el de ser més efectiu en la hidròlisi de material no cel·lulolític amb menys temps i concentracions més baixes que el sulfúric mantenint condicions d'estabilitat pels monosacàrids alliberats. En aquest cas l'eliminació és per evaporació (Amelung et al., 1996; Rumpel i Dignac, 2006). L'àcid clorhídric també s'ha fet servir per a la hidròlisi, però el rendiment i l'efectivitat són inferiors als altres dos.

La determinació de **carbohidrats extractables** s'inclou en l'estudi de la fracció més làbil dels carbohidrats i els reactius proposats com a extractants són aigua freda, l'aigua calenta i àcids o bases diluïts (HCl 1 M, NaOH 0,5 M i H_2SO_4 0,5 M) (Ball et al., 1996; Puget et al., 1999; Chantigny i Angers, 2008). La determinació de carbohidrats solubles persegueix també la idea de substituir la determinació de carboni de biomassa microbiana per no fer servir fumigants i poder-ho fer a partir de mostra seca (Sparling et al., 1998). El contingut en carbohidrats extractables en K_2SO_4 0,5 M també persegueix la mateixa finalitat i és un indicador de C disponible en el sòl (DeLuca i Keeney, 1993). Aquesta determinació deriva de la tècnica d'anàlisi de la biomassa per fumigació-extracció ja que es pot complementar amb l'anàlisi de la composició dels extractes de K_2SO_4 0,5 M en mostres fumigades i no fumigades. Diversos autors entenen per substàncies antrona-reactives (ARC) els compostos de carboni (bàsicament carbohidrats) que reaccionen amb l'antrona un cop extrets amb K_2SO_4 0,5 M; així el valor d'ARC en mostres fumigades menys no fumigades representa les hexoses que s'alliberen de la lisis cel·lular (Badalucco et al., 1990 i 1992; DeLuca i Keeney, 1993; Joergensen et al., 1996).

Pel que fa a la quantificació, els **mètodes colorimètrics** es basen en l'acció dels àcids concentrats sobre els sucres que donen lloc a la formació de components heterocíclics com furfurals (a partir d'hexosa) i hidroximetilfurfurals (a partir de pentosa). Aquests reaccionen amb diferents substàncies aromàtiques i donen productes colorejats. En general tenen l'avantatge de ser mètodes ràpids i simples tot i que requereixen condicions experimentals determinades i control temps de reacció i de l'àcid per obtenir resultats reproduïbles i el principal desavantatge és que són poc específics i que la intensitat de color pot ser diferent entre els diferents compostos (Stevenson, 1982).

Existeixen diferents reaccions colorimètriques per a la determinació de sucres totals o bé de grups específics com pentoses, hexoses, àcids urònics o bé sucres reductors (Cheshire, 1979). El més utilitzats en l'anàlisi de carbohidrats totals del sòl són el de fenol (Dubois et al., 1956) i el de antrona (Brink et al., 1960). Amb el fenol i àcid sulfúric a altes temperatures reaccionen els monosacàrids (hexoses, pentoses i metil derivats i àcids urònics), per donar compostos colorejats grocs que presenten màxim d'Absorbància a 480-490 nm. El reactiu és estable, el color permanent i requereix poc control de les condicions experimentals (Dubois et al., 1956; Cheshire, 1979).

Amb el reactiu antrona o antracena (9,10 dihidro-9-oxoantracè) i en medi sulfúric i en calent reaccionen les metilpentoses, hexoses i 6-desoxihexoses per donar complexos de color verd 620-630 nm. Les pentoses donen coloracions més febles (absorbeixen sobre 590-626 nm), els àcids urònics donen coloració vermella

(absorbeixen sobre 540-550 nm) i no quantifica aminosucre (Brink et al., 1960; Cheshire, 1979). Un dels problemes de l'antrona és la importància de la temperatura i temps de la reacció per obtenir resultats reproduïbles (Doutre et al., 1978).

Altres reaccions colorimètriques proposades per a la quantificació de sucres són: orcinol (3,5-dihidroxitoluè), àcid cromotrópic per avaluar hexoses, orcinol-FeCl₃ i anilina per pentoses, carbazol per àcids urònics, àcid disòdic bicinloníninc (BCA) específic pel Cu²⁺ i ferricianur o el reactiu de Fehling per sucres reductors (Cheshire, 1979).

És fàcil trobar treballs que comparen les característiques de les diferents reaccions colorimètriques i que posen de manifest les seves deficiències fent la comparació amb resultats obtinguts amb els primers mètodes instrumentals (Doutre et al., 1978; Martens i Frankenberger, 1990; Deng i Tabatabai, 1994; Piccolo, 1996). En aquest sentit i malgrat els estudis que alerten de les deficiències de la reacció colorimètrica de l'antrona (que pot arribar a comportar que el contingut en carbohidrats totals sigui de l'ordre del 150 % dels resultats experimentals obtinguts amb aquest procediment) cal esmentar que per diferents autors és un reactiu colorimètric adequat; en aquest sentit afirmen que aquest mètode proporciona un bon índex relatiu sobre el contingut total de carbohidrats en diferents tipus de sòls (Cheshire, 1979; Stevenson, 1982; Grandy et al., 2000).

Per **tècniques cromatogràfiques** es poden identificar i quantificar els monosacàrids que formen part dels polisacàrids presents en el sòl i a més es pot donar un resultat més fiable de carbohidrats totals. Inicialment es va fer per cromatografia en paper, però actualment es pot fer per HPLC, iònica i per cromatografia de gasos. En aquest cas es necessari primer realitzar la reacció de derivatització per fer-los volàtils en forma de metil, trimetilsilils o acetil èsters (Oades et al., 1970; Stevenson, 1982; Amelung i Cheshire, 1996; Rumpel i Dignac, 2006). A pesar de ser molt sensible i específica la determinació per cromatografia de gasos és llarga i s'han desenvolupat mètodes més ràpids per HPLC o cromatografia iònica (HPAEC) (Angers i Nadeau, 1988; Martens i Frankerberger, 1991; Chantigny i Angers, 2008).

5.1.4 Mètodes de determinació de les activitats enzimàtiques β-glucosidasa i β-galactosidasa

Per a la determinació de les activitats enzimàtiques β-glucosidasa i β-galactosidasa en sòls hi ha bàsicament dos gran vies: i) la determinació colorimètrica del producte de la hidròlisi de paranitrofenilglucòsids o bé de hidroximetilfenilglucòsids, i ii) la determinació fluorimètrica del producte de la hidròlisi del 4-metillumbelliferilglucòsid.

Els substrat orto- i para- nitrofenilglucòsids (pNG) van ser un dels primers substrats proposats i, tot i que inicialment els principals problemes metodològics es trobaven en la extracció adequada del para-nitrofenol format, és el substrat més àmpliament utilitzat en la actualitat i el que desenvolupem més en detall a continuació.

Hayano (1973) proposa un mètode acurat i simple de l'assaig enzimàtic a través de la quantificació del paranitrofenol (pNF). Les condicions d'aquest mètode són: 0,5 g de mostra humida, incubació 1 hora a 30°C amb toluè a pH 4,8 (tampó fosfat-cítric) i extracció del pNF amb etanol. Aquest autor comprova l'estabilitat del substrat en les condicions proposades de pH 10 (tampó TRIS 2 M) durant 6 hores i que en canvi amb NaOH es dona hidròlisi del substrat.

Saratchandra i Perrott (1984) també estudien paràmetres d'ajust del mètode amb el mateix substrat juntament amb característiques cinètiques. Proposen, però, dietilèter com a extractant, utilitzen TCA per parar la reacció i curiosament preparen els patrons amb sòl.

Partint de treballs anteriors sobre la mesura de l'activitat amb pNG, Eivazi i Tabatabai (1988) proposen una metodologia més pràctica que millora i simplifica l'extracció del pNF. Estudien l'assaig de les 4 activitats amb els respectius substrats en les condicions següents: 1 g de sòl, amb toluè, tampó MUB de pH 6, incubació d'una hora a 37°C, extracció amb tampó THAM de pH 12 i filtració previ afegit de CaCl₂ 0,5 M i lectura a 400 nm (fent si cal la dilució amb THAM 0,1 M pH 10). Per les condicions de la calibració remetent a les de l'activitat fosfatàsica (Browman i Tabatabai, 1978) i recomanen controls afegint el substrat just abans de filtrar. Conclouen que el mètode és adequat ja que en tots els casos es compleix la cinètica de Michaelis-Menten, el resultat és millor el p-nitrofenil-D-glucòsid que el o-nitrofenil-D-glucòsid i la precisió és molt bona (CV varia entre 0,8-3 % depenent del sòl).

Altres modificacions posteriors d'aquest mètode per a la determinació de l'activitat β -glucosidasa deriven d'aspectes estudiats per l'activitat fosfatàsica ja que utilitza substrat similar. En primer lloc s'ha d'esmentar la recomanació de fer la recta de calibració amb sòl d'acord amb els estudis de Vourinen (1993). En segon lloc, tenim aquesta i d'altres modificacions, introduïdes per Trasar-Cepeda et al. (1985 i 2000b) fruit del seu extensiu treball sobre activitats enzimàtiques en sòls gallecs que resumim a continuació:

- Pes de la mostra de sòl: descriuen l'assaig per 1,5 g de sòl, però de mostra humida i sense utilitzar toluè.
- pH òptim: descriuen l'assaig amb incubacions a pH 5, valor de pH òptim (tot i que l'activitat no es molt diferent de pH 6).
- Ajust de pH: proposen un assaig previ per veure si la mostra de sòl manté o desplaça el pH del tampó; si hi és, fan un ajust de pH a través de l'estudi de la corba de neutralització de la mostra de sòl. Aquesta variant es fruit de comprovar que en sòls rics en MO amb fort poder amortidor, la dissolució tampó no aconsegueix portar la suspensió al pH de la reacció enzimàtica.
- Concentració de CaCl₂: descriuen l'assaig utilitzant el reactiu de concentració de 2 M i no 0,5 M. La funció d'aquest reactiu és la de prevenir la dispersió de les argiles i per a disminuir l'extracció de matèria orgànica del sòl a l'afegir solució extractant de pH bàsic i comproven que aquesta concentració és insuficient per evitar la coloració marró de l'extracte degut a la matèria orgànica (Saa et al., 1993).
- Sistema de calibració: treballen amb un rang de concentracions 0-200 μ g de p-nitrofenol i adverteixen de la necessitat d'elaborar una recta de calibració per a cada tipus de mostra de sòl, la qual cosa suposa fer, paral·lelament a la incubació de les mostres i controls, la incubació també de patrons amb sòl. Aquest és el procediment proposat per Vuorinen (1993) per a les activitats fosfatàsica, β -glucosidasa i arilsulfatasa (activitats que utilitzen un derivat del p-nitrofenol com a substrat) donat que els sòls tenen capacitat d'adsorbir aquest reactiu. Aquest autor detecta gran diferència segons diferents tipus de calibració per l'activitat fosfatàsica.

Algunes d'aquestes modificacions són les que estudiem en la tesi en l'apartat de posada a punt del mètode per els nostres sòls (apartat 5.5.2.1) i apareixen publicats a Jiménez i Bonmatí (2003). Cal afegir que és poc freqüent trobar a la bibliografia la incorporació d'aquestes modificacions com a metodologia.

Com a altre procediment colorimètric, per la β -glucosidasa també s'ha proposat la incubació amb salicina (2-hidroximetil-fenil- β -D-glucopiranosido) (3h a 37°C a pH 6,2) i quantificació del saligenol (2-hidroxibenzilalcohol) format (Skujins, 1978); aquest mètode es coneix com a mètode de Hoffmann i es descriu a Àlef i Nannipieri (1995).

La segona via, alternativa als mètodes anteriorment descrits, es la del mètode fluorimètric o sistema *Florimetric Microplat* per determinar molts enzims a la vegada i en moltes mostres de sòl; els principis deriven de la mesura en sistemes aquàtics i és automàtic. Marx et al. (2001) comparen la nova tècnica amb les clàssiques que alliberen pNF per 10 activitats. El substrat és un conjugat del compost altament fluorescent 4-metillumbelliferona (MUB) i 7-amino-4-metilcoumarin (AMC) i té l'avantatge que permet la determinació directa, sense extracció ni purificació. El treball de Vepsäläinen et al. (2001) és un exemple d'aplicació d'aquest test multienzimàtic i Martínez-Íñigo et al. (2003) proposen aquesta tècnica per a la determinació de la β -galactosidasa, però amb el sistema clàssic d'incubació.

Respecte de la incidència del pretractament de la mostra, es a dir fer l'assaig a partir de mostra humida, assecada o rehidratada així com les condicions d'emmagatzematge, en remetem al recull bibliogràfic (Eivazi i Tabatabai, 1990; Bandick i Dick, 1999; Hinojosa et al., 2004; Zornoza et al., 2006) inclòs en el capítol d'introducció.

5.2 OBJECTIUS

Els objectius específics d'aquest de l' objectiu general D (capítol 1) i són:

- 1r. Posar a punt el mètode d'anàlisi de carboni orgànic per combustió en mostres de sòl-fang amb l'instrumental SHIMADZU TOC-V CSH/CSN amb el mòdul de mostra sòlida SSM-5000A.
- 2n. Contrastar els resultats de carboni orgànic en les mostres de sòl-fang de les experiències de lisímetres i parcel·les obtinguts a través del mètode de combustió i els resultats que disposem obtinguts pel mètode d'oxidació.
- 3r. Estudiar el mètode de determinació de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa descrit per Eivazi i Tabatabai (1988) per tal d'elaborar un protocol detallat de l'assaig enzimàtic atenent a la incidència de les modificacions proposades per Vuorinen (1993) i Trasar-Cepeda et al. (1985 i 2000b) per les mostres de sòls naturals i de sòl-fang de les experiències de lisímetres i parcel·les.

5.3 MATERIALS

Les mostres per les que es posen a punt i s'apliquen els mètodes descrits són les de les experiències de sòls naturals (capítol 3) i les de les dues experiències d'aplicació de fangs (capítol 4) en lisímetres (42 mostres) i en parcel·les (16 mostres).

5.4 MÈTODES: SELECCIÓ I CARACTERÍSTIQUES

5.4.1 Carboni orgànic

Tal com es desprèn dels objectius s'ha fet servir doble metodologia per la determinació del carboni orgànic en les mostres. Concretament, s'ha fet la determinació del carboni orgànic per combustió i la determinació del C-oxidable d'acord amb el mètode Walkley-Black. En aquest apartat descrivim el criteri seguit per a la tria de la metodologia emprada així com les seves principals característiques; les metodologies analítiques dels procediments es detallen en l'annex.

5.4.1.1 Carboni orgànic per combustió

La selecció de la metodologia per a la determinació del carboni orgànic per combustió va venir condicionada per les característiques de l'instrumental disponible a la Unitat d'Anàlisi de l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona.

Concretament vàrem disposar de l'aparell SHIMADZU TOC-V CSH/CSN amb el mòdul de mostra sòlida SSM-5000A. Aquest mòdul per anàlisi de mostres sòlides, permet la doble quantificació del CT i el CI en forns independents per trobar l'anomenat carboni orgànic total. Degut a què no s'havia fet servir fins aleshores, es va haver de fer la posada a punt de la metodologia analítica, estudi que forma part de la tesi.

La selecció de la metodologia la vàrem fer a través de la informació del manual de l'aparell, junt a publicacions tècniques de la casa comercial i de les normatives oficials.

A partir d'aquesta informació i dels resultats d'unes primeres proves preliminars es van fixar les següents característiques metodològiques:

➤ **Condicions de la combustió:**

Temperatura de 900°C i sense l'addició de reactius; es va descartar treballar a una temperatura més elevada per tal d'evitar el desgast de l'aparell i també es va descartar el consum de reactius.

➤ **Procediment:**

Determinació del C orgànic per diferència entre CT i CI; es va descartar la metodologia de pretratament àcid ja que va resultar més llarg i de difícil reproductibilitat.

➤ **Grandària de partícula:**

Anàlisi a partir de mostra assecada a l'aire, molturada i tamisada fins a 0,250 mm; es va descartar treballar amb una grandària inferior per dificultats pràctiques en aconseguir-la.

Respecte de la temperatura de combustió, el manual (SHIMADZU, 2001) considera que la temperatura del forn de 900°C és suficient per a una combustió completa, tot i que adverteix que per mostres amb carbonats de difícil (lenta o incompleta) descomposició pot caldre pujar-la fins a 980°C. Respecte de l'ús de reactius per accelerar la combustió o la descomposició tèrmica, recomanen l'addició de WO₃ o V₂O₅. Per altra banda, però, d'acord amb els resultats de les publicacions tècniques de la casa comercial (SHIMADZU) el treball a 900°C amb i sense la utilització d'additius

(WO₃ o V₂O₅) compleix els requeriments de recuperació i aproven el comportament de l'instrumental respecte de la normativa EN-13137.

Respecte del procediment triat vàrem seguir les recomanacions de Horizontal (2007) tenint en compte que la relació CI/C orgànic en les mostres és inferior a 1/10, i per tant la precisió i les recuperacions han de ser previsiblement bones.

Pel que fa a la grandària de partícula de les mostres, el manual recomana 0,075 mm i la normativa oficial per sòls (UNE 77321:2003) 0,250 mm.

Les característiques de la metodologia emprada queden concretades en la descripció següent:

Per l'anàlisi de CT i de CI es parteix de la fracció de terra fina i molturada per morter d'àngata i tamisada pel sedàs 0,250 mm. Ambdues determinacions es fan per duplicat amb un pes entre 75-100 mg de mostra en una cubeta de porcellana i sense cap additiu. Les determinacions de CT i de CI es fan a l'aparell SHIMADZU TOC-V CSH/CSN amb el mòdul de mostra sòlida SSM-5000A. En el cas del CT la mostra es sotmet en un forn fins a T 900°C on arriba corrent de O₂ a 0,5 L/min. En el tub de combustió amb la barreja catalítica de Pt i Co₃O₄ queda garantida la conversió completa del C a CO₂. En el cas del CI s'addiciona 0,5 mL H₃PO₄ diluït 1:2 quan la cubeta ja està en el port que la condueix al forn a T 200°C on els carbonats i bicarbonats es transformen amb la corrent d'aire sintètic a 0,5 L/min. El CO₂ es detecta per infraroig (*NDIR, non-dispersive infrared detection*). El C orgànic es troba per diferència entre el carboni total i el carboni inorgànic. La calibració per CT es fa amb patrons de glucosa i per CI amb patrons de Na₂CO₃ i el rang de treball es va fixar fins a 10 mg de C. Pel càlcul dels resultats el valor de C orgànic per cada rèplica es dedueix de la resta entre el resultat de C total i la mitjana dels resultats de les rèpliques del C inorgànic. La manipulació de les mostres és manual i cada determinació requereix d'aproximadament 10 minuts.

5.4.1.2 Carboni orgànic a partir del C-oxidable

En el cas del C-oxidable vàrem triar el mètode d'oxidació Walkley-Black, que no comporta escalfament de la barreja oxidant, per ser el més usual en el nostre entorn i alhora el més ràpid i pràctic.

Per la determinació de C oxidable es va seguir el mètode descrit a Mètodes Oficials (Espanya, 1993). Es va partir de la fracció terra fina i molturada per morter d'àngata. Es pesen 500 mg de mostra i es sotmet a un procés d'oxidació amb K₂Cr₂O₇ 1 N en excés i medi àcid de H₂SO₄ durant un temps controlat (30 minuts). La reacció s'atura amb l'addició d'aigua destil·lada i a continuació es quantifica el K₂Cr₂O₇ sobrant per volumetria amb sal de Mohr 0,25 N com a reductor (fent servir difenilamina com a indicador i H₃PO₄ per adequar el punt final). El reactiu valorant es normalitza fent un blanc. Per les interferències dels clorurs s'utilitza H₂SO₄ amb Ag₂SO₄. A l'hora dels càlculs es considera que el número d'oxidació mitjà del C dels compostos orgànics és zero. Les determinacions es fan per triplicat. Per les mostres de sòls naturals el factor de recuperació emprat és 1,29 d'acord amb la descripció de Porta et al. (1986) i per tant s'ha aplicat:

$$\text{C-oxidable} \times 1,29 = \text{C orgànic}$$

D'acord amb els objectius, en el cas les mostres sòl-fang es va fer un estudi sobre el comportament d'aquest factor considerant els resultats de C obtinguts per combustió i per oxidació (apartat 5.5.1.3).

5.4.2 Nitrogen aminoacídic

Les anàlisis del contingut en aminoàcids totals de les mostres s'han realitzat sotmetent-les a una hidròlisi àcida i posterior quantificació dels AA per HPLC. El procés de quantificació s'ha portat a terme a la Secció de Cromatografia del Institut Químic de Sarrià (IQS) de Barcelona. S'ha fet servir el mètode de la derivatització amb el reactiu 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (AQC) ja que és el que s'empra de forma habitual, en aquest centre per aquests tipus de mostres. La determinació del contingut en AA-lliures es va fer inicialment com a prova, però es va desestimar la seva realització ja que els resultats van ser molt baixos.

La tècnica que hem fet servir es pot considerar fruit de diferents treballs sobre metodologia analítica realitzats per l'equip de Cromatografia de l'IQS sobre la fracció nitrogenada en mostres de sòls, fangs i barreges sòl-fang (Borrós, 1993; Lliberia, 1996; Mejía, 2005).

La reacció de derivatització presenta importants millores davant altres reactius emprats fins al moment avantatges de tipus pràctic i bona separació cromatogràfica. El desenvolupament del mètode AQC es basa en els treballs de Cohen i Michaud (1993) que varen sintetitzar aquest reactiu derivatitzant fluorescent i es comercialitza per la firma comercial Waters amb el nom de AccQ-Tag. L'equip de Cromatografia de l'IQS en els seus treballs de posada a punt d'aquesta tècnica per l'anàlisi d'aminoàcids en diverses matrius parteix del mètode descrit per a la casa comercial Waters i estudia algunes modificacions i millores com i) la substitució del patró intern original (α -aminobutíric) per Norleucina, i ii) la utilització de columnes no convencionals que escurcen el temps de separació cromatogràfica a 11-15 minuts.

El reactiu AQC (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat) és un reactiu per a la derivatització precolumna dels aminoàcids. El grup amino dels AA reacciona amb AQC a pH 8,8 i forma un derivat que pot detectar-se per absorció al UV ($\lambda=248\text{nm}$) o per fluorescència ($\lambda_{\text{ex}} = 250\text{nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 395\text{nm}$).

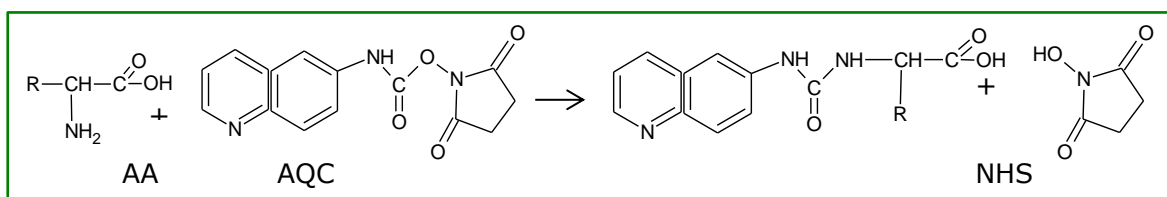


Figura 5.1 Reacció de derivatització d'aminoàcids amb 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (AQC) i formació de NHS (N-hidroxisuccinimida)

Els principals avantatges d'aquesta derivatització són tres:

- Es tracta d'una reacció molt ràpida (aprox 1 minut) que es porta a terme en un sol pas.
- Es formen derivats estables durant una setmana.
- No es necessari eliminar l'excés de reactiu. En aigua AQC s'hidrolitza ràpidament i dona com a productes de la reacció CO₂, NHS (N-hidroxisuccinimida) i AMQ (6-amino quinoleïna) que no interfereixen en la senyal de detecció del AA.

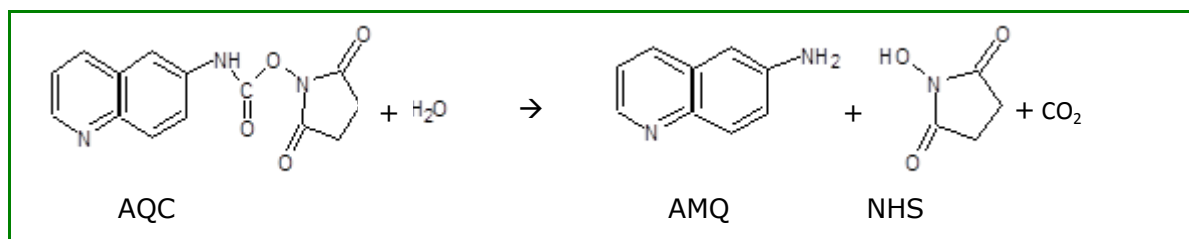


Figura 5.2 Reacció d'hidròlisi de l'excés de 6-aminoquinolinil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (AQC) i formació de AMQ (6-amino quinoleïna), NHS (N-hidroxisuccinimida) i CO₂

Per a l'anàlisi del contingut en N-aminoacídic total en mostres de barreges sòl-fang seguim el mètode descrit a Mejía (2005) pel cas d'utilització de columnes convencionals. L'adaptació a les mostres de sòl només implica augmentar el pes de mostra de partida de 0,5 g per fangs a 5 g. Pel que fa al procediment obviem el pas d'escalfar el vial 10 min a 55°C per millorar la reacció de derivatització de la Lys per considerar-ho innecessari. La Figura 5.3 mostra exemples dels cromatogrames obtinguts i la descripció detallada de la tècnica així com els resultats de la composició en AA es presenta en l'annex.

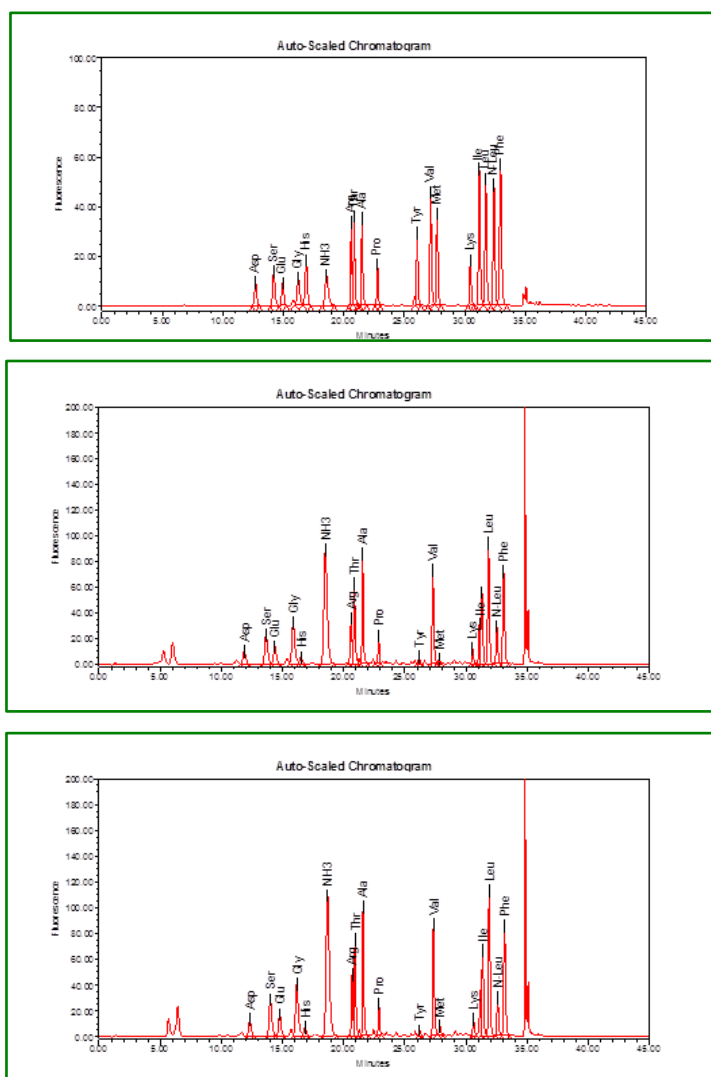


Figura 5.3 Exemples de cromatogrames de separació dels aminoàcids en el patró i en dues mostres (ADH i ATH) de barreges sòl-fang de l'experiència en lisímetres.

5.4.3 Carbohidrats totals i carbohidrats extractables

Per a la determinació del contingut en carbohidrats totals de les mostres de sòls es va triar la doble hidròlisi amb àcid sulfúric establerta per Cheshire (1979) per ser el procediment més habitual per a estudiar la fracció de carbohidrats totals present en el sòl, anomenats també cel·lulòsics o *strong-acid extractable carbohydrates* (Chantigny i Angers, 2008). Per a la determinació de la fracció de carbohidrats extractables és va optar per fer servir com a reactiu extractant el K_2SO_4 0,5 M seguint els estudis de Badalucco et al. (1992) el significat dels sucres solubles lliures com a índex d'activitat microbiana. Per a la quantificació vam fer servir el mètode colorimètric de l'antrona (Brink et al., 1960).

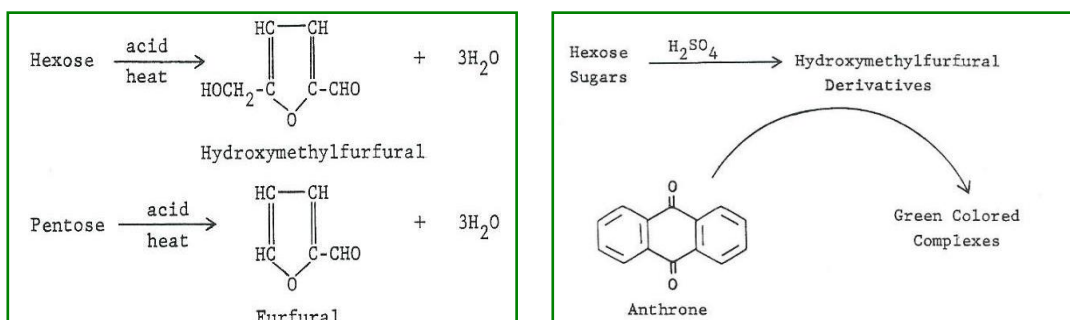


Figura 5.4 Reacció colorimètrica de les hexoses i pentoses amb antrona en medi àcid (Stevenson, 1982).

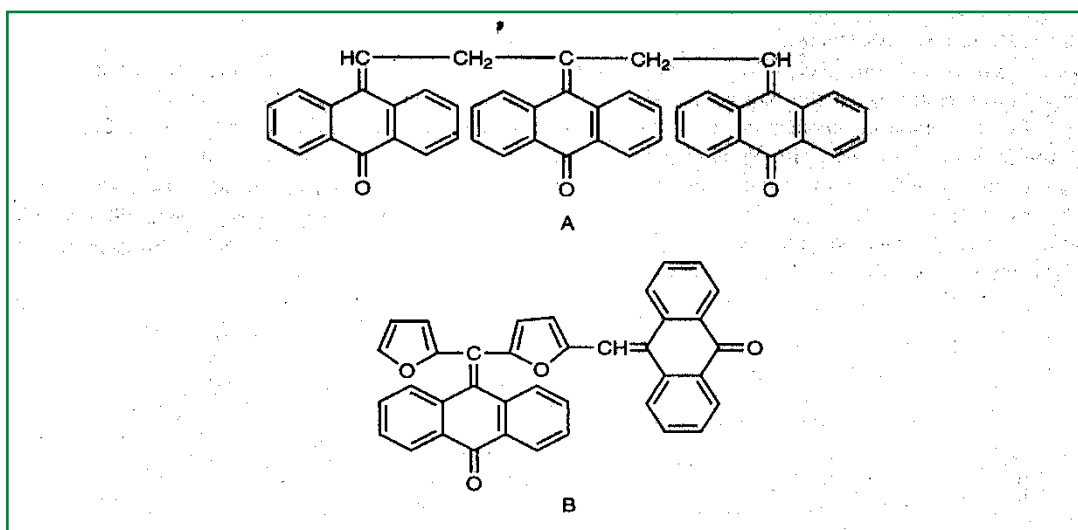


Figura 5.5 Compostos proposats com a productes de la reacció entre l'antrona i hexoses (A) o pentoses (B) (Scherz i Bonn, 1998).

Aquest és un mètode clàssic i, malgrat les seves mancances, hem constatat que és àmpliament utilitzat en treballs sobre carbohidrats en sòls i diversos autors afirmen que aquest mètode proporciona un bon índex relatiu sobre el contingut de carbohidrats en diferents tipus de sòls (Cheshire, 1979; Stevenson, 1982; Metzger et al., 1987; Kinsbursky et al., 1989; Grandy et al., 2000; Garcia-Orenes, et al., 2005). Per altra banda aquest mètode és el que dóna lloc al que s'entén per substàncies antrona-reactives (ARC) o compostos de C (bàsicament carbohidrats) que reaccionen amb l'antrona i que s'utilitza en l'anàlisi de la composició dels extractes de K_2SO_4 0,5 M en mostres fumigades i no fumigades en la tècnica de determinació de la biomassa per fumigació-extracció (Badalucco et al., 1990, 1992).

El protocol analític que hem seguit està descrit a l'annex i es fruit de la seva aplicació de diversos treballs experimentals sobre contingut en carbohidrats en sòls realitzats a l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona i parteix dels protocol detallat a Kinsbursky et al. (1989). Resumim a continuació aquest protocol:

Per a la determinació de CHT en la hidròlisi es tracta la mostra de sòl amb H_2SO_4 12 M en fred (16 hores) i posteriorment es dilueix a 0,5 M i es manté a 100°C (5 hores). L'hidrolitzat es filtra i es neutralitza. L'extracte dels CHE s'obté agitant la mostra amb K_2SO_4 0,5 M (relació 1/5) (1 hora) i posterior filtració. Per la reacció colorimètrica els monosacàrids reaccionen amb antrona (9,10-dihidro-9-oxoantracè) al 0,1 % en calent (amb un rigorós control del temps i temperatura de reacció) i el complex colorejat que es forma es llegeix a $\lambda=625$ nm; la calibració es fa amb dissolucions patró de glucosa de concentració 0,02-0,12 mg/ml.

5.4.4 Activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa

Per mesurar les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa vàrem triar el mètode més usual per treballs similars al nostre i és la determinació colorimètrica del producte de la hidròlisi de paranitrofenilglucòsids. Com a protocol de referència vam partir pel descrit per Tabatabai (1982) i Eivazi i Tabatabai (1988) i vam incorporant les modificacions proposades por Trasar-Cepeda (1985, 2000b) fruit de la seva experiència amb els assaigs de la β -glucosidasa i de fosfatasa en sòls gallecs (veure apartat 3.1.1.1). L'adaptació d'aquestes modificacions a les nostres mostres és el que estudiem en l'apartat de posada a punt del mètode (apartat 5.5.2.1) per a les nostres mostres i que apareix publicat a Jiménez i Bonmatí (2003).

El mètode descrit es basa en la determinació colorimètrica del p-nitrofenol obtingut per l'acció de l'enzim β -glucosidasa (β -galactosidasa) després d'incubar el sòl amb el substrat β -D-glucopiranosid (β -D-galactopiranosid). Les reaccions dels dos assaigs enzimàtics són:

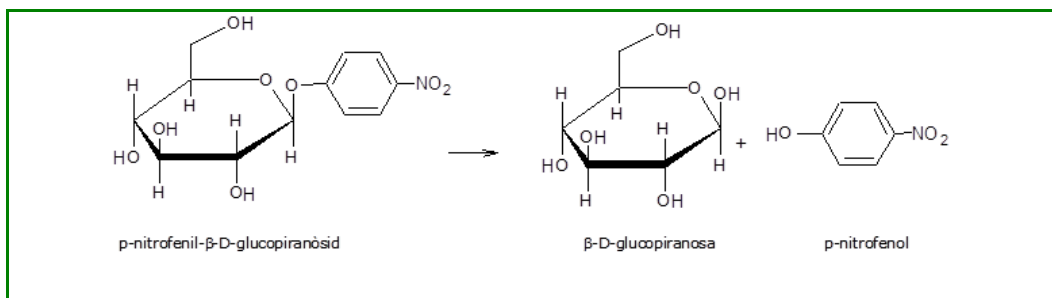


Figura 5.6 Reacció de l'assaig enzimàtic de l'activitat β -glucosidasa (Àlef i Nannipieri, 1995).

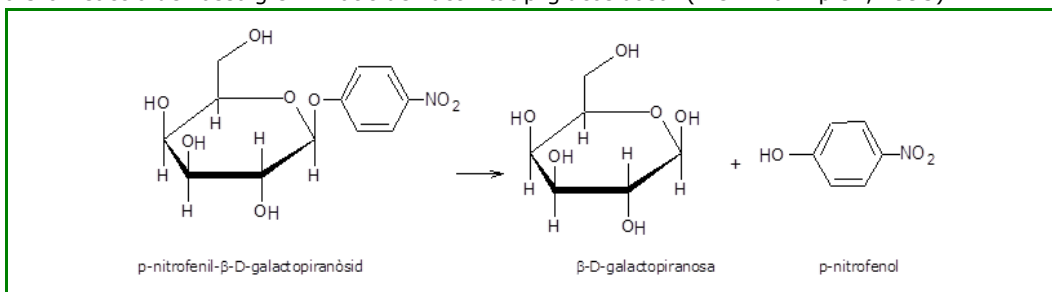


Figura 5.7 Reacció de l'assaig enzimàtic de l'activitat β -galactosidasa.

L'assaig enzimàtic consta de la incubació d'un pes de sòl 1,5 g amb tampó MUB-HCl de pH 6 i substrat 25 mM, que es manté durant 1 hora a 37°C. El p-nitrofenol obtingut s'allibera del sòl després de l'addició de CaCl₂ i solució tampó de pH 12, es separa per filtració i es quantifica per lectura colorimètrica a 400 nm.

Els punts d'especial interès on centrem l'estudi de la tècnica i que desenvolupem en l'apartat de resultats són:

- a. La necessitat de comprovar si el pH de la suspensió s'ajusta al pH desitjat per la reacció enzimàtica: ajust del pH de la suspensió.

La descripció detallada del procediment incorpora, com a punt previ, un assaig per comprovar si la mostra de sòl manté o desplaça el pH del tampó. En aquest assaig previ es fa una mesura del pH de la suspensió sòl-tampó-substrat per tal d'esbrinar si es manté el pH 6 al que s'ha de fer la reacció enzimàtica. Si resulta que la capacitat tamponant de les mostres de sòl és superior a la del tampó afegit, es a dir que no s'ajusta al pH 6 en la suspensió, s'ha de deduir la quantitat d'àcid a partir d'una corba de neutralització que es descriu també com a un punt previ del procediment. Aquest assaig previ i la corba de neutralització (si cal) convé realitzar-lo per cada conjunt de mostres d'una determinada experiència.

- b. El tipus de calibració necessària: patrons amb sòl.

Pel que fa a la calibració, es modifica el mètode de referència atenent als resultats que posen de manifest la capacitat dels sòls d'adsorbir p-nitrofenol (Vuorinen, 1993). La quantitat del p-nitrofenol alliberada es determina a través d'una recta de calibració obtinguda amb patrons de p-nitrofenol en dissolucions que reproduïxen les mateixes condicions que en la mesura de l'activitat incorporant també el sòl. Per aquest motiu la mesura de l'activitat enzimàtica suposa fer paral·lelament a la incubació de les mostres (sòl i substrat) i controls (sòl sense substrat) la incubació també de patrons (sòls sense substrat, però amb patró).

5.5 RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.5.1 Determinació de carboni orgànic per combustió

5.5.1.1 Posada a punt del mètode de determinació de C orgànic

Per a l'estudi de la posada a punt del mètode i de l'instrumental es van considerar els següents paràmetres prefixats d'acord als criteris exposats a l'apartat 5.4.1.1 :

- Determinació del contingut de CT de les mostres per combustió a la temperatura de 900°C sense utilitzar additius.
- Determinació del contingut de CI de les mostres per acidificació amb H₃PO₄ diluït (pH<2) i a la temperatura de 200°C.
- Deducció del contingut de C orgànic per diferència entre CT i CI.
- Anàlisi de la mostra molturada i tamisada pel sedàs 0,250 mm.
- Patrons de glucosa per CT i de Na₂CO₃ per CI.

Els paràmetres estudiats en la posada a punt de la metodologia analítica per CT i CI els presentem agrupats en tres apartats: els que deriven de l'estudi de la calibració, els que resulten de l'anàlisi d'una mostra control de referència i els que deriven de l'anàlisi de les mostres reals.

a. Calibració

Atenent al contingut esperat en carboni total del conjunt de mostres a analitzar, es va fer un estudi de linealitat en el rang de calibració d'interès. Es va estudiar el rang de 0-5 mg C que representa el rang més baix de treball ja que, d'acord a l'instrumental, la resposta és lineal fins a 30 mg de C. En un primer assaig de calibració es van mesurar 7 patrons amb 3 repeticions i l'anàlisi de la recta de regressió va permetre deduir el límit de detecció i de quantificació (Miller i Miller 2000). Posteriorment es van establir, tant per C total com per C inorgànic, els patrons de calibració adients per cadascun del conjunt de mostres. També es va controlar l'estabilitat de la calibració durant 7 hores de treball i la reproductibilitat de la recta de calibració al llarg dels mesos de treball.

b. Mostra control

A partir d'una mostra de sòl de referència, material preparat per el control de qualitat (MAT-SL-0205) i adquirit en el Laboratori de Preparació de Materials pel Control de Qualitat (Mat Control) de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona, es va fer l'estudi de l'exactitud del mètode per a les determinacions de C total i C inorgànic. La mostra correspon a la fracció de sòl <0,090mm i la seva composició elemental s'indica a la Taula 5.5. D'acord a l'informe del material la composició en C, H i S és el resultat de l'anàlisi elemental i el C orgànic s'ha trobat prèvia acidificació de la mostra amb HCl amb digestió a 80°C. El contingut en C inorgànic és 0,55-0,73 % sms.

Per estudiar les característiques d'exactitud i de precisió del mètode vàrem fer rèpliques de les anàlisi de C total i C inorgànic d'aquesta mostra. Com a assaig previ vàrem estudiar la influència del pes de mostra analitzant per quadruplicat pesos d'aquest sòl de: 30, 50, 75 i 100 mg.

Taula 5.5. Interval de concentració per a la determinació de C, H i S en la mostra de sòl control (MAT-SL-0205). Els valors estan expressats en p/p i sms.

Paràmetre	Valors
Carboni total (%)	1,52-1,57
Carboni orgànic (%)	0,84-0,97
Hidrogen (%)	0,47-0,77
Sofre (%)	6,55-7,35

c. Mostres reals

Per tal d'esbrinar si els resultats obtinguts amb la mostra control de referència eren extrapolables a les nostres mostres, amb algunes mostres, vàrem fer l'assaig de precisió i d'influència del pes de mostra. També es vàrem estudiar la reproductibilitat dels resultats de C-total amb l'anàlisi d'una mateixa mostra en cinc dies diferents.

5.5.1.2 Resultats i discussió de la posada a punt del mètode

a. Calibració: linealitat i rangs

D'acord amb els continguts de Carboni total esperat en les mostres (entre 0-5 %) i considerant com a el pes de mostra entre 50-100 mg, es va estudiar la calibració en el rang de 0-5 mg de C. Per a cobrir aquest rang, el pes de glucosa ha de ser inferior a 15 mg i per evitar l'error de pesada, cal fer una dissolució de glucosa. Concretament es va preparar una dissolució de glucosa de 0,03 g/mL i els diferents punts de la calibració corresponen a addicionar a la cubeta els volums de: 0, 20, 50, 100, 200, 300 i 400 μ L. A partir de l'equació de regressió es van establir els límits de detecció i de quantificació (considerant pes de mostra 70-100 mg). Els resultats de l'estudi de linealitat amb aquest set punts i per triplicat es presenten a la Taula 5.6.

Pel que fa a la repetibilitat es va comprovar que la recta de calibració presentava molt poca variació durant un temps de treball de set hores. La fluctuació del valor del pendent va ser de $\pm 0,107$ i del terme independent de $\pm 4,578$, valors inferiors a l'error del pendent i del terme independent.

Taula 5.6. Resultats de l'estudi de linealitat per la determinació de C-total.

Recta de regressió	Límit de detecció i Límit de quantificació
$y = (110,357 \pm 1,545) x + (7,5017 \pm 3,840)$ $R^2 = 0,9992$ Error típic $S_{xy} = 5,703$ On: $y =$ àrea del pic (mV) entre 0-500 mV $x =$ pes de C (mg) entre 0-5 mg	Límit de detecció (LD) $y = 25$ mV i $x = 0,155$ mg C $LD = 0,15-0,20$ % C Límit de quantificació (LQ) $y = 65$ mV i $x = 0,517$ mg C $LQ = 0,50-0,70$ % C

Per tal d'analitzar correctament el carboni total del diferents tipus de mostres vàrem establir tres rangs de calibració (Taula 5.7). Per a l'anàlisi de les mostres control del sòl sauló (COS) és va calibrar amb el rang 1; per les mostres de barreges sòl-fang del sòl sauló (S) i del sòl franc-arenós (Fr) va calibrar amb el rang 2 i per les mostres de sòl argilós (A) i sòl franc (F) es va fer servir el rang 3.

L'estudi de reproductibilitat del conjunt de les rectes de calibració obtingudes va donar els següents valors com a mitjana dels pendents: 124,77, 107,62 i 103,67 respectivament pels rangs 1, 2 i 3 i com a valors de l'ordenada en l'origen 2,29, 13,94 i 20,47. Els valors extrems pel pendent van ser: 124,77 (obtingut en el rang 1) i 95,90 (obtingut en el rang 3); per l'ordenada en l'origen el valor màxim va ser de 32,0 (obtingut en el rang 3) i el mínim de 2,3 (obtingut en el rang 1). El coeficient R^2 va indicar linealitat molt bona i els valors extrems obtinguts van ser 0,9962-1,0000.

D'acord amb els continguts esperats de carboni inorgànic en les mostres (entre 0,15-6 %) es va estudiar la calibració en el rang 0-8 mg de C. Es va cobrir aquest rang, entre 0-1,7 mg de C, amb una dissolució aquosa de Na_2CO_3 i entre 1,7-8mg C per pesada de Na_2CO_3 . Per tal d'analitzar correctament el carboni inorgànic del diferents tipus de mostres vàrem establir tres rangs de calibració (Taula 5.8). Cal destacar que

el rang 1 inclou el límit de detecció i el rang 2 inclou el de quantificació de la tècnica. Per l'anàlisi de les mostres de sòl sauló (S) i franc-arenós (Fr) és va calibrar amb el rang 1 i per les mostres de sòl argilós (A) i el sòl franc (F) es va fer servir el rang 3. El rang 2 es va fer servir per l'anàlisi de la mostra control de referència.

En aquest cas, l'estudi de reproductibilitat del conjunt de les rectes de calibració obtingudes va donar com a valors promig dels pendents 132,40, 125,21 i 106,70 i com a valors de l'ordenada en l'origen 1,50, 2,10 i 5,59 respectivament pels rangs 1, 2 i 3. El coeficient R^2 va indicar linealitat molt bona i els valors extrems obtinguts van ser 0,9975 i 0,9998.

Taula 5.7. Característiques dels rangs de calibració emprats per l'anàlisi de Carboni total en el conjunt de mostres.

Rang	mg/mL glucosa	Patrons: volum (μ L)	mg C
1	10	20-50-100-150	0,08-0,2-0,4-0,6
2	30	20-50-100-150-200-300-400	0,24-0,6-1,2-1,8-2,4-3,3-4,8
3	100	50-100-150-200	2,0-4,0-6,0-8,0

Taula 5.8. Característiques dels rangs de calibració emprats per l'anàlisi de Carboni inorgànic en el conjunt de mostres.

Rang	Patrons: volum/pes		mg C
1	Na_2CO_3 (aq) 20 mg/ml	20-50-100-150(μ L)	0,05-0,11-0,23-0,34
2	Na_2CO_3 (aq) 60mg/mL	20-50-100-200(μ L)	0,14-0,34-0,68-1,36
3	15-30-50-70 mg Na_2CO_3 (s)		1,70-3,40-5,67-7,93

b. Mostra control: influència del pes de mostra, exactitud i precisió

La Taula 5.9 resumeix els resultats de la determinació per quadruplicat del C-total de la mostra control a partir de diferents pesos. A partir d'aquests resultats es pot deduir que el pes de 50-100 mg és adient per a realitzar l'anàlisi de C-total i de 75-100 mg és adient per a realitzar l'anàlisi de C inorgànic.

Taula 5.9. Resultats de l'assaig sobre la influència del pes de mostra en la determinació de C total (CT) i C inorgànic (CI) de la mostra control (n=4). Resultats expressat sms.

Pes mostra (mg)	CT (%)	de	CV (%)	Pes mostra (mg)	CI (%)	de	CV (%)
30	1,11	0,28	24,86	-	-	-	-
50	1,55	0,03	1,91	-	-	-	-
75	1,56	0,02	1,28	75	0,569	0,004	0,74
100	1,56	0,02	1,28	100	0,564	0,010	1,75

Els resultats de l'anàlisi de 10 rèpliques de la mostra control junt amb els paràmetres de precisió i d'exactitud es presenten a la Taula 5.10. Per al càlcul de l'error hem considerat com a valors reals de C de la mostra de referència per C-total 1,55 % i per C orgànic: 0,91 % i com a C inorgànic la diferència entre aquest dos valors 0,64 %.

Taula 5.10. Assaig de precisió i exactitud: Resultats de l'anàlisi de C total i C inorgànic en la mostra control (n=10). Resultats expressat sms.

	Mitjana	Màxim	Mínim	de	CV (%)	Error absolut	Error relatiu (%)
C total (%)	1,53	1,56	1,49	0,02	1,41	-0,02	-1,08
C inorgànic (%)	0,57	0,58	0,55	0,01	1,36	-0,06	-9,39
C orgànic (%)	0,96	0,99	0,92	0,02	2,24	0,06	6,08

Pel que fa a l'exactitud els resultats són correctes ja que les mitjanes de C total ($1,53 \pm 0,012$) i C orgànic ($0,96 \pm 0,012$) estan d'acord amb l'interval on es troba el valor real (1,52-1,57 % per C total i 0,84-0,97 % per C orgànic). S'observa, però, que el valor experimental de C-total es situa en el mínim d'aquest interval i el de C orgànic en el màxim. Veiem, doncs, que el valor de C orgànic queda sobrevalorat a causa de que l'error per defecte en la determinació del C inorgànic és important.

Pel que fa als resultats del coeficient de variació, la precisió dels mètodes de CT i CI es poden considerar bones (entren dins dels requisits de la normativa (UNE 77321:2003) que tolera un màxim de 10 % com a valor de CV per l'assaig de repetibilitat). Hem de tenir present, però, que el valor de C orgànic té una menor precisió ja que es dedueix per diferència.

c. Mostres: influència del pes de mostra i assaig de precisió

La Taula 5.11 resumeix els resultats de la determinació per quadruplicat del C total d'una mostra de sòl (sòl control argilós, COA) a partir de diferents pesos. A partir d'aquests resultats es pot deduir que, igual que amb la mostra control, el pes de 50-100 mg és adient per a realitzar l'anàlisi de C total.

Taula 5.11. Resultats de l'assaig de la influència del pes de mostra en la determinació de C total en la mostra COA (n=4). Resultats expressat sms.

Pes de mostra (mg)	C total (%)	s	CV (%)
30	6,16	0,012	0,19
60	6,24	0,059	0,95
90	6,23	0,036	0,58

Els resultats de l'anàlisi de 5 rèpliques de dues mostres reals amb els paràmetres de precisió es presenten a la Taula 5.12. Els resultats de precisió són correctes i molt semblants als obtinguts amb la mostra control de referència.

Taula 5.12. Assaig de precisió: resultats de l'anàlisi de C total i C inorgànic dues mostres reals (n=5). Resultats expressat sms.

Mostra		Mitjana	Màxim	Mínim	de	CV(%)
1	C total (%)	7,58	7,71	7,53	0,08	1,00
	C inorgànic (%)	4,85	4,97	4,79	0,07	1,48
	C orgànic (%)	2,73	2,86	2,68	0,08	2,79
2	C total (%)	6,24	6,33	6,22	0,05	0,71
	C inorgànic (%)	5,45	5,56	5,44	0,07	1,31
	C orgànic (%)	0,79	0,88	0,75	0,05	5,66

En els resultats de l'assaig de reproductibilitat per una de les mostres anteriors (mostra 2 i n=5) comprovem que amb un valor mitjà de C total de 6,24 % (sms) els valors mínim i màxim són de 5,76 % i 6,47 % respectivament, la desviació estàndard és més alta (de=0,28) i el CV resulta ser de 4,49 %. Aquest resultat està d'acord amb els resultats d'altres assaigs de reproductibilitat (UNE 77321:2003).

5.5.1.3 Contrast dels resultats de C orgànic obtinguts per combustió amb els valors de C-oxidable en les mostres de sòl-fang

Presentem en aquest apartat els resultats de carboni orgànic de les barreges sòl-fang obtinguts a través dels dos mètodes analítics, la combustió i l'oxidació amb la barreja sulfocròmica. Per diferenciar els resultats dels dos mètodes d'anàlisi del carboni, anomenem **Total Orgànic Carbon (TOC)** el valor de carboni orgànic obtingut per combustió (d'acord al mètode que s'ha posat a punt) i de **carboni orgànic (Corg)** l'obtingut mitjançant oxidació. Hem de tenir present aquest valor de Corg correspon a la determinació del **carboni oxidable (Cox)** i l'aplicació del factor 1,29 (**Cox · 1,29 = Corg**).

En les figures 5.8 i 5.9 presentem els valors de TOC i de Corg (mitjanes d'un mateix tractament) per cadascuna de les mostres, en els diferents temps de mostreig, per les dues experiències, en lisímetres i en parcel·les. La comparació de les mitjanes s'ha fet amb el test de t de Student considerant per cadascuna la seva pròpia variabilitat. La diferències significatives d'acord a aquest test ($P < 0,05$) s'indica amb un asterisc. Les mostres control de sòl sauló (COS) no s'han inclòs en l'estudi ja que els valors de TOC per aquestes mostres són inferiors al límit de detecció de la tècnica.

Pels casos en que es detecten diferències significatives entre els valors de les mitjanes obtingudes a través de les dues metodologies analítiques calculem el valor de la relació **TOC/Cox** (quocient entre les mitjanes d'un mateix tractament) (Taulas 5.13 i 5.14). Aquest quocient ens indica la discrepància del valor 1,29 assumit com a factor de transformació del C-oxidable al C orgànic del mètode Walkley-Black i pot representar un índex d'oxidabilitat de la matèria orgànica de la mostra (Macias et al., 2004).

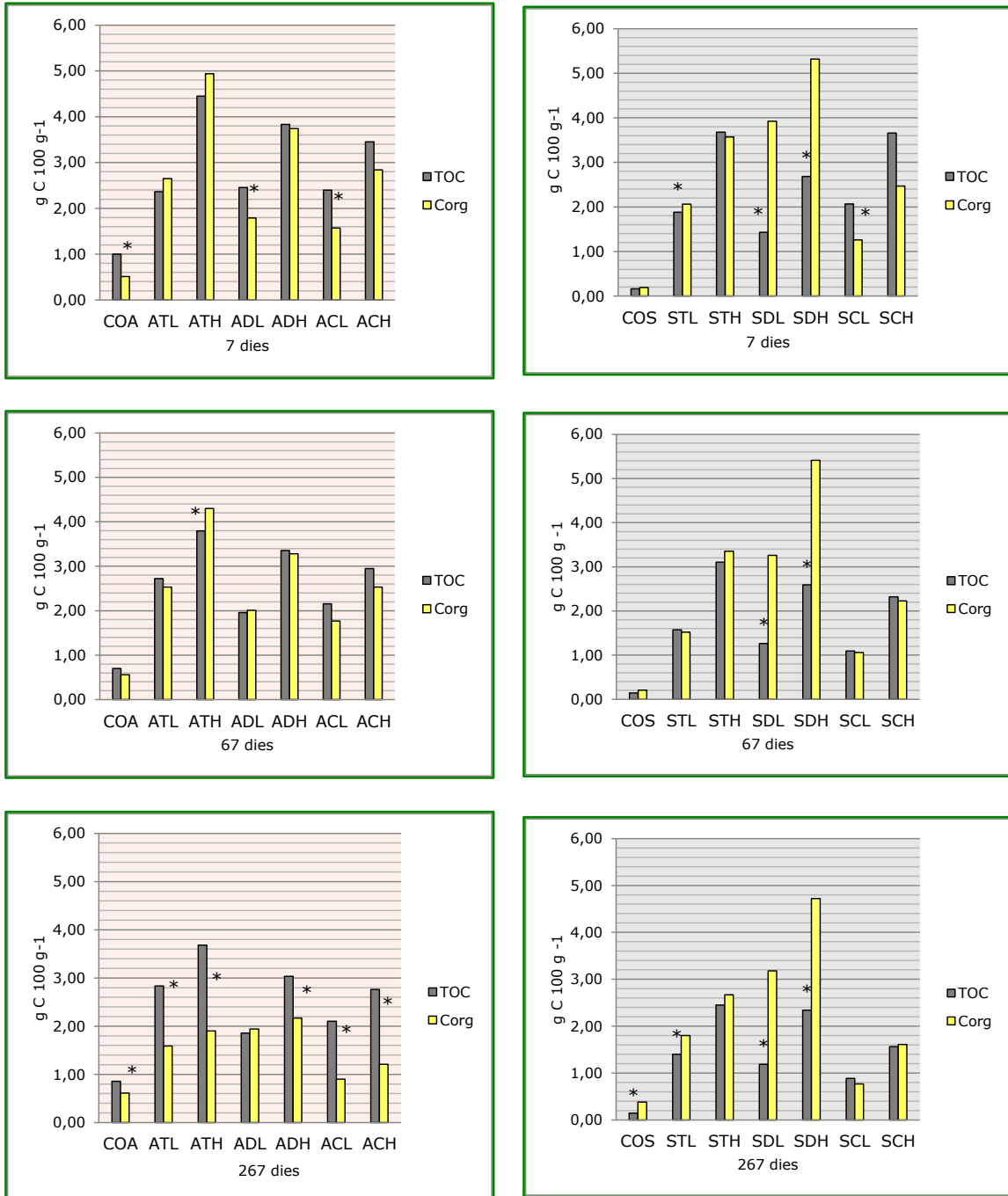


Figura 5.8 Resultats de carboni orgànic d'acord als mètodes analítics de combustió (TOC) i d'oxidació (Corg). Mostres de l'experiència en lisímetres. (*) indica diferència significativa d'acord a aquest test de t (P<0,05).

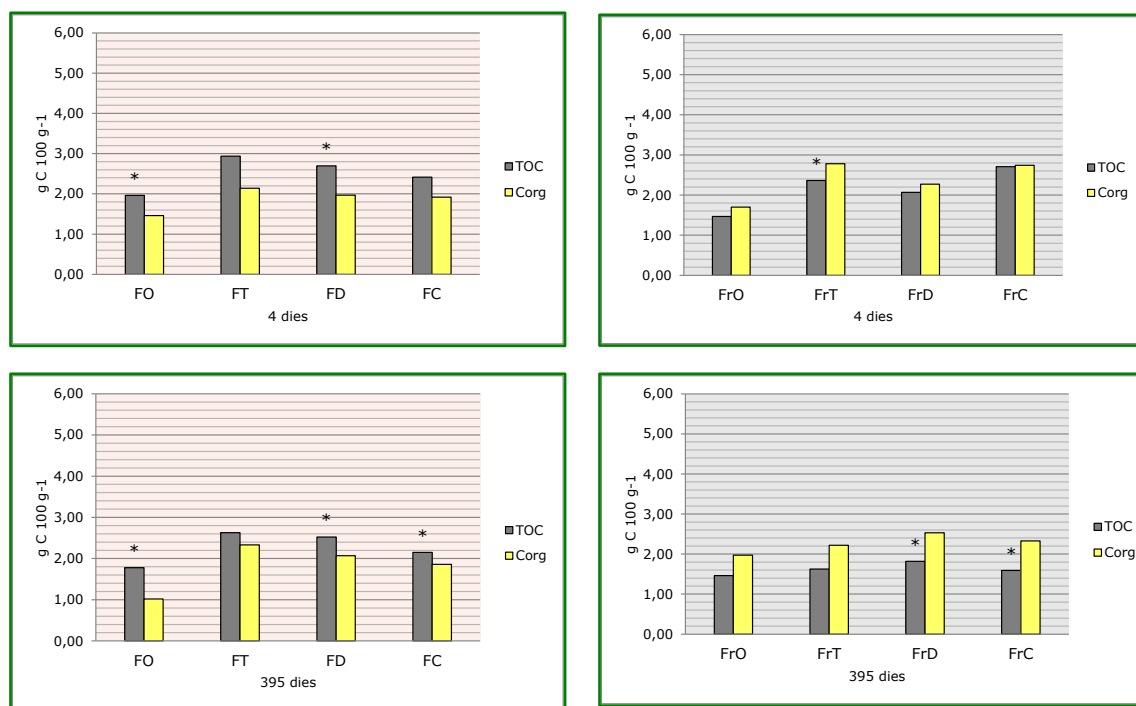


Figura 5.9 Resultats de carboni orgànic d'acord als mètodes analítics de combustió (TOC) i d'oxidació (Corg). Mostres de l'experiència en parcel·les. (*) indica diferència significativa d'acord a aquest test de t ($P < 0,05$).

Taula 5.13. Valor del quocient entre el valor de C orgànic obtingut per combustió i el C-oxidable (TOC/Cox) per les mostres de l'experiència en lisímetres.

Dies	Sòl argilós							Sòl sauló					
	COA	ATL	ATH	ADL	ADH	ACL	ACH	STL	STH	SDL	SDH	SCL	SCH
7	2,53			1,77		1,97		1,18		0,47	0,65	2,12	
67			1,14							0,50	0,62		
267	1,81	2,30	2,50		1,80	3,01	2,95	1,00		0,48	0,64		

Les mostres sense valor del quocient no presenten diferències significatives entre els resultats de TOC i Corg.

Taula 5.14. Valor del quocient entre el valor de C orgànic obtingut per combustió i el C-oxidable (TOC/Cox) per les mostres de l'experiència en parcel·les.

Dies	Sòl franc				Sòl franc-arenós			
	FO	FT	FD	FC	FrO	FrT	FrD	FrC
4	1,73		1,76			1,10		
395	2,25		1,57	1,49			0,93	0,88

Les mostres sense valor del quocient no presenten diferències significatives entre els resultats de TOC i Corg.

Per a **la interpretació de les diferències** entre els dos resultats de carboni hem de tenir present els següents aspectes relacionats amb les mancances de les dues tècniques analítiques ja tractats en apartats anteriors:

- Les discrepàncies entre els valors de TOC i Corg s'expliquen a partir del principi del mètode d'oxidació que admet la necessitat d'aplicar un factor de recuperació que varia en funció del sòl.
- En general s'assumeix com a valor central de 1,29 considerant que en promig es determina el 77 % del carboni orgànic (Nelson i Sommers, 1982; Jackson, 1982; Porta et al., 1986; Rosell et al., 2001; Macias et al., 2004). Així, valors de TOC>Corg correspondrien a mostres on el procés d'oxidació no ha arribat a oxidar el 77 % del carboni orgànic i valors de TOC<Corg correspondrien a mostres on l'oxidació química de les formes de carboni orgànic ha estat superior al 77 % del total.
- D'acord a la bibliografia, els valors extrems d'aquest percentatge d'oxidació del carboni orgànic, en funció del tipus de sòl, són d'un 44 %, amb un valor del factor de recuperació de 2,27, i d'un 92 % amb valor pel factor de recuperació de 1,09 (Nelson i Sommers, 1982).
- Els valors de C orgànic obtinguts per oxidació poden ser sobreestimats atenent als errors metodològics associats a la determinació de carboni orgànic com a conseqüència de la presència d'interferències (compostos amb caràcter reductor) i els derivats de la fórmula de càlcul on s'ha d'assumir un valor mitjà pel grau d'oxidació del C present a la MO; atenent a aquesta sobreestimació, el valor del factor de recuperació pot ser inferior a 1 (Jackson, 1982; Nelson i Sommers, 1982; Saña, 1985; Porta et al., 1986; Rosell et al., 2001; Macias et al., 2004).
- Els valors de C orgànic per combustió poden ser sobreestimats en sòls carbonatats si la descomposició tèrmica dels carbonats no es completa ja que el valor de TOC s'obté per diferència (Nelson i Sommers, 1982; Bisutti et al., 2004); en aquest casos, el valor del factor de recuperació seria falsament més alt. En aquest sentit, en l'apartat de posada a punt hem vist que en la determinació de TOC l'error relatiu és del 6 %.

Com a **tendència general** s'observa que en les barreges de sòl tipus arenós el valor de Corg és més alt que el TOC i al revés el Corg és inferior al TOC en les barreges dels sòls de textura més argilosa; cal destacar que aquestes diferències, entre els dos valors de carboni orgànic, són més importants en les mostres de l'experiència en lisímetres que en la de camp. D'acord amb els resultats podem dir que globalment per la meitat dels casos (per 27 de les 55 mostres analitzades en total) les diferències detectades entre els valors de TOC i Corg són significatives; aquestes diferències són en el sentit assenyalat com a general, excepte per dues mostres. La distribució de les mostres que han presentat diferències significatives és: 4 mostres del sòl control argilós, 11 barreges sòl tipus argilós i 12 barreges de sòl tipus sorrenc.

Aquests resultats posen de manifest la incidència del tipus de sòl en el grau d'oxidació de les formes de carboni orgànic. Concretament en el sòls tipus sorrenc semblaria que la MO (del sòl i del fang) és més accessible a l'oxidació química i en canvi en el sòl

tipus argilós podríem dir que la MO menys accessible a la oxidació química i es posa de manifest que l'associació de la MO amb l'argila (que queda adsorbida en la superfície reactiva d'aquestes partícules) propicia un tipus de protecció que la fa especialment resistent al procés d'oxidació. Cal destacar aquí que, al ser els sòls argilosos rics en carbonats, l'error de sobreestimació del valor de TOC se suma a aquest efecte, en el mateix sentit. A més a més, el fet de comparar dos sòls de classe textural més diferenciada en l'experiència en lisímetres que en l'experiència de camp explicaria que les diferències entre els dos valors de carboni orgànic són més importants en les mostres de l'experiència en lisímetres que en la de camp.

Globalment, **el valor del quocient TOC/Cox**, per les barreges sòl-fang, posa de manifest que en la meitat dels casos el factor de recuperació pren valors per sota de 1,29 i sempre (excepte un cas) per les barreges amb sòl tipus arenós i per l'altra meitat és superior a 1,29 i corresponen a barreges amb sòl tipus argilós (excepte un cas). La relació TOC/Cox, per les 27 mostres on les diferències són significatives, oscil·la entre un valor mínim de 0,47 i un valor màxim de 3,01. Per 14 mostres el valor del factor quedaria dins el rang que admet la bibliografia (1,09-2,27) (Nelson i Sommers, 1982) i 13 mostres presenten un valor fora d'aquest rang (5 per sobre i 8 per sota).

Les cinc mostres que presenten un grau d'oxidabilitat especialment baix són mostres de l'experiència en lisímetres amb el sòl argilós, concretament el sòl control inicial i les barreges sòl-fang tèrmic i sòl-fang compostat al final del període controlat. Aquest fet fa pensar que la MO d'aquestes barreges al final era especialment resistent i/o es presentava molt associada a les argiles i que la de sòl control va evolucionar en sentit contrari.

De les vuit mostres que presenten un valor de TOC/Cox inferior a 1,09 destaquen totes les 6 barreges del sòl sauló-fang deshidratat de l'experiència en lisímetres. Creiem que aquest valors han d'estar lligats a alguna singularitat del fang deshidratat. Els valors de Corg en aquestes barreges són molt superiors respecte de TOC i les diferències s'accentuen en la dosi alta.

Aquests resultats es poden explicar per la presència d'una interferència positiva en el procés d'oxidació del C orgànic amb la barreja sulfocròmica. D'acord amb la bibliografia podria interferir la presència de substàncies reductores com Cl^- , Fe^{2+} (i també Fe^0), Mn^{2+} i S^{2-} . Hem de tenir present, però que, si existís alguna d'aquestes substàncies en el fang deshidratat, possiblement haurien de ser oxidades en els processos de l'assecat i compostatge del fang ja que en les barreges amb fang T i C no es detecten. Per altra banda, però, es mantindrien com a interferència durant tot el període d'incubació controlat, i no és posarien de manifest en el cas de les incubacions amb el sòl argilós ni en l'experiència de camp. Això fa pensar que les condicions d'aireació serien diferents en les incubacions de les barreges S-D i A-D i/o en el paper del efecte protector/retenció de les argiles amb aquest ions reductors o bé fixats com a carbonats

Una possible justificació dels valors anormalment alts de Corg respecte al valors de TOC en aquestes barreges la trobem en l'apartat 4.4.1.2 on hem assenyalat una dinàmica de la MO diferent en les barreges amb fang D en el sòl S. Concretament hem apuntat una possible via anaeròbica de transformació (putrefacció) del N que hauria provocat la presència de productes finals (amoni, amines, àcids orgànics, mercaptans i H_2S) amb caràcter reductor.

L'anàlisi global dels resultats ens porta a concloure que les diferències entre els valors de carboni orgànic entre les dues metodologies depenen del tipus de sòl (textura i carbonats), del tipus de fang afegit i de la evolució de la MO amb el temps. D'acord als nostres resultats, globalment, els valors de C orgànic obtinguts pel procediment de Walkley-Black poden representar un percentatge d'error respecte el valor de TOC que oscil·la entre un +50 % i -50 % (i excepcionalment un +100 %) si les mostres s'allunyen molt de l'oxidabilitat mitjana del 77 % i d'entre un +20% i -40 % si s'assumeix la variabilitat que indica la bibliografia pel factor de recuperació de les mostres.

Si analitzem amb més detall **la influència del tipus de fang aplicat** tenim que d'un total de 16 tipus de mostres analitzades per cada fang, han presentat diferències significatives 11 barreges de fang D, 6 barreges de fang C i 6 barreges de fang T. Les barreges amb D prenen majoritàriament (7 de les 11) valors del factor de recuperació inferiors a 1,29 i les barreges amb el fang C presenten, excepte en un cas, valors superiors al de 1,29. Les barreges amb fang T presenten 3 casos amb valors inferiors a 1,29 i tres casos amb valors superiors a 1,29.

La incidència del tipus de fang en les diferències entre els valors de carboni trobats per ambdues tècniques es poden interpretar atenent al diferents tipus de MO aportada i per tant pel diferents grau d'oxidabilitat (Saña, 1985); creiem, però, que també cal tenir en compte la presència de substàncies reductores del material o generades en les barreges (com pot ser l'amoni).

Les desviacions de les barreges amb fang C, que majoritàriament són superiors a 1,29, són indicatives de què aquest fang té una MO més resistent a l'oxidació química (que es fa especialment notori en els sòls tipus argilós). Aquest estaria d'acord amb l'estabilització del fang pel postractament de compostatge (Senesi, 1989; Soliva, 2001). Les desviacions dels resultats de carboni entre els dos mètodes en les barreges amb fang T no són tant clares ja que són les que mostres més dependència del tipus de sòl (per mostres de sòl tipus sorrenc el factor d'oxidabilitat és inferior a 1,29 i en canvi és superior a 1,29 en mostres de sòl tipus argilós especialment en el cas de mostres de lisímetres). L'oxidabilitat de la MO aportada per aquest fang és en principi alta, però està subjecta a l'accessibilitat o grau d'associació amb el sòl; veiem que aquest fet fins i tot podria justificar que un mateix fang pugui comportar-se de diferent manera en funció de la textura del sòl amb el que s'ha barrejat. El tipus de fang que causa més desviacions entre els resultats de carboni entre els dos mètodes d'anàlisi és, com ja hem vist, el fang D i aquesta singularitat es posa de manifest especialment a través dels resultats de barreges de sòl sauló.

L'estudi sobre la incidència del factor metodològic sobre el resultat de carboni orgànic ens aporta indirectament dades sobre l'evolució de l'**oxidabilitat de la matèria orgànica** de les mostres i que estan d'acord amb el que ja hem discutit en els apartats corresponents del capítol 4, 4.4.1.2 i 4.4.2.2 sobre les característiques de la MO en les barreges sòl-fang de l'experiència en lisímetres i en parcel·les. Així tenim que:

- i. Inicialment, i també al final en el cas de l'experiència en parcel·les, la matèria orgànica del sòls controls tipus argilós és menys oxidable que la de les barreges sòl-fang.

- ii. Les barreges de sòl i fang assecat tèrmicament són inicialment les que presenten la matèria orgànica més oxidable; aquestes barreges presenten al final una matèria orgànica menys oxidable que a l'inici en el cas que la mineralització hagi estat important (FrT) o bé pel procés d'estabilitzador de l'argila (ATH i ATL).
- iii. Les barreges de fang compostat i sòl tipus argilós es fan més estables, menys oxidables amb el temps; en canvi amb el sòl tipus arenós, on la mineralització és superior, la MO restant és més oxidable o sigui que pot haver sofert un procés de simplificació que creiem pot ser atribuïble a la baixa proporció de formes làbils de Carboni.
- iv. Les barreges de sòl i fang deshidratat, amb el temps, en general, augmenten el grau d'oxidabilitat de la MO, fet atribuïble a la necessitat d'un procés de simplificació d'un tipus de MO aportada poc transformada.

5.5.2 Determinació de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa

5.5.2.1 Posada a punt del mètode

Per a l'estudi de la posada a punt del mètode es van considerar com a paràmetres prefixats les modificacions proposades por Trasar-Cepeda (1985, 2000) al protocol de referència de Tabatabai (1982) i Eivazi i Tabatabai (1988) en els assaigs de la β -glucosidasa en sòls gallecs (apartat 3.1.1.1) a excepció del pH (vam mantenir el pH de 6 com a pH òptim). Els paràmetres estudiats en la posada a punt de la metodologia analítica els presentem agrupats en els tres apartats següents:

a. Condicions de lectura del pNF

Com a punt de partida es van estudiar els espectres d'absorció del patró para-nitro fenol (pNF) i dels substrats de cadascuna de les activitats enzimàtiques (p-nitrofenil β -D-glucopiranosid i p-nitrofenil β -D-galactopiranosid). A partir de les seves característiques vàrem determinar quina és la composició adient del blanc de reactius per fer la lectura colorimètrica ja que no venia especificat en els protocols.

Donat que el pH de lectura té incidència en el valor d'Absorbància del pNF, es va fixar també la dilució adient de l'extracte que s'ha d'aplicar a les mostres que presentin un valor d'Absorbància fora del rang de patrons ja que hi havia dues opcions segons els protocols.

b. Sistema de calibració

Estudiem el sistema de calibració recomanat per aquestes activitats que comporta efectuar les rectes de calibració amb la mostra de sòl de la qual es mesura l'activitat (Trasar-Cepeda, 1985; Vuorinen, 1993). Fem la comparació de les rectes de calibració, recta sense sòl i recta amb sòl, per tal de posar de manifest la capacitat d'adsorció del p-nitrofenol i la seva incidència en el resultat.

c. Adaptació de la metodologia a les mostres

Considerem també part de la posada a punt els resultats obtinguts pels paràmetres de la tècnica que depenen del tipus de mostra. Així estudiem l'ajust del pH de la suspensió i les corbes de neutralització derivades, així com les característiques de les rectes de calibració pel conjunt de mostres analitzades en la tesi.

5.5.2.2 Resultats i discussió de la posada a punt del mètode

a. Condicions de lectura del pNF

Pel que fa les condicions de lectura del producte de la reacció de l'assaig enzimàtic ens preguntem *Quina és la composició del blanc de reactius per fer la lectura colorimètrica? i Com fer la dilució quan la lectura queda fora de rang?*

Per respondre aquestes preguntes estudiem els espectres d'absorció del pNF i dels substrats i els efectes de la dilució de l'extracte.

L'assaig de la activitat enzimàtica es basa en la mesura de l'Absorbància ($\lambda = 400$ nm) del p-nitrofenol (pNF) alliberat de la reacció; donat que el p-nitrofenol és el producte de la reacció i es mesura en presència de l'excés de substrat, comprovem la interacció d'absorció que pugui existir entre aquests dos compostos a la λ de lectura. Amb aquest objectiu estudiem separatament l'absorció dels substrats (p-nitrofenil β -D-glucopiranosid o bé p-nitrofenil β -D-galactopiranosid) l'absorció del pNF i l'absorció conjunta del substrat + pNF.

En la Figura 5.10 es representa **l'espectre d'absorció de pNF** (4 concentracions) i la seva superposició a la del substrat, p-nitrofenil β -D-glucopiranosid, de solucions que reproduïxen les condicions de lectura de l'assaig enzimàtic. S'observa que el pNF té un clar màxim d'absorció a 400 nm, però que la lectura de l'Absorbància a aquesta longitud d'ona hi ha contribució del substrat. Els espectres corresponents a l'absorció conjunta del pNF i el substrat p-nitrofenil β -D-glucopiranosid es representen a la Figura 5.11 i aquests indiquen que la lectura a 400 nm no es correspon a un màxim d'absorció. El mateix resultat es va obtenir per a el substrat p-nitrofenil β -D-galactopiranosid. Aquests resultats experimentals, respecte de les condicions de lectura del pNF en les condicions de l'assaig enzimàtic, posen de manifest que la presència de substrat afecta a la lectura del pNF, producte de la reacció enzimàtica.

Com a alternativa al procediment establert, i per millorar les condicions de lectura a un màxim d'absorció, pensem en la possibilitat de compensar l'absorció del substrat en el moment de fer la lectura. Així estudiem la correcció de l'absorció del substrat en el moment de la lectura, a través de la seva compensació amb un blanc de reactius que inclogui també el substrat, a la cubeta de referència. Aquesta opció podrà ser especialment interessant quan l'objectiu sigui determinar les dues activitats alhora (i simplificar el procediment compartint la mateixa recta de calibració en l'assaig de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i la β -galactosidasa).

D'acord a l'espectre resultant és similar al del pNF (Figura 5.12) i les lectures a 400 nm es corresponen a un màxim d'absorció. D'acord als resultats de la Taula 5.15 les linealitats són bones i equivalents en tots els casos.

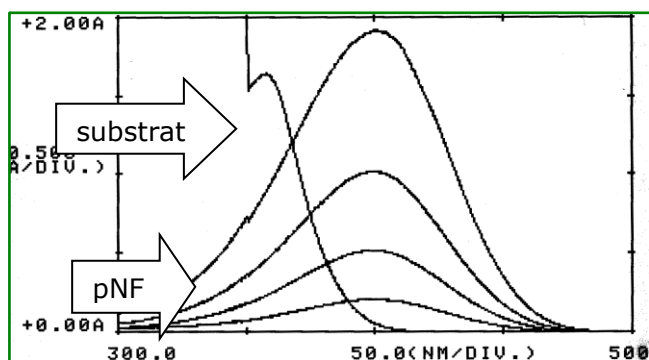


Figura 5.10 Superposició dels espectres d'absorció del substrat p-nitrofenil β -D-glucopiranosid i del pNF a diferents concentracions.

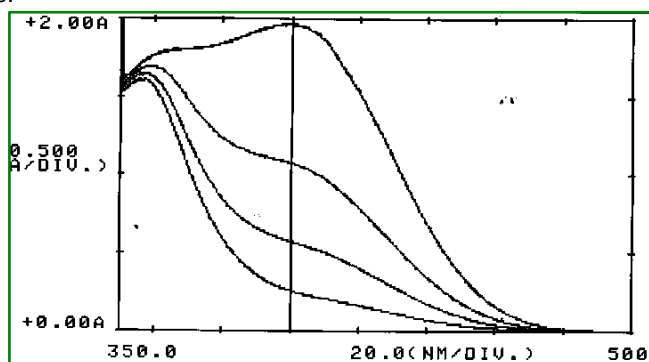


Figura 5.11 Espectre de l'absorció conjunta del substrat p-nitrofenil β -D-glucopiranosid i del pNF a diferents concentracions.

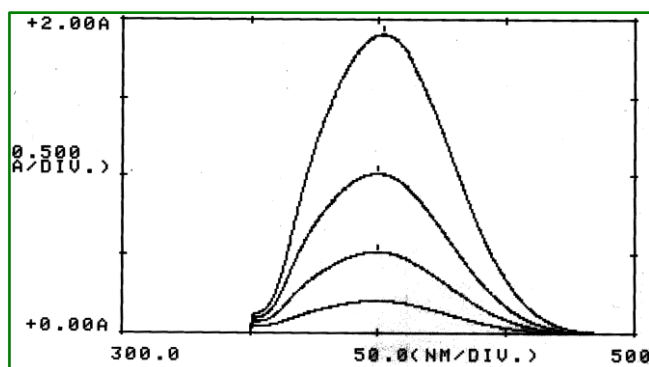


Figura 5.12 Espectres d'absorció conjunta del substrat i el pNF, a diferents concentracions, davant la presència de substrat a la cubeta de referència.

Taula 5.15. Influència de la compensació de l'absorció del substrat en la recta de calibració (y , Absorbància a $\lambda = 400$ nm i x , $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pNF).

	Recta de regressió	R^2
Absorció de (pNF + sGLC)	$y = (0,0095 \pm 0,0002)x + (0,0905 \pm 0,024)$	0,9985
Absorció de (pNF + sGLC) amb substrat compensat	$y = (0,0094 \pm 0,0002)x + (0,0413 \pm 0,022)$	0,9987
Absorció de (pNF + sGAL) amb substrat compensat	$y = (0,0094 \pm 0,0002)x + (0,0427 \pm 0,022)$	0,9987

Substrat sGLC, p-nitrofenil β -D-glucopiranosid; substrat sGAL, p-nitrofenil β -D-galactopiranosid.

Aquests resultats indiquen que l'opció estudiada és vàlida i per tant podem fixar com a composició alternativa de l'anomenat blanc de reactius (dissolució amb la qual s'omplirà la cubeta de referència per a la mesura de l'Absorbància en l'assaig enzimàtic) com a:

Blanc de reactius =
4 mL tampó + 2 mL d'aigua + 1 mL substrat + 1 mL CaCl₂ + 4 mL extractant

En aquest cas, el blanc de reactius compensa en les lectures de les mostres i patrons bàsicament l'absorció del substrat i també la possible absorció del pNF del substrat i l'absorció deguda a la hidròlisi química del substrat.

Aquesta opció és la que incorporem al treball (annex de tècniques) i té com a punt positiu que fa les mesures en un màxim d'absorció i que de cara a llegir les dues activitats alhora facilita que la recta de calibració valgui per les dues activitats perquè s'anul·la l'efecte del substrat.

Com a segon aspecte estudiem com s'ha de fer la **dilució de l'extracte** quan la lectura surt del rang de patrons. El mètode de referència (Tabatabai, 1982) proposa l'ús d'una solució diluent, de pH 10 i nosaltres estudiem com alternativa l'efecte de la dilució amb aigua seguint el protocol de Trasar-Cepeda (no publicat) i donada la dependència de la lectura d'Absorbància amb el pH.

Primer mesuram el valor de pH al qual es fa la lectura del pNF en les condicions de l'assaig enzimàtic i és de 8,73. Comprovem que una dilució 1/5 amb aigua destil·lada no comporta variació en el pH de lectura i en canvi la dilució amb diluent fa que el pH de lectura s'incrementi fins a pH 10,01.

Posteriorment estudiem amb patrons l'efecte que la dilució té en la mesura de l'Absorbància. Fem les lectures directes i lectures de les dilucions sempre davant de la cubeta de referència també diluïda. Comprovem que la dilució 1/5 amb aigua redueix 4,9 vegades el valor d'Absorbància respecte de la lectura directa. Les dilucions fetes amb diluent comporten valors sempre més alts d'Absorbància en 0,008 unitats (degut a què el pH també és més alt) i per tant la relació d'Absorbància respecte de la lectura directa s'allunya més de 5, passa a ser de 4,7.

Per últim, confirmem els mateixos resultats anteriors mesurant l'Absorbància en l'extracte d'una mostra on s'ha fet l'assaig enzimàtic. En aquest cas, les lectures dels extractes diluïts amb diluent són encara superiors (0,016 unitats d'Absorbància) a les de dilucions amb aigua destil·lada.

Com a conclusió proposem que la dilució dels extractes amb aigua destil·lada, i la seva lectura davant de la cubeta de referència també diluïda, és una bona opció per mesurar l'Absorbància en aquests casos on es superi els valors de lectura d'acord amb el rang lineal de calibració.

b. Sistema de calibració

Pel que fa al sistema de calibració de l'activitat enzimàtica ens preguntem, *Com és i què mesura la recta de calibració amb sòl? Quina incidència té sobre el resultat de l'activitat?*

El sistema de calibració s'ha assenyalat com un dels punts importants de la tècnica descrita i deriva de capacitat dels sòls d'adsorbir el p-nitrofenol (Vourinen, 1993). Aquest fet suposa que la lectura colorimètrica que es fa al final de l'assaig enzimàtic correspon no a la totalitat de pNF produït si no al total menys l'adsorbit; fet que tindrà implicacions en el sistema de calibració a aplicar. S'ha d'obtenir doncs, una recta de calibració amb la mostra de sòl. El fenomen d'adsorció del pNF pels sòls s'haurà d'investigar per a cada tipus de mostra ja que dependrà de les seves

característiques físiques. L'abast d'aquest fenomen l'estudiem comparant la rectes de calibració sense sòl i amb sòl (per una mostra determinada).

Si tenim en compte, en la recta de calibració amb sòl, el fenomen d'adsorció del pNF, en la lectura d'Absorbància, podem distingir dos components com a possibles contribuents de la lectura total d'Absorbància :

- ✓ Component A= pNF lliure que correspon al produït per la reacció enzimàtica (o bé afegit com a patró) menys l'adsorbit pel sòl.
- ✓ Component B = Absorció de les substàncies colorejades (aromàtics) pròpies del sòl.

En la Taula 5.16 esquematitzen aquestes dos components comparativament per mostres (on té lloc la reacció enzimàtica durant la incubació), controls (on no té lloc la reacció enzimàtica ja que el substrat s'afegeix després de la incubació) i patrons (que són equivalents als controls, però amb addicions del patró pNF).

Taula 5.16. Component de l'absorció mesurada en l'assaig enzimàtic per mostres, controls i patrons (davant del blanc de reactius amb substrat com a referència).

Components de l'absorció		A		B
		pNF de l'activitat o del patró	pNF adsorbit	Aromàtics del sol
Mostra	Absorbància existent	Si	Si	Si
	Absorbància llegida			
Controls	Absorbància existent	No	No	Si
	Absorbància llegida	No	No	
Patrons	Absorbància existent	Si	Si	Si
	Absorbància llegida			

Per visualitzar les característiques del component llegit en la recta amb sòl (A + B) davant l'existent en una recta sense sòl convencional (només part de component A) representem gràficament les dues opcions en el cas de l'activitat β -glucosidasa d'una mostra (Figura 5.13).

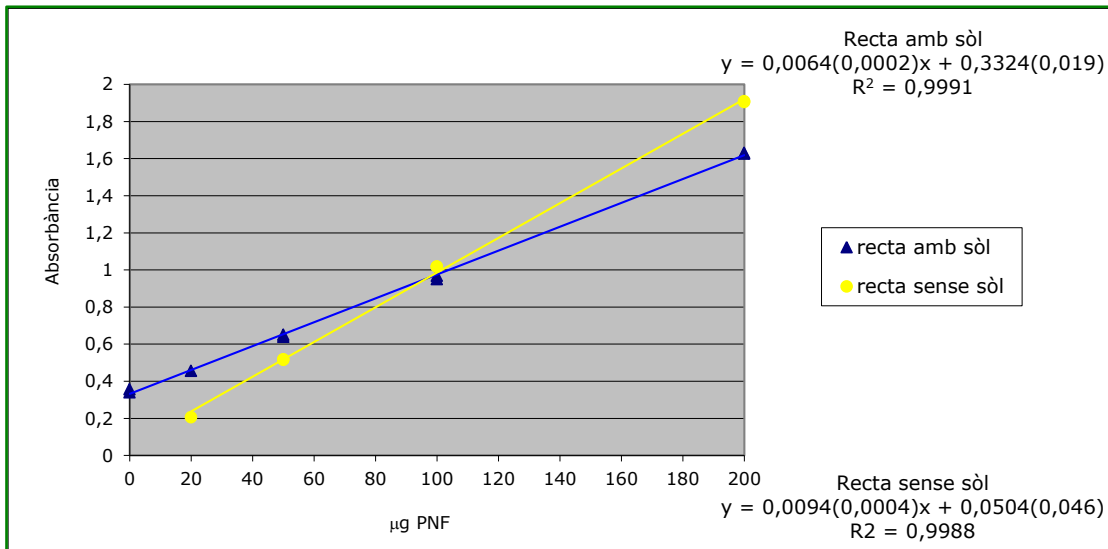


Figura 5.13 Activitat β -glucosidasa : representació gràfica de la recta de calibració sense sòl i d'una recta amb sòl (MN, sòls naturals).

Els resultats indiquen que en la recta amb sòl el pendent és inferior i el terme independent és superior a la recta de calibració sense sòl. Aquests resultats són coherents amb el fenomen d'adsorció del pNF. Pel que fa al valor de l'ordenada en l'origen el valor és més alt donada el component d'absorció d'aromàtics del sòl.

Hem de tenir present que un canvi en el pendent demostra que a més pNF, més queda adsorbit o sigui que el fenomen no es constant sinó proporcional; en aquest cas la disminució d'Absorbància de les lectures amb sòl respecte a les que tindrien sense sòl, està entre 20-30 % segons la concentració. D'acord amb Vourinen (1993) l'adsorció de pNF pot variar entre el 4 i el 28 %, atenent al tipus de mostra i és més acusada en les de més alt contingut en matèria orgànica.

Si ens fixem en la repercussió que la calibració pot tenir en el resultat d'activitat enzimàtica veiem que en aquest cas, on la diferència entre els pendents és molt acusada, la diferència en el valor final de l'activitat entre calibrar amb una o altra recta es del 47 % (és el percentatge que representa l'increment obtingut fent la calibració amb recta amb sòl respecte al valor que s'obtingria si s'hagués fet calibració sense sòl)

A partir del conjunt de valors de lectures de patrons, mostres i controls hi ha diferents opcions de càlcul de la recta de calibració per deduir el valor de l'activitat neta (veure annex). En qualsevol cas és important tenir present el que es pot deduir a partir de la Taula 5.16:

- ✓ El que interessa quantificar és el component A, és el que ens informarà directament de l'activitat neta.
- ✓ L'absorció deguda al sòl (component B) es coneix a partir de la lectura dels controls.
- ✓ Per tant: A les lectures de mostres i patrons (components A+B) s'ha de restar el component d'absorció deguda al sòl dels controls (component B).

c. Adaptació de la metodologia a les mostres reals

Pel que fa l'adaptació de la metodologia a les mostres reals ens preguntem, *La suspensió mostra-tampó manté el pH de la solució tampó? Com afecta el tipus de mostra a les característiques de la recta de calibració? Quina és la variabilitat analítica associada als valors de les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa?*

L'objectiu de l'**assaig previ** és mesurar el pH de la suspensió sòl-tampó per esbrinar si per les mostres amb les que es treballarà hi ha garanties que la reacció enzimàtica es porti a terme a pH 6. **La corba de neutralització** té per objectiu esbrinar com s'ha de fer l'adequació de pH per a aquelles mostres on la suspensió no mantingui el pH adequat. L'assaig previ i la corba de neutralització es van realitzar segons s'especifica a l'apartat anterior i els resultats per les mostres de sòls naturals es mostren a la Figura 5.14 i per les mostres de sòl amb aplicació de fang a les Figura 5.15.

Els resultats l'assaig per les 10 mostres de sòls naturals indiquen que els valors de pH de la suspensió sòl-tampó es situen en un rang de valors entre 7,2 i 5,6. La majoria de mostres (totes excepte les tres de pH més àcid) varen donar valors de pH de la suspensió superiors a 6 i se situen en un rang 6,4 i 7,2. La variació dels resultats de l'assaig previ segons l'any de mostreig indica que és petita i que arriba a ser de 0,2 unitats com a màxim. Els valors obtinguts per la corba de neutralització de les 7 mostres indiquen que no es pot fixar un valor comú per totes les mostres de la col·lecció (Taula 5.17).

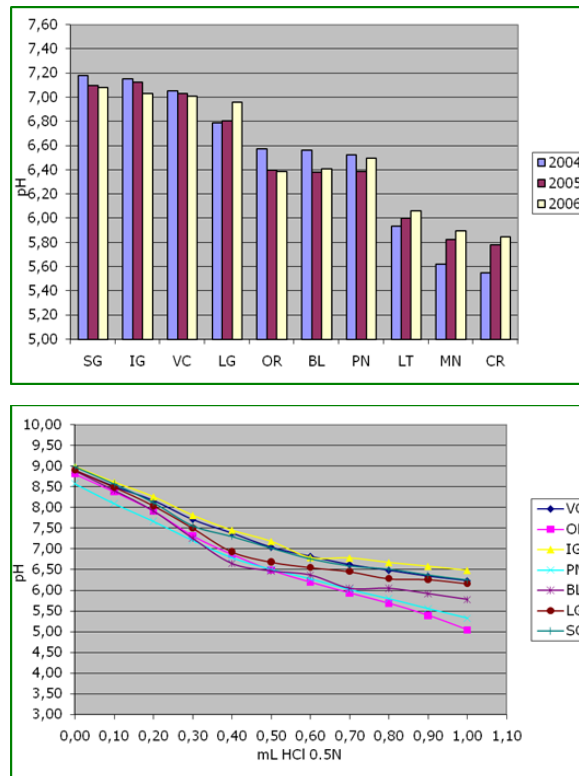


Figura 5.14 Valors de pH de la suspensió sòl-tampó pH 6 per a les mostres de sòls naturals dels diferents anys de mostreig. Corba de neutralització per a set de les mostres de sòls naturals (mostreig 2004) per assolir pH 6.

L'assaig previ de pH per les mostres de les barreges sòl-fang es va realitzar pel mostreig inicial de les dues experiències en lisímetres i en parcel·les. En el cas dels lisímetres, per les mostres de sòl argilós podem veure que totes presenten un pH superior al del tampó: el sòl argilós modifica més el pH del tampó, per tant té més capacitat tamponant. També podem afirmar que en les mostres control la capacitat tamponant és superior a la de les barreges sòl-fang. Amb la corba de neutralització vàrem fixar els volums HCl 0,5 N a afegir a la suspensió en cada grup de mostres (Taula 5.17). En el cas de les mostres en parcel·les, d'acord als resultats de l'assaig previ, la corba de neutralització només va ser necessària per les mostres de sòl franc, sòl de pH superior al sòl franc-arenós.

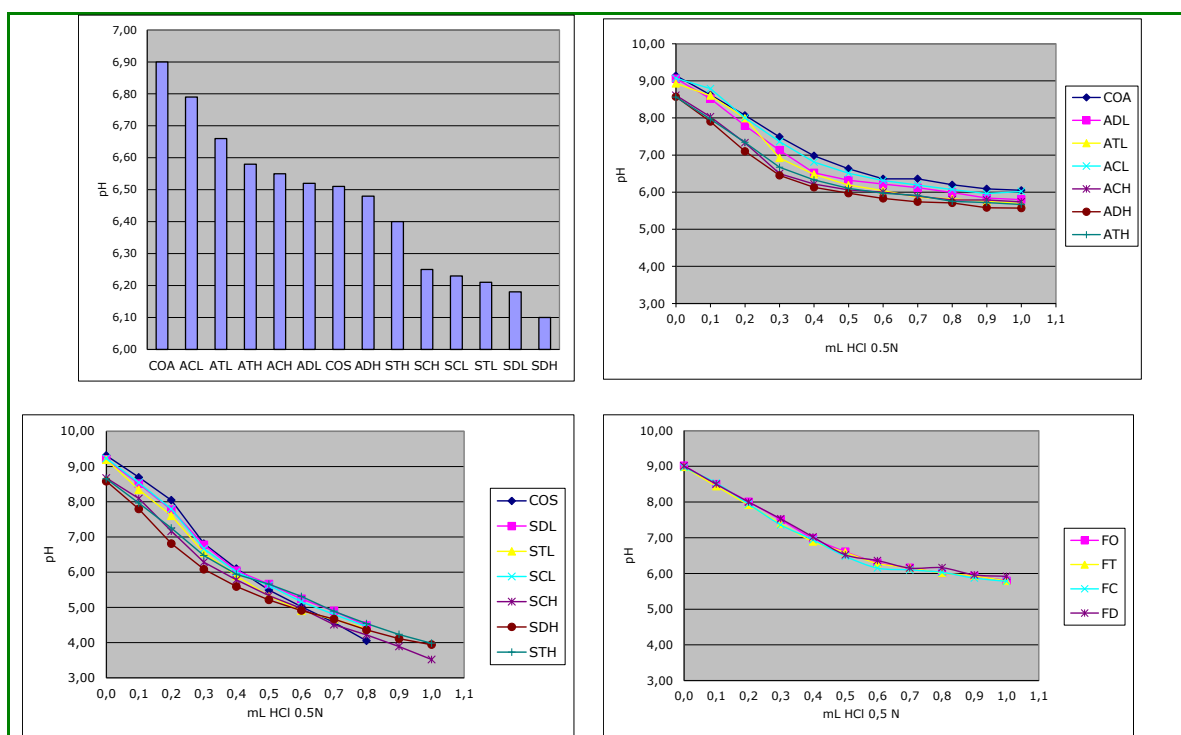


Figura 5.15 Valors de pH de la suspensió sòl-tampó pH 6 per les barreges amb sòl argilós i amb sòl sauló de l'experiència en lisímetres. Corba de neutralització per a les mostres de sòl argilós i sauló dels lisímetres i de sòl franc en parcel·les.

Taula 5.17. Condicions experimentals per a l'ajust de pH en la determinació de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa pel conjunt de mostres de les tres experiències.

Experiència	Mostres	x mL HCl 0,5N	(2-x) mL aigua
Sòls naturals	LT, CR i MN	0,0*	2,0
	OR, PN i BL	0,7	1,3
	VC, IG, LG i SG	1,0	1,0
Lisímetres	Barreges sòl argilós (A)	0,8	1,2
	Barreges sòl sauló (S)	0,4	1,6
Parcel·les	Barreges sòl franc (F)	0,7	1,3
	Barreges franc-arenós (Fr)	0,0*	2,0

*no es requereix ajust del pH de la suspensió sòl-tampó

L'estudi de la regressió, fet sobre algunes de les **rectes de calibració amb sòl** (amb patrons per duplicat), indica que d'interval de confiança del pendent i la coordenada en l'origen no són superiors a la recta sense sòl. Són del mateix ordre, $\pm 0,0002$ per a la pendent i $\pm 0,02$ per a l'ordenada en l'origen i fins i tot s'arriba a valors inferiors quan el coeficient de correlació és alt. La linealitat de les rectes de calibració és bona ja que el valor de R^2 resulta sempre superior al valor 0,9900.

La incidència del tipus de mostra en les característiques de les rectes de calibració en la determinació de les activitats enzimàtiques es presenta en la Taula 5.18 a través dels valors màxim i mínim detectats per els valors del pendent i l'ordenada en l'origen.

Taula 5.18. Característiques de les rectes de calibració amb sòl de la determinació de les activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa pel conjunt de mostres estudiades.

Experiència	Mostres	Pendent	Ordenada en l'origen
Sols naturals	sòl	0,0057-0,0087	0,070-0,370
Lisímetres	sòl control	0,0091-0,0092	0,040-0,050
sòl argilós	barreges sòl-fang	0,0068-0,0086	0,070-0,400
Lisímetres	sòl control	0,0091-0,0097	0,030-0,040
sòl sauló	barreges sòl-fang	0,0078-0,0091	0,110-0,280
Parcel·les	sòl control	0,0085-0,0091	0,078-0,099
sòl franc	barreges sòl-fang	0,0086-0,0091	0,096-0,208
Parcel·les	sòl control	0,0075-0,0086	0,176-0,311
sòl franc-arenós	barreges sòl-fang	0,0074-0,0087	0,156-0,369

Es pot observar que per a les mostres de sòls naturals la variabilitat és molt alta, fet justificable atenent a la diversitat de característiques de la col·lecció de mostres. Pel que fa a les experiència 1 i 2 de barreges sòl-fang els sòls controls tenen un valor de pendent més alt que les barreges i els valors de l'ordenada en l'origen és més baix pels sòls controls que per les barreges. Aquests resultats posen de manifest la incidència que té el contingut de MO de la mostra (depenent del sòl i la dosi de fang afegida) en els paràmetres de pendent i ordenada en l'origen de la recta de calibració amb sòl atenent a la capacitat de la mostra per adsorbir el pNF i a l'absorció de les substàncies aromàtiques respectivament.

En aquest apartat estudiem **la variabilitat analítica** associada als valors de les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa en les mostres a través de la resolució de les següents qüestions:

- i. Com es tradueix la imprecisió provinent de la calibració en la concentració i per tant en el valor de l'activitat?*

En el valor de concentració té una imprecisió de ± 5 ppm que representa un interval de ± 0.025 $\mu\text{mol pNF/g hora}$ en el valor de l'activitat enzimàtica. Si la recta de calibració té patrons per duplicat l'interval es redueix a $\pm 4,5$ ppm i l'activitat a $\pm 0,020$ $\mu\text{mol pNF/g hora}$

- ii. Quina importància relativa té aquesta imprecisió en el resultat de l'activitat enzimàtica?*

L'error relatiu és important per lectures que es situïn per sota del primer patró de 20 ppm. A partir d'aquest, l'error relatiu és situa entre el 25 % (per 20 ppm pNF i activitat de 0,1 $\mu\text{mol pNF/g hora}$) i 2,5 % (per 200 ppm i 1 $\mu\text{mol pNF/g hora}$).

- iii. Quina és l'activitat enzimàtica més petita que podem detectar?*

Per a poder detectar l'activitat, la diferència mínima entre la Absorbància de la mostra i del blanc ha de ser 0,050-0,030 (depenent de si la recta de calibració té pendent alta o baixa, respectivament). En aquest cas, la concentració serà de 5 ppm i l'activitat de 0,025 $\mu\text{mol pNF/g hora}$.

- iv. Quina és l'activitat enzimàtica més petita que podem quantificar?*

Per a poder quantificar correctament l'activitat, la diferència mínima entre la Absorbància de la mostra i del blanc ha de ser quatre vegades més alta, 0,200-0,120 (depenent de si la recta de calibració té pendent alta o baixa, respectivament). En aquest cas la concentració serà de 20 ppm i l'activitat de 0,1 $\mu\text{mol pNF/g hora}$.

- v. Quina és la repetibilitat de l'assaig enzimàtic?*

L'assaig de repetibilitat (10 rèpliques) per a dues mostres de sòl argilós i sòl sauló (barreja sòl-fang de l'experiència de lisímetres) va donar uns valors de $d.e=0,023$ i $d.e=0,015$ $\mu\text{mol pNF/g h}$ i un coeficient de variació del 13 % i 11 % per uns valors d'activitat enzimàtica β -glucosidasa de 0,177 i 0,136 $\mu\text{mol pNF/g h}$ respectivament.

5.6 CONCLUSIONS

- I. El mètode de determinació de carboni orgànic per combustió posat a punt ha resultat ser un mètode adequat per a la determinació de carboni orgànic en mostres de sòl-fang.
- II. El mètode de determinació de carboni orgànic per combustió presenta bons valors de precisió i d'exactitud per les mostres sense carboni inorgànic. Quan carboni orgànic es troba per diferència entre carboni total i carboni inorgànic el resultat està subjecte a un error del 6 % per excés.
- III. La determinació de carboni orgànic per oxidació ha resultat ser inadequada per mostres de sòl-fang ja que ha resultat ser dependent de l'oxidabilitat de la matèria orgànica i de la presència d'interferències.
- IV. El mètode de determinació de l'activitat enzimàtica β -glucosidasa, i β -galactosidasa, requereix l'adaptació al tipus de mostra pel que fa a l'ajust de pH de la suspensió sòl-tampó i a la recta de calibració amb sòl.
- V. L'error associat als valors d'activitat determinat amb una recta de calibració convencional és tan més important com més heterogeni sigui el grup de mostres a analitzar i pot arribar a ser del 50 % per defecte.

Síntesi: Resultats més Rellevants

6 SÍNTESI: RESULTATS MÉS RELLEVANTS

Desenvolupem la síntesi del treball i les aportacions més rellevants dels diferents capítols en el mateix ordre que els objectius generals exposats en el capítol 1.

En relació a l'**objectiu A** creiem que la principal contribució del nostre estudi sobre característiques bioquímiques en deu sòls naturals representatius dels sòls catalans, és la de cobrir la mancança sobre dades de paràmetres bioquímics en sòls naturals de Catalunya. Malgrat l'alta dispersió obtinguda, a causa de l'ampli rang de valors de carboni orgànic dels sòls, els rangs de valors trobats en els sòls naturals estudiats ha resultat estar d'acord amb els d'altres zones de clima mediterrani (García et al., 1994; García et al., 1997a, 1997b; García i Hernández, 1997; García et al., 2002; ; Bastida et al., 2006; Miralles et al., 2007; Zornoza et al., 2007b; Bastida et al., 2008a; Zornoza et al., 2008a,).

Els paràmetres bioquímics estudiats presenten correlacions altes i positives entre ells, tret que posa de manifest les seves característiques de sòl clímax, i alhora una gran dependència del contingut en matèria orgànica del sòl així com del contingut en biomassa microbiana (García et al., 1994; García i Hernández, 1997; Trasar-Cepeda et al., 1998; Trasar-Cepeda et al., 2000b, Bastida et al., 2006; Miralles et al., 2007; Zornoza et al., 2007b). El contingut en carbohidrats apareix més correlacionat amb els continguts de carboni orgànic i de nitrogen orgànic que amb les activitats enzimàtiques mesurades. No totes les activitats enzimàtiques estan igualment lligades al contingut en matèria orgànica, si que ho estan, però, en grau semblant, a la biomassa microbiana. Les quatre activitats enzimàtiques estan més lligades a la fracció làbil de carbohidrats del sòl mesurada com a carbohidrats extractables (CHE) que a la fracció total (CHT), resultats que són semblants en d'altres treballs similars (García et al., 1997b; Trasar-Cepeda et al., 1998; Zornoza et al., 2007b). L'activitat β -glucosidasa (GLC) és la més relacionada amb el contingut de carboni orgànic del sòl mentre que les tres activitats β -galactosidasa, ureasa i proteolítica de BAA (GAL, UR i BAA) estan molt relacionades entre elles, fet que fa pensar que aquestes tres activitats enzimàtiques podrien actuar sinèrgicament en certs ecosistemes on existís una biomassa o una matèria orgànica específica.

Respecte de la capacitat diferenciadora dels paràmetres i traient la influència del contingut en matèria orgànica, les variables amb més capacitat discriminant entre sòls són el contingut en carbohidrats extractables de la matèria orgànica (CHE/C) i l'activitat β -glucosidasa específica (GLC/C). La proporció CHE/C resulta ser més alta com més baix és el contingut en matèria orgànica i aquest efecte de concentració dels carbohidrats extractables estaria relacionat amb la necessitat de supervivència dels microrganismes i d'un mínim d'activitat microbiana en sòls de baix contingut en matèria orgànica. De la mateixa forma, la matèria orgànica de sòls amb baix nivell de carboni orgànic presenten una matèria orgànica proporcionalment més rica en activitat β -glucosidasa. Això podria estar relacionat amb el fet que sòls pobres en matèria orgànica son capaços de mantenir el potencial de descomposició de la matèria orgànica del sòl, donat el paper clau que representa aquesta activitat en el subministre de sucres i per tant en el manteniment de l'activitat de la biomassa microbiana (Ceccanti i Pezzarossa, 1993; Masciandaro i Ceccanti, 1999; Trasar-Cepeda et al., 2008b).

Considerant el diferent nivell de matèria orgànica en els sòls naturals estudiats i a grans trets, un alt contingut en carboni orgànic es relaciona amb alt contingut en CHT i CHE i alta activitat enzimàtica i a l'inrevés. Tanmateix, l'estudi ha permès constatar la influència del tipus de sòl, roca mare o vegetació en certes característiques bioquímiques del grup de sòls forestals. Així en dues de les mostres de sòls forestals (PN i MN) amb un alt contingut de carboni orgànic trobem valors significativament superiors a la resta de sòls de la relació CHT/C, la qual cosa pot indicar que es tracta de sòls amb aportacions importants de material vegetal en condicions ambientals de poca descomposició. Per altra banda, en la mostra de sòl forestal OR, desenvolupat sobre roca calcària descarbonatada i amb vegetació rica en material més lignificat, la manca de substrat degradable, justificaria els valors anormalment baixos de les activitats enzimàtiques (Folsom et al., 1974; Martens i Loeffelmann, 2002; Miralles et al., 2007; Bastida et al., 2008a). I per últim, els sòls MN, CR i LT, que són els sòls forestals desenvolupats en material no calcari, presenten una especificitat bioquímica que es caracteritza per una alta activitat específiques GAL/C i BAA/C que podrien estar involucrades en la degradació de substrats complexos carbohidrat-proteïna.

De l'estudi de l'efecte de l'assecat de les mostres sobre les activitats enzimàtiques GLC i GAL i considerant que les activitats mesurades a partir de mostra assecada es corresponen a l'activitat més estabilitzada -d'acord amb Dick (1994) i Bonmatí et al., (2003)- podem deduir que, majoritàriament, aquestes activitats enzimàtiques en els sòls naturals estudiats, corresponen a la dels enzims estabilitzats i que és poc important el component associat a la biomassa. Els resultats també semblen indicar que l'activitat GAL presenta més dificultat per l'estabilització, d'acord amb resultats de Klose i Tabatabai (2002), ja que és major el número de mostres on es detecta pèrdua de l'activitat amb l'assecat. L'efecte del pretractament d'assecat globalment manté el *ranking* entre les mostres de sòl, per tant, la diferenciació de sòls naturals a través de les activitats enzimàtiques GLU i GAL es pot fer tant a partir de mostra humida com a partir de mostra assecada; aquest resultat està d'acord amb els resultats d'altres autors (Bandick i Dick, 1999; Zornoza et al., 2006).

D'acord als **objectius B i C** sobre els efectes de l'aplicació al sòl de fangs sotmesos a diferents posttractaments destaquem com a aspecte rellevant el disseny experimental de les dues experiències on els fangs compostat i assecat tèrmicament provenen d'un mateix fang deshidratat, aspecte que hem trobat molt poc freqüent en la bibliografia.

La realització de la **primera experiència** ha comportat el seguiment d'un estudi preliminar d'incubacions in vitro; hem estudiat l'evolució (7, 67 i 267 dies) de barreges sòl-fang amb dues dosis de cadascun dels tres fangs en lisímetres, en condicions controlades de laboratori emprant dos sòls de textures molt diferents. Els sòls control són sòls degradats provinents de pedreres amb contingut en matèria orgànica molt baix (1 % C pel sòl argilós i 0,1 % C pel sòl sauló); per aquest motiu no s'ha fet el contrast estadístic de les barreges respecte del sòl control i la discussió de resultats s'ha centrat en la comparació de les barreges entre sí, per posar de manifest les característiques diferencials dels tres fangs.

Inicialment es detecta un efecte intensificador (increment del valor en la mostra sòl-fang respecte del valor en el sòl control) per totes les variables bioquímiques (a excepció de l'activitat UR) que està d'acord amb els resultats de múltiples experiències in vitro de barreges sòl-residu orgànic i és paral·lel al descrit a Tarrasón (2004) i Jiménez et al. (2007) per a les propietats biològiques, biomassa microbiana i respiració, de la mateixa experiència. Aquest increment es justifica atenent a l'activitat

biològica del propi material afegit i a l'estimulació de la biomassa del sòl per la matèria orgànica aportada (Eivazi i Zacaria, 1993; Serra-Wittling et al., 1995; Moreno et al., 1999; Madejón et al., 2001b; Debosz et al., 2002; Kizilkaya et al., 2005; Saviozzi et al., 2002; Pascual et al., 2002; Pascual et al., 2007). Les activitats enzimàtiques, amb el temps d'incubació, segueixen la pauta general descrita d'un ràpid i significatiu increment amb l'addició del residu orgànic i posterior descens progressiu (Moreno et al., 1999; Madejón et al., 2001b). Al final de l'experiència les barreges tenen uns valors de carbohidrats i activitats enzimàtiques incrementats respecte del control de forma similar a l'increment final en carboni orgànic i el contingut en N aminoacídic és la variable que resta més incrementada per l'addició de fangs, respecte del sòl control, al cap dels 267 dies.

El procés de minva de la MO ha estat intens en el primer període de la incubació coincidint amb la màxima activitat de la biomassa descrita per Tarrasón (2004). Aquest procés ha estat més favorable en les barreges de textura grossa del sòl sauló i en canvi s'ha vist alentit o paralitzat en les barreges de textura fina del sòl argilós. Aquest resultat és semblant al descrit per diferents experiències (Madejón et al., 2001b; Pedra et al., 2007; Sciubba et al., 2013) i està d'acord amb el paper de l'argila en la formació de complexos organo-minerals resistents a la degradació microbiana i a la major activitat de la biomassa en un sòl arenós (Franzluebbbers et al., 1996). Els resultats dels valors de C orgànic i N aminoacídic indiquen que el fang compostat, en contrast amb el fang assecat tèrmicament, no ha seguit el comportament esperable per un material madur que descriu la bibliografia i no s'ha ajustat als resultats d'altres experiències on la menor davallada en carboni orgànic correspon al residu que aporta matèria orgànica més estabilitzada (Bernal et al., 1998; Pascual et al., 1998; Madejón et al., 2001a; Saviozzi et al., 2002; Fernández et al., 2007a; Sciubba et al., 2013). Creiem que els resultats són atribuïbles a un insuficient procés d'estabilització del material a través del compostatge d'acord amb Huerta et al. (2010).

El contingut en CHE ha resultat ser la variable més incrementada inicialment i respon a l'aport de compostos làbils que caracteritza aquest tipus de residus orgànics. L'evolució dels carbohidrats de les barreges amb el temps d'incubació no respon, especialment en el sòl A, al que a priori caldria esperar, una davallada paral·lela al procés de mineralització d'acord amb la seva alta degradabilitat sinó més aviat a les fluctuacions relacionades amb les modificacions de la càrrega microbiana (Kinsbursky et al., 1989; Roldán, et al., 1994; Debosz et al., 2002).

Les diferències en els valors de l'activitat enzimàtica GLC a l'inici en funció del tipus de fang (on T>D>C) són un reflex de la labilitat de la MO aportada pels fangs i es correspon amb les experiències que atribueixen els valors més alts de l'activitat GLC a la inestabilitat de la MO del residu i a l'augment de la dosi (Eivazi i Zacaria, 1993; Madejón et al., 2001a; Debosz et al., 2002; Kizilkaya et al., 2005 i Sciubba et al., 2013). Aquests resultats, a més, estan d'acord amb el que hem trobat a partir de l'assaig d'additivitat on hem considerat l'activitat β -glucosidàsica del sòl control i l'activitat β -glucosidàsica determinada en el fang i les hem relacionat tenint en compte la composició en pes de les barreges. Els valors finals de l'activitat GLC són un reflex del diferent grau de transformació de la MO de les barreges d'ambdós tipus de sòls. Així, en el sòl A, l'activitat GLC manté la mateixa diferenciació inicial entre fangs i contràriament les barreges amb el sòl S presenten un *ranking* diferent a l'inicial. El fang compostat, podria proporcionar al sòl activitat enzimàtica més estabilitzada i per tant amb el temps, més persistent donat que l'enzim es pot trobar associat a

complexos E-carbohidrat i E-humus (Miller i Dick, 1995; Busto et al., 1997; Busto i Pérez-Mateos, 2000; Knight i Dick, 2004).

El conjunt de resultats obtinguts semblen indicar que: i) l'assecat tèrmic accelera el primer procés de descomposició de la MO que té lloc al sòl ja que proporciona més MO làbil; ii) el procés de compostatge proporciona una MO no tan làbil, però amb més activitat enzimàtica (la qual cosa es tradueix en una major mineralització i que la MO restant sigui més estable) i iii) quan els fangs s'apliquen en un sòl argilós es detecta un fre en l'evolució esperada de la MO que és menys acusat en el fang compostat (el qual presenta un comportament més reproducible, més independent del sòl) que amb el fang assecat tèrmicament, on es poden donar condicions de manca d'oxigen (Fernández et al., 2007a). De les consideracions anteriors podem dir que l'aport de fang sotmès a postractament és més adequat que el fang deshidratat.

La segona experiència ha comportat el seguiment d'un assaig d'aplicació de fangs en terrenys degradats en condicions reals. En aquest cas analitzem el comportament de les mostres inicials i finals (295 dies) provinent de parcel·les on s'han aplicat els mateixos tres fangs de l'experiència en lisímetres amb una sola dosi i en condicions de camp, per tant on cal considerar els efectes del terreny, climàtics i de vegetació. En aquest cas, els sòls control tenen menys diferència textural i un contingut més alt de MO (2 % C sòl franc i 1,5 % C sòl franc-arenós) la qual cosa ha permès contrastar l'efecte de l'aplicació dels fangs conjuntament amb el sòl control.

En aquest cas, la dosi de fang aplicada és inferior a la dosi baixa aplicada en els lisímetres i per tant l'efecte intensificador inicial és inferior. El tret més rellevant d'aquesta experiència ha estat el posar de manifest la important incidència del tipus de sòl en el comportament dels fangs afegits. Així en el cas de l'aplicació de fangs al sòl franc-arenós (sòl amb més baix contingut en matèria orgànica, però amb activitat enzimàtica més alta) la dinàmica de mineralització ha estat intensa i la incidència sobre les propietats bioquímiques del sòl, un any després de l'aplicació dels fangs, ha estat molt poc acusada. Contràriament els efectes sobre el sòl franc, on la dinàmica de la matèria orgànica ha estat menor, són més importants i bàsicament han significat l'augment del contingut en matèria orgànica i la millora de la capacitat de la matèria orgànica d'obtenir formes assimilables de carboni a partir de carbohidrats simples.

La diferenciació entre els fangs ha estat menys acusada, però s'han reproduït les diferències pel que fa al descens en els valors de carboni orgànic amb el temps entre les parcel·les amb fang tèrmic i compostat.

En aquest cas la dinàmica dels carbohidrats extractables i els carbohidrats totals respon, especialment en el sòl franc-arenós, al que caldria esperar, una davallada paral·lela al procés de mineralització d'acord amb la seva alta degradabilitat. Per altra banda, però, també detectem un augment en el valor de carbohidrats totals per a les parcel·les de sòl franc que pot estar relacionat amb el major grau de recobriment vegetal detectat en aquestes parcel·les (Tarrasón, 2004).

L'efecte fang inicial en l'activitat β -glucosidasa s'ha vist afectat pel tipus de sòl; si bé en el sòl franc s'ha reproduït el detectat en els lisímetres $T > D \geq C$, en el sòl franc-arenós ha estat l'invers $T \leq D \leq C$, indicant que aquest sòl no ha seguit el patró determinat per la labilitat de la matèria orgànica aportada pel fang.

A partir dels resultats d'ambdues experiències trobem que els valors de termoestabilitat per la β -glucosidasa són similars als de la bibliografia (Miller i Dick 1995) i semblen afavorits per la presència d'argila. Els valors de K_M per la β -

glucosidasa són del l'ordre de les descrites per Eivazi i Tabatabai (1988) i indiquen que l'afinitat de l'enzim pel substrat és semblant entre tots els tractament i no s'ha vist alterada per l'addició de fang.

Pel que fa la comportament dels diferents paràmetres mesurats destaquem que, en ambdues experiències, el contingut en N aminoacídic en les mostres finals és l'únic paràmetre que presenta capacitat per diferenciar significativament els diferents tractaments assajats, per cadascun dels dos sòl. Aquest paràmetre ha resultat especialment interessant per expressar l'activitat enzimàtica de la fracció proteica del sòl.

A l'hora de situar les mostres finals de les parcel·les amb fangs en el rang de valors corresponents al grup de sòls naturals estudiats podem dir que presenten valors de carboni orgànic, carbohidrats totals, carbohidrats extractables i de les activitats β -glucosidasa, β -galactosidasa i ureàsica que se situen a la banda baixa del rang de valors i valors de l'activitat enzimàtica BAA que les situa a la banda alta.

Per últim, considerem que globalment el nostre treball contribueix a donar a conèixer un rang de valor pels paràmetres bioquímics estudiats; aquest aspecte és interessant quan es contrasten estudis bibliogràfics similars especialment a causa de la manca d'uniformitat en l'expressió de resultats que hem pogut constatar.

Els resultats de **l'objectiu D**, sobre aportacions metodològiques dels paràmetres, s'han centrat en les determinacions del carboni orgànic i de l'activitat β -glucosidasa donat que, per la tècnica de determinació dels carbohidrats totals i extractables, hem fet servir el mètode més usual en estudis similars al nostre i, per la determinació del contingut en nitrogen aminoacídic, partíem de la metodologia ja posada punt en mostres de fangs.

La necessitat d'estudiar la metodologia per a la determinació de carboni orgànic en mostres sòl-fang ve donada pel factor de l'oxidabilitat inherent a la metodologia clàssica (Jackson, 1982; Nelson i Sommers, 1982; Saña, 1985; Macias et al., 2004). Era un tret diferencial esperable en les mostres que han rebut fang amb MO de diferent grau de maduresa. L'alternativa al mètode d'oxidació és el de combustió i ha estat el mètode que hem posat a punt. Els resultats han confirmat la manca d'idoneïtat del mètode clàssic per a les mostres de sòl-fang especialment per les mostres de textura argilosa i per les de la prova en lisímetres, on la dosi de fang aplicada és alta. Els resultats del mètode de determinació de carboni per combustió ha resultat eficaç encara que malauradament ha posat de manifest mancances d'exactitud, especialment per mostres amb carboni inorgànic tal com s'assenyala a la bibliografia (Bisutti et al., 2004; Horizontal, 2007)

Respecte de la segona tècnica amb la que hem abordat l'estudi del protocol analític, el nostre treball ha contribuït a la descripció detallada de la determinació de l'activitat β -glucosidasa en sòls. Aquesta tasca apareix publicada a Jiménez i Bonmatí (2003) junt amb d'altres paràmetres bioquímics (García et al., 2003) fruit de la iniciativa *Grupo Español Enzimología de Suelos* i atenent a la mancança de metodologies contrastades en aquest àmbit.

En aquest treball, hem posat de manifest la conveniència d'introduir les modificacions proposades per Vuorinen (1993) i Trasar-Cepeda et al. (1985 i 2000b) per al protocol de determinació de l'activitat β -glucosidasa de Eivazi i Tabatabai (1988) que no trobem a la bibliografia de forma rutinària. La incidència d'aquestes modificacions s'han fet paleses en l'estudi dels sòls naturals i en les mostres sòl-fang.

Pel que fa a la incidència del pretractaments de mostra en la determinació de les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa a partir de la mostra humida o assecada, en les mostres de sòls naturals, hem trobat que ambdós són vàlids en la diferenciació de sòls naturals resultat que està d'acord amb els d'altres autors (Bandick i Dick, 1999; Zornoza et al., 2005). A més a més, els resultats indiquen que majoritàriament l'activitat associada a la biomassa és poc important considerant que les activitats mesurades a partir de mostra assecada es correspon a l'activitat més estabilitzada -ja que l'associada a la biomassa existent i als enzims lliures es perd pràcticament del tot en l'assecat- (Dick, 1994; Bonmatí et al., 2003). Com a conseqüència, hem fet les determinacions en les barreges sòl-fang a partir de mostra assecada simplificant així la planificació temporal de les analítiques.

7 CONCLUSIONS GENERALS

Sobre l'estudi dels sòls naturals:

- I. Els valors dels paràmetres bioquímics, carbohidrats extractables, carbohidrats totals i activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa, en els sòls naturals estudiats, són similars als d'altres sòls naturals de zones de clima mediterrani.
- II. Els paràmetres bioquímics, carbohidrats extractables, carbohidrats totals i activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa en els sòls naturals estudiats estan altament correlacionats i presenten una variabilitat que és molt dependent del contingut de matèria orgànica del sòl. D'entre les activitats enzimàtiques mesurades, la β -glucosidasa és l'activitat més dependent del contingut total de matèria orgànica i l'activitat proteolítica de BAA la que menys.
- III. La jerarquització dels sòls naturals, en funció de les activitats β -glucosidasa i β -galactosidasa, també es pot esbrinar si les activitats enzimàtiques es determinen a partir de la mostra de sòl assecada a l'aire.

Sobre l'estudi de l'aplicació dels fangs a través de les experiències en lisímetres i en parcel·les:

- I. L'aport de fang ha augmentat el contingut en carboni orgànic i nitrogen aminoacídic dels sòls control, al final dels períodes controlats.
- II. L'aport de fangs ha augmentat, al final dels períodes controlats, la potencialitat dels sòls d'obtenir formes assimilables de carboni i de nitrogen, respecte dels sòls control, encara que, no sempre, l'activitat enzimàtica de la matèria orgànica sigui superior a la dels sòls control.
- III. L'activitat enzimàtica de la fracció proteica dels sòls que han rebut fangs és inferior, al final dels períodes controlats, a la dels sòls control.
- IV. Al final dels períodes controlats, el valor de la K_M de l'enzim β -glucosidasa en les mostres finals no ha acusat l'aplicació de fang.

Sobre els postractaments del fang deshidratat a través de les experiències en lisímetres i en parcel·les:

- I. Quan els fangs s'apliquen en un sòl tipus argilós es detecta un fre en l'evolució esperada de la matèria orgànica que és menys acusat en el fang compostat que en el fang assecat tèrmicament.
- II. Els valors finals de nitrogen aminoacídic en els sòls on s'ha aplicat fang postractat són significativament diferents als de fang deshidratat; si el fang és assecat tèrmicament, els valors són significativament superiors als del fang deshidratat i en el cas del fang compostat són significativament inferiors.
- III. L'aport de fang deshidratat sotmès a postractament afecta a les característiques finals de les mostres de forma que i) l'assecatge tèrmic proporciona un fang amb més matèria orgànica làbil que accelera el procés inicial de descomposició de la matèria orgànica i ii) el compostatge proporciona un fang amb una matèria orgànica no tan làbil, però amb més activitat enzimàtica, la qual cosa es tradueix en què la matèria orgànica restant, amb el temps, sigui més estable.

Sobre la metodologia analítica:

- I. El mètode de determinació de carboni orgànic per combustió posat a punt ha resultat ser un mètode adequat per a la determinació de carboni orgànic en mostres de sòl-fang. Quan el carboni orgànic es troba per diferència, entre carboni total i carboni inorgànic, el resultat està subjecte a un error del 6 % per excés.
- II. La determinació de carboni orgànic per oxidació ha resultat ser inadequada per mostres de sòl-fang ja que resultat ser dependent de la oxidabilitat de la matèria orgànica i de la presència d'interferències.
- III. El mètode de determinació de l'activitat β -glucosidasa i β -galactosidasa requereix de l'adaptació al tipus de mostra pel que fa a l'ajust de pH de la suspensió sòl-tampó i pel que fa a l'obtenció de la recta de calibració amb sòl.

8 BIBLIOGRAFIA

Acosta Martínez, V., Cruz, L., Sotomayor-Ramírez, D., Pérez-Alegría, L. 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Applied Soil Ecology*, 35: 35-45.

Agència Catalana de l'Aigua. 2011. Evolució de les dades de la producció i de la gestió de fangs. Departament de Territori i Sostenibilitat. Generalitat de Catalunya. [en línia][consulta: desembre 2013]. Disponible a http://aca-web.gencat.cat/aca/documents/ca/actuacions/sistemes_sanejament/com_funcionen_e_dars/evol_fangs_web.pdf

Agència Catalana de l'Aigua. 2012. Programa d'actuacions per a la gestió dels fangs residuals generats en les processos de depuració d'aigües residuals de Catalunya. [en línia][consulta: desembre 2013]. Disponible a http://aca-web.gencat.cat/aca/documents/ca/home/Programa_de_fangs%20101004.pdf

Ajwa, H.A., Dell, C.J., Rice, C.W. 1999. Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 769-777.

Albiach, R., Canet, R., Pomares, F; Ingelmo, F., 2000. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of orgànic amendments to a horticultural soil. *Bioresource Technology*, 75: 43-48.

Albiach, R., Canet, R., Pomares, F; Ingelmo, F., 2001a. Orgànic matter components and aggregate stability after the application of different amendments to a horticultural soil. *Bioresource Technology*, 76: 125-129.

Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F., 2001b. Orgànic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresource Technology*, 77: 109-114.

Alcañiz, J.M., Comellas, L., Pujolà, M. 1996. *Manual de restauració d'activitats extractives amb fang de depuradora: recuperació de terrenys marginals*. Junta de Sanejament, Generalitat de Catalunya. Barcelona.

Alcañiz, J.M., Ortiz, O., Carabassa, V. 2008. *Utilització de fangs de depuradora en restauració. Manual d'aplicació en activitats extractives i terrenys marginals*. Agència Catalana de l'Aigua i Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya (Eds).

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.

Àlef, K., Nannipieri, P. 1995. Enzyme activities. A: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Àlef, K., Nannipieri, P (Eds) Acadèmic Press, New York. Cap 7.

Alexander, M. 1980. *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT Editor. Mexico.

Amelung, W., Chershire, M.V., Guggenberger, G. 1996. Determination of neutral and acidic sugars in soil by capillary gas-liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 12: 1631-1639

Angers, D.A., Mehuys, G.R. 1990. Barley and alfalfa cropping effects on carbohydrate contents of clay soil and its size fractions. *Soil Biology and Biochemistry*, 22:285-288.

Angers, D.A., Nadeau, P. 1988. Determination of carbohydrate composition of soil hydrolysates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 454:444-449.

Armas, C.M, Santana, B., Mora, J.L., Notario, J.S., Arbelo, C.D., Rodríguez-Rodríguez, A. 2007. A biological quality index for volcanic Andisols and Aridisols (Canary Islands, Spain): Variations related to the ecosystem degradation. *Science of the Total Environment*, 378: 238-244.

Badalucco L., Nannipieri P., Grego S. 1990. Microbial biomass and anthrone-reactive carbon in soils with different organic matter contents. *Soil Biology and Biochemistry*, 22, 7: 899-904.

Badalucco L., Gelsomino A., Dell'Orco S, Grego S., Nannipieri P. 1992. Biochemical characterization of soil organic compounds extracted by 0,5 M K₂SO₄ before and after chloroform fumigation. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 569-578.

Badiane, Y.N.N., Chotte, J.L., Paté, E., Masse, D., Rouland, C. 2001. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Applied Soil Ecology*, 18: 229-238.

Baldock, J.A., Kay, B.D., Schnitzer, M.I. 1987. Influence of cropping treatments on the monosaccharide content of the hydrolysates of a soil and its aggregate fractions. *Canadian Journal Soil Science*, 67: 489-499.

Ball, B.C., Cheshire, M.V., Robertson, E.A.G., Hunter, E.A. 1996. Carbohydrate composition in relation to structural stability, compactivity and plasticity of two soils in a long-term experiment. *Soil Tillage Research*, 39:143-160.

Bandick A.K., Dick R.P., 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1471-1479

Bastida, F., Moreno, J.L., Hernández, T., García, C. 2006. Microbiological degradation index of soils in semiarid climate. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 3463-3473.

Bastida, F., Barbera, G.G., García, C., Hernández, M.T. 2008a. Influence of orientation, vegetation and season on soil microbial and biochemical characteristics Under semiarid conditions. *Applied Soil Ecology*, 38: 62-70.

- Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J.L., Ros, M., García, C. Hernández, T. 2008b. Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, 40: 318-329.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, M.T. García, C., 2008c. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147, 3-4:159-171.
- Bastida, F., Jindo, K., Moreno, J.L., Henández, M.T., García, C. 2012. Effects of organic amendments on soil carbon fractions, enzyme activity and humus-enzyme complexes under semi-arid conditions. *European Journal of Soil Biology*, 53: 94-102.
- Batistic, L., Sarkar, M., Mayaudon, J. 1980. Extraction, purification and properties of soil hydrolases. *Soil Biology and Biochemistry*, 12: 59-63.
- Bending, G.D., Turner, M.K., Rayns, F., Marx, M.C., Wood, M. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1785-1792.
- Benzing-Purdie, L. 1980. Organic matter and carbohydrate distribution in an orthic húmic gleysol. *Soil Biology and Biochemistry*, 12: 567-571.
- Bernal, M. P., Sánchez-Monedero, M.A., Paredes, C., Roig, A. 1998. Carbon mineralization from organic wastes at different composting stages during their incubations with soil. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 69:175-189.
- Biederbeck, V.O., Campbell, C.A., Rashia, V., Zentner, P., Wen, G. 1998. Soil quality attributes as influenced by annual legumes used as green manure. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1177-1185.
- Bisutti, I., Hilke, I., Raessler, M. 2004. Determination of total organic carbon-an overview of current methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 10-11: 716-726
- Bissutti, I., Hilke, I., Schumacher, J., Raessler, M. 2007. A novel single-run dual temperature combustion (SRDTC) method for the determination of organic, in-organic and total carbon in soil samples. *Talanta*, 71: 521-528.
- Boerner, R.E.J., Decker, K.L.M., Kennedy, E. 2000. Prescribed burning effects on soil enzyme activity in a southern Ohio hardwood forest: a landscape-scale analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 899-908
- Böhme, L., Langer, U., Böhme, F. 2005. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 109: 141-152.

Bongiovanni, M.D., Lobartini, J.C. 2006. Particulate organic matter, carbohydrate, húmic acid contents in soil macro-and microaggregates as affected by cultivation. *Geoderma*, 136: 660-665.

Bonmatí, M., Pujolà, M., Saña, J., Soliva, M. 1985. Chemical properties, populations of nitrite oxidisers, urease and phosphatase activities in sewage sludge-amended soils. *Plant and Soil*, 84: 79-91.

Bonmatí, M. 1988. Estudi i caracterització de les activitats proteolítiques establitzades de sòls agrícoles de Catalunya. Tesi Doctoral. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

Bonmatí, M., Ceccanti, B., Nannipieri, P. 1991. Spatial variability of phosphatase, urease, protease, organic carbon and total nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 23, 4: 391-396.

Bonmatí, M., Ceccanti, B., Nannipieri, P. 1998. Protease extraction from soil by sodium pyrophosphate and chemical characterization of the extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 2113-2125.

Bonmatí, M., Jiménez, P., Álvarez, H., Calero, E., Julià, M., Morillo, M. Núñez, E. 2000. Changes in enzyme activities during reclamation of two soils from limestone quarries in Catalonia using high doses of sewage sludge. In: Garcia, C., Hernández, M.T. (Eds): *Research and perspectives of soil Enzymology in Spain*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Centro d'Edafologia y Biología Aplicada del Segura. Murcia. pp.253-293.

Bonmatí, M.; Jiménez, P.; Julià, M. 2003. Soil enzymology: some aspects of its interest and limitations. In: Lobo M.C, Ibáñez J.J (Eds). *Preserving soil quality and soil biodiversity*. Instituto madrileño de Investigación Agrària y Alimentaria. Centro de Ciencias Medioambientales. Comunidad de Madrid.

Borrós Gómez, S.1993. Caracterització i evolució de la matèria orgànica d'adobs afegits a sòls de baix contingut en matèria orgànica. Comparació de fangs de depuradora-fems. Tesi Doctoral. Institut Químic de Sarrià. Universitat Ramon Llull.

Bowman, R.A., Reeder, J.D., Lober, R.W. 1990. Changes in soil properties in central plains rangeland soil after 3, 20 and 60 years cultivation. *Soil Science*, 150: 851-857.

Brink, R.H. Jr, Dubach, P., Lynch, D. 1960. Measurement of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone. *Soil Science*, 89: 157-166.

Bronhon, B., Delolme, C., Gourdon, R. 2001. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 883-891.

Browman, M.G. , Tabatabai, M.A., 1978. Phosphodiesterase activity of soils. *Soil Science Society of American Journal* 42: 248-290.

Burns, R.G. 1978. Enzyme activity in soil: some theoretical and practical considerations. In : Burns R.G. (Ed). *Soil Enzymes*. Acadèmic Press.

Burns, R.G. 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 14: 423-427.

Busto, M. D., Ortega, N., Perez-Mateos, M. 1997. Effect of immobilization on the stability of bacterial and fungal β -D-glucosidase. *Process Biochemistry*, 32, 5: 441-449.

Busto, M. D., Perez-Mateos, M. 2000. Characterization of β -D-glucosidase extracted from soil fractions. *European Journal of Soil Science*. 51: 193-200.

Caldwell, B.A., Griffiths, R.P, Sollins, P. 1999. Soil enzyme response to vegetation disturbance in two lowland Costa Rica soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1603-1608.

Camps-Arbestan, M., Pinto, M. 2004. Implicaciones de la variabilidad espacial y temporal del carbon orgánico del suelo en el diseño de las reglas de seguimiento. *Edafologia*, 11 (3): 252-265.

Caravaca F., Masciandaro, G., Ceccanti, B. 2002. Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semiarid Mediterranean environment. *Soil Tillage Research*, 68: 23-30.

Carbonell, G., Pablos, MB., García, P., Ramós, C., Sánchez, P., Fernández, C., Tarazona, JV. 2000. Rapid and cost-effective multiparameter toxicity tests for soil microorganisms. *The Science of the Total Environment*, 247: 143-150.

Carter, M.R.; Gregorich, E.G; Anderson, D.W.; Doran, J.W.; Janzen H.H; Pierce, F.J. 1997. Concepts of soil quality and their significance. In: Gregorich, E.G, Carter M.R. (Eds). *Soil quality for crop production and ecosystem health*. Elsevier.

Ceccanti, B., Pezzarossa, B. 1993. Biotest as markers of soil utilization and fertility. *Geomicrobiology Journal*, 11: 309-316.

Chantigny, M.H., Angers, D. A. 2008. Carbohydrates. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. (second edition). Carter, M.R., Gregorich, E.G. (Eds). *Canadian Society of Soil Science*.

Cheshire M.V., Mundie C.M., 1966. The hydrolytic extraction of carbohydrates from soil by sulphuric acid. *Journal of Soil Science*, 17, 2: 372-381.

Cheshire M.V. 1979. *Nature and origin of carbohydrates in soil*. Acadèmic Press. London.

Cheshire M.V, Inkson, R.H.E., Mundie, C.M., Sparling, G.P. 1988. Studies on the rate of decomposition of plant residues in soil by following the changes in sugar components. *Journal of Soil Science*, 39: 227-236.

Cheshire, M.V., Christensen, B.T., Sorensen, L.H. 1990. Labelled and native sugars in particle-size fractions from soils incubated with ¹⁴C straw for 6 to 18 years. *Journal of Soil Science*, 41: 29-39.

Clapp, C.E. 2007. Orgànic wastes in soil: Biogeochemical and environmental aspects. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 1239-1243.

Cohelho, R., Linhares, L.F., Martin, J.P. 1988. Sugars in hydrolysates of fungal melanins and soil húmic àcids. *Plant and Soil*, 106: 127-133.

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 Àcids via High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 211: 279-287

Crecchio, C., Curci, M., Pizzigallo, M.D.R., Ricciuti, P., Ruggiero, P. 2004. Effects of municipal sòlid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genètic diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1595-1605.

Curci, M., Pizzigallo, M.D.R., Crecchio, C., Mininni, R. 1997. Effects of conventional tillage on biochemical properties of soils. *Biology and Fertility of Soils*, 25: 1-6.

Dalal, R. C. 1998. Soil microbial biomass- what do the numbers really mean? *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38: 649-665.

Dalal, R.C., Henry, R.J. 1988. Cultivation effects on carbohydrate contents of soil and soil fractions. *Soil Science Society American Journal*, 52: 1361-1365.

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. *Applied Soil Ecology*, 19: 237-248.

DeLuca, T.H., Keeney, D.R. 1993. Soluble Antrone-reactive carbon in soils: Effects of carbon and nitrogen amendments. *Soil Science Society American Journal*, 57: 1296-1300.

Deng, S.P., Tabatabai, M.A. 1994. Colorimètric determination of reducing sugars in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 4: 473-477.

Deng, S.P., Tabatabai, M.A. 1996. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. II Glycosidase. *Biology and Fertility of Soils*, 22: 208-213.

Dick, R. P. 1994. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: *Defining Soil Quality for Sustainable Environment*. Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.). *Soil Science Society of American*. Special publication num. 35. Madison, USA.

- Doran, J.W.; Parkin, W.T.B., 1994. Defining and assessment soil quality In: *Defining Soil Quality for Sustainable Environment*. Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.). *Soil Science Society of American*. Special publication num. 35. Madison, USA.
- Doutre, D.A., Hay, G.W., Hood, A., VanLoon, G.W. Spectrophotometric methods to determinate carbohydrates in soil. 1978. *Soil Biology and Biochemistry*, 10: 457-462.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Revers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimètric Method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988. Glycosidase and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 601-606.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1990. Factors affecting glucosidases and galactosidases activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 7: 891-897.
- Eivazi, F., Zakaria, A. 1993. β -Glucosidase activity in soil amended with sewage sludge. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 43: 155-161.
- Ekenler, M., Tabatabai, M.A. 2003. Effects of liming and tillage systems on microbial biomass and glycosidases in soils. *Biology Fertility of Soils*, 39: 51-61.
- Ellert, B.H., Clapperton, M.J., Anderson, D.W. 1997. *An ecosystem perspective of soil quality*. 1997. In: Gregorich, E.G; Carter M.R. (Eds). *Soil quality for crop production and ecosystem health*. Elsevier.
- Elliot LL.F., Lynch, J.M, Papendick, R.I. 1996. The microbial component of soil quality. A: *Soil Biochemistry vol 9*. Stotzky, G. I Bollag, J.M (Eds) Marcel Dekker, Inc.
- España. Ministerio Agricultura Pesca y Alimentación. 1993. *Métodos Oficiales d'Anàlisis*. Secretaria General Tècnica. Madrid. Vol III: 233-237, 252-259.
- España. Ministerio d'Agricultura, Pesca y Alimentación. 1993. Carbono orgánico oxidable. *Métodos Oficiales d'Anàlisis*. Secretaria General Tècnica. Madrid. Vol III: 281-283
- European Biodiversity CHM (Clearing House Mechanism). 2005. (en línia). Supporting the Convention on Biological Diversity. "CORINE Biotopes manual- Habitats of the European Community.[consulta novembre 2008]. Disponible a: <http://glossary.eea.europa.eu//terminology/sitesearch?term=CORINE+biotopes+manual>
- Fernández, J.M., Plaza, C., Hernández, D., Polo, A. 2007a. Carbon mineralization in àrid soil amended with thermally-dried and composted sewage sludges. *Geoderma*, 137: 497-503.

Fernández, J.M., Hernández, D., Plaza, C., Polo, A. 2007b. Orgànic matter in degraded agricultural soils amended with composted and thermally-dried sewage sludges. *Science of the Total Environment*, 378: 75-80.

Fernández, J.M., Plaza, C., García-Gil, J., Polo, A. 2009. Biochemical properties and barley yield in a semiarid Mediterranean soil amended with two kinds of sewage sludge. *Applied Soil Ecology*, 42: 18-24.

Filip, Z. 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88: 169-174.

Folsom, B.L., Warner, G., H., Scrivner, C.L. 1974. Comparison of soil carbohydrate in several prairie and forest soils by gas-liquid chromatography. *Soil Science Society American Proceedings*, 38: 305-308.

Franco-Otero, V., Soler-Rovira, P., Hernández, D., López de Sa, Plaza, C. 2012. Short-term effects of orgànic municipal wastes on wheat yield, microbial biomass, microbial activity, and chemical properties of soil. *Biology and Fertility of Soils*, 48:205-216.

Frankenberger, W.T., Dick, W.A. 1983. Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Science American Journal*. 47: 945-951.

Franzluebbers, A.J., Haney, R.L., Hons, F.M. Zuberer, D.A.. 1996. Active fractions of orgànic matter in soils with different texture. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 10-11: 1367-1372.

Friedel, J.K., Scheller, E. 2002. Composition of hydrolysable amino acids in soil orgànic matter and soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 315-325.

García Álvarez, A., Ibáñez, J.J, Bello, A. 2003. Soil functions, soil quality or soil health. Scientific, metaphorical or utilitarian concepts in soil sciences. In: Lobo M.C; Ibáñez J.J (Eds). *Preserving soil quality and soil biodiversity*. Instituto Madrileño de Investigación Agrària y Alimentaria. Centro de Ciencias Medioambientales. Comunidad de Madrid.

García, C., Hernández, T., Costa, F. 1994. Microbial activity in soils under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 9: 1185-1191.

García, C., Roldan, A., Hernández, T.. 1997a. Changes in microbial activity after abandonment of cultivation in a semiarid Mediterranean environment. *Journal of Environmental Quality*, 26: 285-291.

García, C., Hernández, T., Roldan, A., Albaladejo, J. 1997b. Biological and biochemical quality of semiarid soil after induced revegetation. *Journal of Environmental Quality*, 26: 1116-1122.

García, C., Hernández, T. 1997. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 171-177.

García, C., Hernández, T. 2000. Microbial activity in soils of SE Spain exposed to degradation and desertification processes. Strategies for their rehabilitation. *Research and Perspectives of soil Enzymology in Spain*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Centro d'Edafologia i Biologia Aplicada del Segura. Múrcia. pp 93-143.

García, C., Hernández, T.(Eds). 2000. *Research and Perspectives of soil Enzymology in Spain*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Centro d'Edafologia i Biologia Aplicada del Segura. Múrcia.

García, C., Hernández, T., Roldan A., Martin, A. 2002. Effect of plant cover decline on chemical and microbiological parameters under Mediterranean climate. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 635-642.

García, C., Gil, F., Hernández, T., Traçar, C. (Eds). 2003. *Técnicas d'Anàlisis de Paràmetros Bioquímicos en Suelos: Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana*. Mundi-Prensa. Madrid.

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 & Tillage Research*, 82: 65-76.

García-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M.B, Carreira, J.A. 2008. Suitability of enzyme activities for monitoring of soil quality improvement i orgànic agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2137-2145.

Gee, G.M., Bauder, J.W. 1986. Particle-size analysis. In: Klute, A. (Ed) *Methods of Soil Analysis. I: Physical and Mineralogical Methods*. American Society of Agronomy. Madison. pp 383-411.

Gehl, R.J., Rice, C. W. 2007. Emerging technologies for *in situ* measurement of soil carbon. *Climatic Change*, 80: 43-54.

Geisseler, D., Horthwarth, W.R., Joergensen, R.G., Ludwig, B. 2010. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms- A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 2058-2067.

Ghani, A., Dexter, M., Perrott, K.W. 2003. Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilization, grazing and cultivation. *Soil Biology and Biochemistry*, 35:1231-1243.

Gianfreda, L., Raó, M.A., Piotrowska, A., Palumbo, G., Colombo, C. 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and orgànic pollution. *Science of the Total Environment*, 341: 265-279.

Gianfreda, L., Riggiero, P. 2006. Enzyme Activities in Soil. In: Nannipieri, P and Smalla, K (Eds). *Nucleic Àcids and Proteins in Soil*. 2006. Springer.

Gil-Sotres, F.; Trasar-Cepeda, C.; Leirós, M.C.; Seoane, S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 877-887

Grandy, A.S., Erich, M.S., Porter, G.A. 2000. Suitability of anthrone-sulphuric acid reagent for determining water soluble carbohydrates in soil water extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 725-727.

Gregorich, E.G.; Carter, M.R.; Angers, D.A., Monreal, C.M., Ellert, B.H. 1994. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 74: 367-385.

Gregorich, E.G.; Carter, M.R.; Doran, J.W.; Pankhurst, C.E.; Dwyer, L.M. 1997. Biological attributes of soil quality. 1997. In: Gregorich, E.G; Carter M.R. (Eds). *Soil Quality for Crop Production and Ecosystem Health*. Elsevier.

Guggenberger, G., Christensen, B.T., Zech, W. 1994. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: I. Lignin and carbohydrate signature. *European Journal of Soil Science*, 45: 449-458.

Hattori, H., Mukai, S. 1986. Decomposition of sewage sludge in soil as affected by their organic matter composition. *Soil Science and Plant Nutrition* 32, 3: 421-432.

Hattori, H. 1988. Microbial activities in soil amended with sewage sludges. *Soil Science and Plant Nutrition* 34, 2: 221-232.

Hayano, K. 1973. A method for determination of β -glucosidase activity in soil. *Soil Science and Plant Nutrition* 19: 103-108.

Hayano, K., Katami, A. 1977. Extraction of β -glucosidase activity from pea field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 9: 349-351.

Hayano, K., Tubaki, K. 1985. Origin and properties of β -glucosidase activity of tomato-field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 17: 553-557.

Haynes, R.J., Swift, R.S. 1990. Stability of soil aggregates in relation to organic constituents and soil water content. *Journal of Soil Science*, 41: 73-83.

Haynes, R.J., Francis, G.S. 1993. Changes in microbial biomass C, soil carbohydrate composition and aggregate stability induced by growth of selected crop and forage species under field conditions. *Journal of Soil Science*, 44: 665-675.

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 Biology and Biochemistry*, 36: 1559-1568.

HNPC, *Història Natural dels Països Catalans*. 1985. Enciclopèdia Catalana. Barcelona. Vol 3, Recursos Geològics i Sòl.pp314-323.

Hoffman, J., Bezchlebova, J., Dusek, L., Dolezal, L., Holoubek, I., Andel, P., Ansorgova, A., Maly, S. 2003. Novel approach to monitoring of soil biological quality. *Environment International*, 28: 771-778.

Hojjati, S, Nourbakhsh, F. 2007. Effects of cow manure and sewage sludge on the activity and kinetics of L-glutaminase in soil. *Biology Fertility of Soils*, 43: 491-494.

Horizontal. 2007. (en línia). Sludge, treated biowaste and soil – Determination of total orgànic carbon (TOC) by dry combustion. CEN/BT/TF 151 WI CSS99024:2007.[consulta juny 2012]. Disponible a : <http://horizontal.ecn.nl/final-documents-including-validation-data/inorganic-parameters/>

Hu, S., Coleman, D.C. Hendrx, P.F., Beare, M.H. 1995a. Biòtic manipulation effects on soil carbohydrates and microbial biomass in a cultivated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27: 1127-1135.

Hu, S., Coleman, D.C., Beare, M.H., Hendrx, P.F. 1995b. Soil carbohydrates in aggrading and degrading agroecosystems: influences of fungi and aggregates. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 54: 77-88.

Huerta, O., López, M., Soliva, M. 2010. *Procés de compostatge: caracterització de les mostres*. Col.lecció Estudis. Sèrie Medi Ambient. Diputació de Barcelona.

IQS-CREAF-ESAB, Institut Químic de Sarrià IQS (URL) - Centre de Recerca Estudis Forestals CREAM (UAB) - Escola Superior d'Agricultura de Barcelona ESAB (UPC). 2002. *Aprofitament de fangs de depuradora i productes derivats, fang compostat i fang assecat tèrmicament, en la recuperació de terrenys degradats*. Informe final projecte Ecofangs.

IQS-CREAF-ESAB, Institut Químic de Sarrià IQS (URL) - Centre de Recerca Estudis Forestals CREAM (UAB) - Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya i Ministeri d'Educació i Ciència - Escola Superior d'Agricultura de Barcelona ESAB (UPC). 2006. *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*. Ministerio Español de Medio Ambiente y Agència Catalana de l'Aigua. Exp 150/2004/3; Exp 4.3-236/2005/2-B) Informe del Proyecto RESMINL0D

Jackson, M.L. 1982. *Anàlisis Químicos de Suelos*. 4ª ed. Omega. Barcelona.

Jensen, V., Andersen, K.J., Krysell, M. 2003. (en línia). Desk study on total orgànic carbon (TOC). HORIZONTAL-17-2. [consulta juny 2012]. Disponible a https://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/hor_desk_17_TOC.pdf

Jeuch, C., Joly, Y., Sage, S., Wiart, J. 2000. *Composts de boues de stations d'épuration municipales: Qualité, performances agronomiques et utilisations*. RECYVAL, S.A-ADEME (Ed). Angers.

Jiménez M.P, Horra A.M, Pruzzo, L., Palma, R.M. 2002. Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. *Biology Fertility of Soils*, 35: 302-306.

- Jiménez, P., Bonmatí, M. 2003. Determinación de la actividad β -glucosidasa del suelo. *Técnicas d'anàlisis de paràmetros bioquímicos en suelos: medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. García C., Gil, F., Hernández, T., Traçar, C. (Eds). Mundi-Prensa.
- Jiménez, P., Ortiz, O., Tarrasón, D. Ginovart, M., Bonmatí, M. 2007. Effect on differently post-treated dewatered sewage sludge on β -glucosidase activity, microbial biomass carbon, basal respiration and carbohydrates content of soils from limestone quarries. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 393-398.
- Jiménez, P., Marando, G., Josa, R., Julià, M., Ginovart, M., Bonmatí, M. 2012. Biochemical Characterisation of Minimally Disturbed Soils under Mediterranean Conditions. In: *Soil Enzymology in The Recycling of Orgànic wastes and Environmental Restoration*. Part I: *Enzymes as Indicators of Environmental Soil Quality*. 77-89. Rad, C., Gonzalez-Carcedo S., Trasar-Cepeda, C., Garcia-Izquierdo, C., Hernandez, T. (Eds).
- Joergensen, R.G., Mueller, T., Wolters, V. 1996. Total carbohydrates of the soil microbial biomass in 0,5 M K_2SO_4 soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 1147-1153.
- Jolivet, C., Angers, D.A., Chantigny, M.H., Andreux, F., Arrouays, D. 2006. Carbohydrate dynamics in particle-size fractions of sandy spodosols following forest conversion to maize cropping. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2834-2842.
- Kandeler, E., Palli, S., Stemmer, M., Gerzabek, M.H. 1999. Tillage changes microbial biomass and enzyme activities in particle-size fractions of Haplic Chernozerm. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1253-1264.
- Karlen D.L., Scott, D.E., 1994. A framework for evaluating physical and chemical indicators of soil quality In: *Defining Soil Quality for Sustainable Environment*. Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. Eds. SSSA. Special publication num. 35. *Soil Science Society of American*. Madison, USA.
- Karlen D.L, Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F., Schuman, G.E. 1997. Soil Quality: a concept, definition and framework for evaluation (A Guest Editorial). *Soil Science Society American Journal*, 61: 4-10
- Karlen D.L., Ditzler, C.A., Andrews, S.S. 2003. Soil quality: Why and How?. *Geoderma*, 114: 145-156.
- Kinsbursky, R.S., Levanon, D., Yaron, B. 1989. Role of fungi in stabilizing aggregates of sewage sludge amended soils. *Soil Science Society American Journal*, 53: 1086-1091.
- Kimble, J.M, Lal, R., Follett, R.F. 2001. Methods for assessing soil C pools. Assessment methods for soil carbon. Lal, R., Kimble, J.M, Follet, R.F., Stewart, B.A. (Eds) *Advances in Soil Science*. Lewis Publishers. pp3-12

- Kiss, S.; Dragan-Bularda, M.; Radulescu, D. 1975. Biological significance of enzymes accumulated in soil. *Advances in Agronomy*, 27: 25-91
- Kizilkaya, R., Bayrakli, B. 2005. Effects of N-enriched sewage sludge on soil enzyme activities. *Applied Soil Ecology*, 30: 192-202.
- Klose, S., Tabatabai, M.A. 2002. Response of glycosidases in soils to chloroform fumigation. *Biology Fertility Soils*, 35: 262-269.
- Knight, T.R., Dick, R.P., 2004. Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 2089- 2096.
- Knoepp, J.D., Coleman, D.C., Crossley, D.A., Clark, J.S. 2000. Biological indices of soil quality: an ecosystem case study of their use. *Forest Ecology and Management*, 138: 357-368.
- Kögel-Knabner, I. 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:139-162.
- Kögel-Knabner, I. 2006. Chemical Structure of Organic N and Organic P in soil In: *Soil Biology, volume 8. Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Nannipieri, P and Smalla, K (Eds). Springer-Verlag.
- Ladd, F.N., Butler, J.H. 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4: 19-30.
- Ladd, J.N. 2003. Research trends in the development of soil enzymology. In Lobo M.C; Ibáñez J.J (Eds). *Preserving soil quality and soil biodiversity*. Instituto Madrileño de Investigación Agrària y Alimentaria. Centro de Ciencias Medioambientales. Comunidad de Madrid.
- Lax, A., García-Orenes. 1993. Carbohydrates of municipal solid wastes as aggregation factor of soils. *Soil Technology*, 6:157-162.
- Lerch, R.N., Barbarick, K.A., Sommers, L.E., Westfal, D.G. 1992. Sewage sludge proteins as labile Carbon and Nitrogen sources. *Soil Science Society American Journal*, 56: 1470-1476
- Leirós, M.C., Trasar-Cepeda, C., García-Fernández, F. 1999. Defining the validity of a biochemical index of soil quality. *Biology Fertility Soils*, 30: 140-146.
- Leirós, M.C., Traçar 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 Biology and Biochemistry* 32: 733-745

Lliberia Blasco J.L 1996. Caracterització i evolució de la fracció nitrogenada present en sòls tractats amb fang de depuradora. Tesi Doctoral. Institut Químic de Sarrià. Universitat Ramon Llull.

Lowe, L.E. 1978. Carbohydrates in Soil. In: *Soil Orgànic matter*. Schnitzer, M. I. , Khan, S.U (Eds). Developments in Soil Science, 8. Elsevier. Amsterdam. pp 65-93

Macias, F., Calvo d'Anta, R., Rodriguez Lado, L., Verde, R., Pena Pérez, X., Camps Arbestain, M. 2004. El sumidero de carbono de los suelos de Galicia. *Edafologia*, 11(3): 341-376.

Madejon, E., Burgos, P., Murillo, JM, Cabrera, F. 2001a. Phytotoxicity of orgànic amendments on activities of select soil enzymes. *Communications Soil Science Plant Analysis*, 32 (13/14):2227-2239.

Madejon, E., Burgos, P., López, R., Cabrera, F. 2001b. Soil enzymatic response to addition of heavy metals with orgànic residues. *Biology and Fertility of Soils*, 34: 144-150.

Marando, G., Jiménez, P., Hereter, A., Julià, M., Ginovart, M., Bonmatí, M. 2011. Effects of thermally dried and composted sewage sludges on the fertility of residuals soils from limestone quarries. *Applied Soil Ecology*, 49 : 234-241.

Marando, G., Jiménez, P., Josa, R., Julià, M., Ginovart, M., Bonmatí, M. 2012. Effects of Air-Drying and Rewetting on Extractable Orgànic 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 Orgànic wastes and Environmental Restoration*. Part I: *Enzymes as Indicators of Environmental Soil Quality*. 103-118. Rad, C., Gonzalez-Carcedo S., Trasar-Cepeda, C., Garcia-Izquierdo, C., Hernandez, T. (Eds).

Marando, G. 2013. Estudio de los cambios, durante el proceso de restauración en la matèria orgànica, la biomasa microbiana y la actividad biològica de los suelos degradados enmendados con lodos de EDAR sometidos a diferentes pos-tratamientos. Tesis doctoral. Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia. Universitat Politècnica de Catalunya.

Martens, D.A., Frankenberger Jr, W.T. 1990. Quantification of saccharides of soils by spectrophotometric methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 22, 8: 1173-1175.

Martens, D.A., Frankenberger Jr, W.T. 1991. Saccharide composition of extracellular polymers produced by soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 23,8: 731-736.

Martens, D.A., Johanson, J.B., Frankenberger Jr, W.T. 1992. Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of orgànic residues. *Soil Science*.153, 1: 53-61.

Martens, D.A. 2000. Plant residue biochemistry regulates soil carbon cycling and carbon sequestration. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 361-369.

- Martens, D.A., Loeffelmann, K.L. 2002. Improved accounting of carbohydrate carbon from plants and soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1393-1399.
- Martin, J.P. 1971. Decomposition and binding action of polysaccharides in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 3: 33-41.
- Martí-Vide. 1992. El Clima. Geografia General dels Països Catalans. Vol 1. Enciclopèdia Catalana. Barcelona. pp1-119.
- Martínez, C.E., Tabatabai, M.A. 1997. Decomposition of Biotechnology By-Products in soils. *Journal Environmental Quality*, 26: 625-632.
- Martínez-Iñigo, M.J, García-Vedia, M., Lobo, M.C. 2003. Determinación de la actividad β -galactosidasa del suelo. *Técnicas d'anàlisis de paràmetres bioquímics en suelos: medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. García C., Gil, F., Hernández, T., Traçar, C. (eds). Mundi-Prensa.
- 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.
- Marx, M.C., Wood, M., Jarvis, S.C. 2001. A microplate fluorimètric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1633-1640.
- Marx, M.C., Kandeler, E., Wood, M., Wermberter, N., Jarvis, S.C. 2005. Exploring the enzymatic landscape: distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 35-48.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Gallardo-Lancho, J.F. 1998. Orgànic matter properties in cultivated versus set-aside arable soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 67: 267-274.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B. 1999. Assessing soil quality in different agro-ecosystems through biochemical and chemical-structural properties of húmic substances. *Soil Tillage Research*, 51: 129-137.
- McCarty, G.W., Shogren, D.R., Bremner, J.M. 1992. Regulation of urease production in soil by microbial assimilation of nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*, 12: 261-264.
- McKeague, J.A., Day, J.H., 1965. Dithionite- and Oxalate- Extractable Fe and Al as aids in differentiating various classes of soils. *Canadian Journal Soil Science*, 46.
- Mejía Izarra G. 2005. Estudio de la evolución de la matèria orgànica en procesos de compostaje y secado térmico de fangós de depuradora. Tesi Doctoral. Institut Químic de Sarrià. Universitat Ramon Llull.
- Melé, P.M., Crowley, D.E. 2008. Application of self-organizing maps for assessing soil biological quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 126: 139-152.

Metzger, L., Levalon, D., Mingelgrin, U. 1987. The effect of sewage sludge on soil structure stability: microbiological aspects. *Soil Science Society American Journal*, 51: 346-351.

Miller M., Dick. R. P. 1995. Thermal Stability and Activities of Soil Enzymes as influenced by Crop Rotations. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 1161-1166.

Miller, J.N., Miller, J.C. 2000. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 4th Ed. Prentice Hall. Pearson Education.

Miltner, A., Zech, W. 1998. Carbohydrate decomposition in beech litter as influenced by aluminium, iron and manganese oxides. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1: 1-7.

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. *Biology and Fertility of Soils*, 43: 721-729.

Moliner, M. 2008. *La gestió de llots a Catalunya*. A: La gestió de fangs de les estacions depuradores d'aigües residuals. Àrea de Medi Ambient. Diputació de Barcelona

Monreal, C.M., Bergstrom, D.W. 2000. Soil enzymatic factors expressing the influence of land use, tillage system and texture on soil biochemical quality. *Canadian Journal of Soil Science*, 80: 419-428.

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 àrid soil. *Biology and Fertility of Soils*, 28: 230-257

Moreno, J.L., Jindo, K., Hernández, T., García, C. 2007. Total and immobilized enzymatic activity of organic materials before and after composting. *Compost Science and Utilization*, 15, 2: 93-100.

Morra, M.J. 2002. Assessment of extracellular enzymatic activity in soil. pp459-465. In Hust, R.L., Crawford, G.R., Knudsen, M.J., Mc Inerney and Stetzenbach, L.D. (Eds). *Manual of Environmental Microbiology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Murayama, S. 1984. Decomposition kinetics of straw saccharides and synthesis of microbial saccharides under field conditions. *Journal of Soil Science*, 35: 231-242.

Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, B., Sequi, P. 1978a. Stability and kinetic properties of humus-urease complexes. *Soil Biology and Biochemistry*, 10: 143-147.

Nannipieri, P., Johnson, R.L., Paül, E.A. 1978b. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 10: 223-229.

Nannipieri, P. 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst, C.E., Double, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (Eds) *Soil Biota: Management in Sustainable Farming System*. CSIRO, Melbourne, 238-244.

Nannipieri, P.; Kandeler, E; Ruggiero, P. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: *Enzymes and the Environment, Activity, Ecology and Applications*. Burns R.G Ed. Dick-Dekka, Inc. NY.

Nannipieri, P., Cecherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G.L., Renella, G. 2003. Measurement of intracellular and extracellular enzyme activity in soil. In: Lobo M.C; Ibáñez J.J (Eds). *Preserving soil quality and soil biodiversity*. Instituto Madrileño de Investigación Agrària y Alimentaria. Centro de Ciencias Medioambientales. Comunidad de Madrid.

Nannipieri, P. 2006. Role of stabilized enzymes in microbial ecology and enzyme extraction from soil with potential applications in soil proteomics. In: Nannipieri, P and Smalla, K (Eds). *Nucleic Àcids and Proteins in Soil*. 2006. Springer.

Nannipieri, P, Eldor, P. 2009. The chemical and functional characterization of soil N and its biòtic components. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 2357-2369.

Navarro, A.F., Cegarra, J., Roig, A., Bernal, P. 1991. An automàtic microanalysis method for the determination of orgànic carbon in wastes. *Communications Soil Science Plant analysis*, 22: 2137-2144.

Navarro, A.F., Cegarra, J., Roig, A., Garcia, D. (1993). Relationships between orgànic matter and carbon contents of orgànic waste. *Bioresource Technology*, 44: 203-207.

Nelson, D.W., Sommers, L.E. 1982. Total carbon, Orgànic carbon and Orgànic Matter. In Page, A.L., Miller, R.H., Keeney D.R.(Eds). *Methods of Soil Analysis Part 2: Chemical and Microbiological Properties N°9*. Agronomy Series. *Soil Science Society of America*. Madison. pp 539-579.

Nichols, K.A., Wright, S.F. 2004. Contribution of fungi to soil orgànic matter in agroecosystems. En: *Soil Orgànic Matter in Sustainable agriculture*. Magdoff, F., Weil, R.R. (Eds). CRC Press.

Nortcliff, S. 1997. Standardisation for soil quality attributes In: Gregorich, E.G; Carter M.R. Eds. *Soil quality for crop production and ecosystem health*. Elsevier.

Nortcliff, S. 2002. Standardisation of soil quality attributes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88: 161-168.

Oades, J.M. Kirkman, M.A., Wagner, G.H. 1970. The use of gas-liquid chromatography for the determination of sugars extracted from soils by sulphuric àcid. *Soil Science Society American Proceedings*, 34: 230-235.

Ojeda, G., Alcañiz, J.M, Ortiz, O. 2003. Runoff and losses by erosion in soils amended with sewage sludge. *Land Degradation and Development*, 14:563-573.

Ojeda, G., Alcañiz, J.M., Le Bissonnais, Y. 2008. Differences in aggregate stability due to various sewage sludge treatments on a Mediterranean calcareous soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 125: 48-56.

Ortiz, O. 1998. Activitat biològica i revegetació en sòls de pedreres de calcària restaurats amb fangs de depuradora. Tesis Doctoral. Departament de Biologia Animal de Biologia Vegetal i d'Ecologia. Universitat Autònoma de Barcelona.

Pascual, J.A., Hernandez, T., Garcia, C., Ayuso, M. 1998. Carbon mineralization in an àrid soil attended with orgànic wastes of varying degrees of stability. *Communication Soil Science Plant Analysis*, 29: 835-846.

Pascual, J.A., Garcia, C. Hernandez, T. 1999. Comparison of fresh and composted orgànic waste in their efficacy for improvement of àrid soil quality. *Bioresource Technology* 68:255-264.

Pascual, J.A.; Garcia, C., Hernández, T., Moreno, J.L., Ros, M., 2000. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation process. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1877-1883.

Pascual, J.A., Moreno, J.L., Hernández T., García, C. 2002. Persistence of immobilised and total urease and phosphatase activities in soil amended with orgànic wastes. *Bioresource Technology*, 82: 73-78.

Pascual, I., Antolín, M.C., García, C., Polo, A., Sánchez-Díaz, M. 2007. Effect of water dèficit on microbial characteristics in soil attended with sewage sludge or inorgànic fertilizer under laboratory conditions. *Bioresource Technology*, 98: 29-37.

Pedra, F., Polo, A., Ribeiro, A., Domingues, H. 2007. Effects of municipal sòlid waste compost and sewage sludge on mineralization of soil orgànic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 1375-1382.

Perucci, P. 1992. Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biology and Fertility of Soils*, 14: 54-60.

Piccolo, A., Zena, A., Conte, P. 1996. A comparison of àcid hydrolyses for the determination of carbohydrate content in soils. *Communications Soil Science Plant Analyses*, 27: 2909-2915.

Porta Casanellas, J., López-Acevedo, M., Rodríguez Ochoa, R. 1986. *Técnicas y Experimentos en Edafología*. Col.legi Oficial d'Enginyers Agrònoms de Catalunya. Barcelona.

Puget, P., Angers, D.A., Chenu, C. 1999. Nature of carbohydrates associated with water-stable aggregates of two cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 55-56.

Puglisi E., Del Re A.A.M., Raó, M.A., Gianfreda, L. 2006. Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1673-1681.

Riffaldi, R., Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Menchetti, F. 1994. Chemical characteristics of soil after 40 years of continuous maize cultivation. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 49: 239-245.

Riffaldi, R., Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R. 2002. Biochemical properties of a Mediterranean soil as affected by long-term crop management systems. *Soil Tillage Research*, 67: 109-114.

Roldan, A., García-Orenes, F., Lax, A. 1994. An incubation experiment to determine factors involving aggregation changes in an àrid soil receiving urban refuse. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 12: 1699-1707.

Ros, M., Hernández, M.T., García, C. 2003. Bioremediation of soil degraded by sewage sludge: effects on soil properties and erosion losses. *Environmental Management*, 31: 741-747.

Ros, M., Pascual, J.A., Garcia, C., Hernández, M.T., Insam, H. 2006. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 3443-3452.

Rosell, R.A., Gasparoni, J.C., Galantini, J.A. 2001. Soil Orgànic Matter Evaluation. Assessment Methods for Soil Carbon. Lal, R., Kimble, J.M, Follet, R.F., Stewart, B.A. (Eds) *Advances in Soil Science*. Lewis Publishers. pp 311-348

Rumpel, C., Dignac, M.F. 2006. Gas chromatographic analysis of monosaccharide's in a forest soil profile: Analysis by gas chromatography after trifluoroacetic àcid hydrolysis and reduction-acetylation. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1478-1481.

Saa, A., Trasar-Cepeda, M.C., Gil Sotres, F., Carballas, T. , 1993. Changes in soil phosphorus and àcid phosphatase activity immediately following forest fires. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 1223-1230

Sanger, L.J., Anderson, J.M., Little, D., Bolger, T. 1997. Phenolic and carbohydrate signatures of orgànic matter in soils developed under grass and forest plantations following changes in land use. *European Journal of Soil Science*, 48: 311-317.

Saña Vilaseca, J. 1985. La utilització dels fangs de depuradores urbanes com a adobs: Caracterització de la seva fracció orgànica. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.

Sarathchandra, S.U., Perrott, K.W. 1984. Determination of β -glucosidase activity in soils. *Soil Science*, 138, 1: 15-19.

Sardans, J., Peñuelas, J. 2005. Drought decreases soil activity in Mediterranean Quercus ilex L. forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:455-461.

Sarkar, J.M, Burns, R.G. 1984. Synthesis and properties of β -D-glucosidase-phenolic copolymers as anàlogues of soil humic-enzyme complexes. *Soil Biology and Biochemistry*, 16, 6: 619-625.

Sarkar, J.M., Leonowicz, A., Bollag, J-M., 1989. Immobilization of enzymes on clays and soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 21: 223-230.

SAS Institute. 1990. *SAS Procedure Guide, Version 6, 3rd edition*. SAS Institute, Cary, NC, USA.

Saviozzi, A., Biasci, A., Riffaldi, R., Levi-Minzi R. 1999. Long-term effects of farmyard manure and sewage sludge on some soil biochemical characteristics. *Biology and Fertility of Soils*, 30: 100-106.

Saviozzi, A., Levi-Minzi, R. , Cardelli, R., Riffaldi, R. 2001. A comparison of soil quality in adjacent cultivated, forest and native grassland soils. *Plant and Soil*, 233: 251-259.

Saviozzi, A., Bufalino, P., Levi-Minzi, R., Riffaldi, R., 2002. Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study. *Biology and Fertility of Soils*, 35: 96-101.

Scherz, H., Bonn G., 1998. *Analytical Chemistry of Carbohydrates*. Georg Thieme Verlag. New York.

Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J.C. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98: 255-262.

Schnürer, J, Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 1256-1261.

Sciubba, L., Cavani, L., Marzadoui, C., Ciavatta, C. 2013. Effect to biosolids from municipal sewage sludge composted with rice husk on soil functionality. *Biology and Fertility of Soils*, 49: 597-608.

Senwo, Z.N., Tabatabai, M.A. 1998. Amino acid composition of soil organic matter. *Biology and Fertility of Soils*, 26:235-242.

Senesi, N. 1989. Composted materials as organic fertilizers. *The Science of the Total Environment*, 81/82: 521-542.

Serra-Wittling, C., Houot, S., Barriuso, E. 1995. Soil enzymatic response to addition of municipal solid-waste compost. *Biology and Fertility of Soils*, 20: 226-236.

SHIMADZU. 2001. *User's manual. TOC-V CSH/CSN. User's manual TOC-V Series SSM-5000A Solid Sample Module for Total Organic Carbon Analyser*.

SHIMADZU (en línia). Application Note SCA-130-027. Recovery rates of total organic carbon compounds according to the European Standardisation EN 13137. Appl_ssm_recovery-data_06c_en.pdf.[consulta juny 2012]. Disponible a <www.shimatdzu.com>

SHIMADZU (en línia). Application Note SCA-130-029. Determination of total orgànic carbon in sòlids according to the European Standardisation EN 13137. Appl_ssm_en_13137_06c_en.pdf.[consulta juny 2012]. Disponible a <www.shimatdzu.com>

Singh, R.P., Agrawal, M. 2008. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, 28:347-358.

Sinsabaugh, R.L.; Carreiro, M.M.; Alvarez, S. 2002. Enzyme and microbial dynamics of litter decomposition. In: *Enzymes and the Environment, Activity, Ecology and Applications*. Burns R.G Ed. Dick-Dekka, Inc. NY.

Skujins, F. 1978. History of abiotic soil enzyme research. In Burns R.G.Ed. *Soil Enzymes*. Acadèmic Press.

Sojka, R.E., Upchurch, D.R. 1999. Reservations regarding the soil quality concept. *Soil Science Society of American Journal*, 63,5: 1039-1054.

Soliva, M. 2001. *Compostatge i gestió de residus orgànics*. Servei de Medi Ambient de la Diputació de Barcelona. Estudis i Monografies, 21.

Soliva, M. 2008. La gestió de fangs de depuradora. Bones i males pràctiques. A: *La gestió de fangs de les estacions depuradores d'aigües residuals*. Àrea de Medi Ambient. Diputació de Barcelona.

Sopper, W. 1993. *Municipal Sludge Use in Land Reclamation*. Lewis Publishers.

Sotomayor-Ramírez, D., Espinoza, Y., Acosta-Martínez, V. 2009. Land use effects on microbial biomass-C, β -glucosidase and β -glucosaminidase activities, and availability, storage, and age of orgànic C in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 45: 487-497.

Sparling, G., Vojvodic-Vukovic, M., Schipper, L.A. 1998. Hot-water-soluble C as a simple measure of labile soil orgànic matter: the relationship with microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 10/11: 1469-1472.

Speir, T.W., Ross, D.J., Orchard V.A. 1984. Spatial variability of biochemical properties in a taxonomical-uniform soil under grazed pasture. *Soil Biology and Biochemistry*, 16, 2:153-160.

Speir, T.W., Ross, D.J. 2002. Hydrolytic enzyme activities to asses soil degradation and recovery. In: *Enzymes and the environment, Activity, Ecology and Applications*. Burns R.G Ed. Dick-Dekker, Inc. NY.

Speir, T.W., van Schaik, A. P., Lloyds-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. *Biology and Fertility of Soil*, 38: 377-385.

Speir, T.W., Horswell, J., Schaik van, A.P., McLaren, R.G., Fietje, G. 2004. Composted biosolids enhance fertility of a sandy loam soil under dairy pasture. *Biology and Fertility of Soils*, 40: 349-358.

Spielvogel, S., Prietzel, J., Kögel-Knabner, I. 2007. Changes of lignin phenols and neutral sugars in different soil types of a high-elevation forest ecosystem 25 years after forest dieback. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 655-668.

Stevenson F.J. 1982. Nitrogen-Organic Forms. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney D.R. (Eds). *Methods of Soil Analysis Part 2: Chemical and Microbiological Properties* N°9. Agronomy Series. *Soil Science Society of America*. Madison. pp 625-641.

Szegi, J. 1988. *Cellulose, decomposition and soil fertility*. Akademia Kiado. Budapest.

Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1972. Assay of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 4: 479-487.

Tabatabai, M.A., 1982. Soil Enzymes. In: Page, A.L., Miller, Keeney, D.R. (Eds). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, Soil Science Society of America, Inc, Madison. WI, pp.903-947

Tabatabai, M.A., Dick, W.A. 2002. Enzymes in soil. Research and developments in measuring activities. In: *Enzymes and the Environment, Activity, Ecology and Applications*. Burns R.G Ed. Dick-Dekka, Inc. NY.

Tarrasón, D. 2004. Alternatives de fertilització per a la rehabilitació de sòls degradats: Aplicació de fang fresc, compostat i d'assecatge tèrmic. Tesi Doctoral. Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals (CREAF) i Universitat Autònoma de Barcelona.

Tarrasón, D., Ojeda, G., Ortiz, O., Alcañiz, J.M. 2010. Effects of different types of sludge on soil microbial properties: A field experiment on degraded Mediterranean soils. *Pedosphere*, 20 (6): 681-691.

Tate III, R.L. 1992. *Soil Organic Matter. Biological and Ecological Effects*. Krieger Publishing Company. Florida.

Tate III, R.L. 2000. *Soil Microbiology*. John Wilkey & Sons. New York.

Tate III, R.L. 2002. Microbiology and Enzymology of Carbon and Nitrogen Cycling. In: *Enzymes and the environment, Activity, Ecology and Applications*. Burns R.G Ed. Dick-Dekka, Inc. NY.

Trasar-Cepeda, M.C., Gil Sotres, F., Guitian Ojea, F. ,1985. Determinación de la actividad fosfatasa en suelos gallegos. Precisiones al método de Sarathchandra y Perrott. *Anales d'Edafologia y Agrobiologia*, 44: 987-991.

Trasar-Cepeda M.C., Gil-Sotres, F. 1988. Kinetics of phosphatase activity in various soils of Galicia (NW Spain). *Soil Biology and Biochemistry*, 20, 3: 275-280.

- 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. *Biology and Fertility of Soils*, 26: 100-106.
- Trasar-Cepeda, M.C., Leirós, M.C., Seoane, S., Gil Sotres, F. 2000a. Limitations of soil enzyme as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1867-1875.
- Trasar-Cepeda, M.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 Biology and Biochemistry* 32: 747-755.
- Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., Leirós, M. C. 2007. Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 1: 311-319.
- 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 Biology and Biochemistry*, 40: 2146-2155.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., Seoane, S., Gil-Sotres, F. 2008b. Biochemical properties of soils under crop rotation. *Applied Soil Ecology*, 39: 133-143.
- Turco, R.F., Kennedy, A.C., Jawson, M.D. 1994. Microbial indicators of soil quality. In: *Defining Soil Quality for Sustainable Environment*. Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdick, D.F., Stewart, B.A. Eds. SSSA. Special publication num. 35. *Soil Science Society of American*. Madison, USA.
- Turner, B.L., Hopkins, D.W., Haygarth, P.M., Ostle, N., 2002. β -glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology*, 20: 157-162.
- UNE 77303:1997. *Calidad de suelo. Pretratamiento de muestras para los análisis físico-químico*. AENOR. Madrid.
- UNE 77317:2001. *Calidad de suelo. Determinación del contenido en carbonato. Método volumétrico*. AENOR. Madrid.
- UNE-EN 13137:2002. *Caracterización de residuos. Determinación de carbono orgánico total (TOC) en residuos, lodo y sedimentos*. AENOR. Madrid.
- UNE 77321:2003. *Norma española de calidad de suelo determinación de carbono orgánico i carbono total mediante combustión seca (análisis elemental)*. AENOR. Madrid.
- Vance, D.E., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 703-707.
- Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Moreno, J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Management*, 30: 771-778.

Vepsäläinen, M., Kukkonene, S., Vestberg, M., Sirviö, H., Niemi, R.M., 2001. Application of soil enzyme activity test kit in a fields experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1665-1672.

Visser, S., Parkinson, D. 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: Soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7: 33-37.

Vuorinen, A.H., 1993. Requirement of p-nitrophenol standard for each soil. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 295-296.

Waldrop, M.P., Balsler, T.C., Firestone, M.K. 2000. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1837-1846.

Walkley, A., Black, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid and titration method. *Soil Science*, 37: 29-38.

Walkley, A. 1935. An examination of methods for determining organic carbon and nitrogen in soils. *The Journal of Agricultural Science*, 25: 598-609.

Wallenstein, M., Weintraub, M. 2008. Emerging tools for measuring and modelling the in situ activity of soil extracellular enzymes. 2008. *Biology and Biochemistry*, 40: 2098-2106.

Zhang, Y., Chen, L., Wu, Z., Sun, C. 2011. Kinetic parameters of soil β -glucosidase response to environmental temperature and moisture regimes. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35:1285-1291.

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 Biology and Biochemistry*, 38: 2125-2134.

Zornoza, R., Mataix-Solera, J., Guerrero, C., Arcenegui, V., García-Orenes, F., Mayoral, A.M., Mataix-Beneyto, J., Morugán, A. 2007a. Evaluation of soil quality using multiple lineal regression based on physical, chemical and biochemical properties. *Science of the Total Environment*, 378: 233-237.

Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Guerrero, C., Arcenegui, V., Mayoral, A.M., Morales, J., Mataix-Beneyto, J.. 2007b. Soil properties under natural forest in the Alicante Province of Spain. *Goedermia*, 142: 334-341.

Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Arcenegui, V., García-Orenes F., Mataix-Beneyto, J., 2007c. Assessing the effects of air-drying and rewetting pre-treatment on soil microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soluble carbon under Mediterranean conditions. *European Journal of Soil Biology*, 43: 120-129.

Zornoza, R., Mataix-Solera, J., Guerrero, V., Arcenegui, V., J., Mataix- Beneyto, J., Gómez I. 2008a. Validating the effectiveness and sensitivity of two soil quality indices based on natural forest soils under Mediterranean conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2079-2087.

Zornoza, R., Guerrero, C, Mataix-Solera, J, Scow, KM, Arcenegui, V, Mataix-Beneyto, J. 2008b. Near infrared spectroscopy for determination of various physical, chemical and biochemical properties in Mediterranean soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1923-1930.

8.1 PUBLICACIONES ASOCIADAS A LA TESI

Jiménez, P., Bonmatí, M.. 2003. Determinación de la actividad β -glucosidasa del suelo. *Técnicas d'anàlisis de paràmetros bioquímicos en suelos: medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. García C., Gil, F., Hernández, T., Traçar, C. (Eds). Mundi-Prensa.pp171-183.

Jiménez, P., Ortiz, O., Tarrasón, D. Ginovart, M., Bonmatí, M. 2007. Effect of differently post-treated dewatered sewage sludge on b-glucosidase activity, microbial biomass carbon, basal respiration and carbohydrates content of soils from limestone quarries. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 393-398.

Jiménez, P., Marando, G., Josa, R., Julià, 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., Garcia-Izquierdo, C., Hernandez, T. (Eds). Springer.

Marando, G., Jiménez, P., Josa, R., Julià, 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., Garcia-Izquierdo, C., Hernandez, T. (Eds). Springer.

Descripció de la Metodologia Analítica



Foto: Derivat colorejat format en la reacció de l'antrona i els carbohidrats

ANNEX: DESCRIPCIÓ DE LA METODOLOGIA ANALÍTICA

Carboni orgànic per combustió (TOC)	
1	Instrumental i Material
	Analitzador de carboni SHIMADZU TOC-V CSH/CSN amb el mòdul de mostra sòlida SSM-5000A Cubetes ceràmica Fibra de vidre Forn-mufla
2	Reactius
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Glucosa anhidre (s) ✓ Na₂CO₃ anhidre (s) ✓ Glucosa de 10, 30 i 100 mg/mL ✓ Na₂CO₃ de 20 mg/mL i 60 mg/mL ✓ H₃PO₄ diluït (1 a 2 amb aigua destil·lada) ✓ HCl 2 M o bé H₂SO₄ 2 M (per neteja de les cubetes)
3	Procediment
Preparació	Patrons assecats i guardats en dessecador
	<p>Neteja de les cubetes (submergir 10 minuts en àcid i esbandir; assecar i tractar 20 minuts a la mufla a 900°C)</p> <p>Mostres moltes amb molí d'àngata i tamisades amb el sedàs de 0,250 mm</p> <p>Posar en marxa l'aparell: control de la temperatura dels forns (TC o bé IC) i dels gasos (IMPORTANT: l'aire i oxigen s'ha d'obrir per ambdues determinacions)</p>
Calibració	<p>Pesar el reactiu sòlid a la cubeta o bé addicionar els µL (amb micropipeta) a la cubeta amb cobertura de fibra de vidre</p> <p>Mesurar el blanc amb una cubeta buida</p>
Carboni total (CT)	<p>Pesar entre 75-100 mg de mostra a la cubeta, distribuir regularment el contingut (copets) i cobrir amb fibra de vidre</p> <p>Col·locar la cubeta en el suport del port del forn a 900°C i tancar</p> <p>Esperar 2 min abans de introduir la mostra en el forn per evitar la influència del CO₂ atmosfèric</p> <p>Visualitzar el registre gràfic mv/temps dels pics fins que s'estabilitzi i realitzi la integració de l'àrea</p> <p>Anotar el resultat del pes (mg) de C detectat d'acord a la calibració introduïda (o bé d'àrea si no s'ha introduït la calibració)</p> <p>Retirar el port que treu la cubeta del forn, esperar que es refredi, obrir i treure la cubeta amb les pinces. Deixar-la amb compte en un vas de precipitats per a què es refredi</p>
Carboni inorgànic (CI)	<p>Per a la determinació del carboni inorgànic s'han de seguir el mateix procediment descrit pel carboni total amb les diferències següents: No es posa cobertura amb fibra de vidre. El forn de CI ha d'estar a la temperatura de 200°C</p> <p>S'addiciona a la cubeta 0,5 mL H₃PO₄ diluït des del dosificador, un cop tancat el forn, passats els 2 minuts i abans d'introduir el port que la condueix al forn</p>

Carboni orgànic per combustió (TOC)	
4	Càlculs
	Obtenir la recta de calibració entre la quantitat de C dels patrons en mg i l'àrea de cada pic
Dades	Pm=mg de sòl (CT) Pc= mg C total Pm=mg de sòl (CI) Pc= mg C inorgànic H=g aigua per 100 g de sòl
	$CT = \frac{Pc \text{ mg C total}}{Pm \text{ mg sòl}} \cdot 100 = \text{g C total per 100 g de sòl}$
	$CI = \frac{Pc \text{ mg C inorgànic}}{Pm \text{ mg sòl}} \cdot 100 = \text{g C inorgànic per 100g de sòl}$
	$TOC = TC - IC * I$ C*inorgànic= mitjana IC rèpliques $TOC = \frac{\text{g C orgànic}}{100 \text{ g de sòl}} \cdot \frac{100 \text{ g sòl}}{(100 - H) \text{ g sòl sec}} \cdot 100 = \% \text{ Corgànic (s. m. s)}$
5	Observacions
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ La manipulació de les cubetes es fa sempre amb pinces ➤ Cal determinar la humitat de les mostres ➤ El límit de detecció es troba entre 0,15-0,20 % ➤ La precisió de la tècnica permet donar el resultat en percentatge amb tres xifres decimals

Carboni orgànic per oxidació (Espanya, 1993)	
1	Instrumental
	Material de vidre bàsic de laboratori
2	Reactius
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ag₂SO₄ ✓ K₂Cr₂O₇ 1 N. Dissoldre 49,05 g de K₂Cr₂O₇ assecat (1 hora a 105°C) en aigua i enrasar a un litre ✓ Àcid sulfúric concentrat que contingui 25 g Ag₂SO₄ per litre ✓ Àcid fosfòric concentrat ✓ Difenilamina en solució sulfúrica. Dissoldre 0,5 g de difenilamina en 20 mL d'aigua i afegir 100 mL d'àcid sulfúric concentrat. ✓ Sal de Mohr 0,5 N. Dissoldre 196,1 g de Fe(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O en 800 mL d'aigua que contingui 20 mL de àcid sulfúric concentrat i enrasar a 1 L. Normalitzar amb K₂Cr₂O₇ 1 N
3	Procediment
	<p>Pesar en balança analítica al voltant de 0,5 g de mostra (terra fina triturada i tamisada pel sedàs de 0,250 mm) i col·locar-la en un Erlenmeyer de 500 mL</p> <p>Afegir 10 mL de dicromat potàssic i barrejar bé amb el sòl</p> <p>Afegir lentament i agitant 20 mL de àcid sulfúric</p> <p>Deixar en repòs 30 minuts</p> <p>Afegir 200 mL d'aigua, deixar refredar i afegir 10 mL de àcid fosfòric i agitar</p> <p>Afegir 4-5 gotes d'indicador i valorar amb sal de Mohr (SM) amb agitador magnètic i fins canvi de color (de vermellós-blau-violeta a verd)</p> <p>Efectuar paral·lelament un blanc, sense mostra</p>
4	Càlculs
Dades	<p>V_b=mL SM consumits en el blanc</p> <p>V_m= mL SM consumits en el la mostra</p> <p>f=factor d'estandardització de la SM</p> <p>P=mg de sòl</p> <p>H=g aigua per 100g de sòl</p>
	<p>Estandardització de la sal de Mohr</p> $f = \frac{10 \text{ mL } \cdot 1N}{V_b \cdot 0,5N}$
	<p>C orgànic oxidable</p> $\frac{(V_b - V_m) \text{ mL SM } (0,5 \cdot f) \text{ eq SM}}{P \text{ mg sòl}} \cdot \frac{1 \text{ eq C}}{1000 \text{ mL SM}} \cdot \frac{3 \text{ g C}}{1 \text{ eq C}} \cdot \frac{1000 \text{ mg C}}{1 \text{ g C}} \cdot 100 = \text{g C oxidable per 100 g de sòl}$ $\frac{\text{g C oxidable}}{100 \text{ g de sòl}} \cdot \frac{100 \text{ g sòl}}{(100 - H) \text{ g sòl sec}} \cdot 100 = \% \text{ C oxidable (s.m.s)}$ <p style="text-align: center;">% C orgànic (s.m.s) = 1,29 · % C oxidable (s.m.s)</p>
5	Observacions
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les determinacions es fan per triplicat ➤ S'ha de fer tot el procediment igual, però sense mostra (blanc) ➤ Quan es redueix més del 80 % del dicromat la determinació s'ha de repetir amb menys pes de mostra de sòl ➤ Cal determinar la humitat de les mostres ➤ El factor de recuperació (per transformar el C oxidable a C orgànic) igual a 1,29 d'acord amb Nelson i Sommers (1982) ➤ El límit de detecció depèn de la diferència de volums consumits entre blanc i mostra; si es pot detectar per una diferència de 0,1-0,3 mL SM el límit de detecció estaria entre 0,08-0,11 % de Corg per un pes de 500 mg ➤ Les rèpliques per una mateixa mostra donen un CV que oscil·la entre els valors de 2-10 %

N-aminoacídic (Mejía, 2005)	
1	Instrumental i material
	<p>Cromatògraf Alliance Waters 2690 amb detector de fluorescència de longitud d'ona variable Waters 470 i estació Millenium per adquisició de dades</p> <p>Erlenmeyers esmerilats de 250 mL</p> <p>Refrigerants</p> <p>Placa calefactora</p> <p>Cresols filtrants, kitasatos i sistema filtració al buit</p> <p>Corrent de N₂</p> <p>Micropipetes</p> <p>Vials (de 20mL i de 2 mL) i insert (200 µL)</p>
2	Reactius
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ HCl 6 M. Mesurar 497 mL de HCl concentrat PA (densitat 1,19 kg/L i riquesa 37 %) i afegir aigua miliQ fins a un litre ✓ HCl 0,1M ✓ Kit Waters ACCQ-Tag (052880). Tampó borat pH 8,8 i dissolució AQC 10 mM (reactiu AccQ-Fluor) ✓ Patró <i>Pierce</i>. Solució de 17 AA proteics (Asp, Ser, Glu, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Cys, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Leu i Phe) en medi HCl 0,1M de concentració 2,5 mM a excepció de la Cys que es 1,25mM. ✓ Patró intern. Solució de Nor-Leucina 2,5 mM en HCl 0,1 M ✓ Tampó concentrat (pH 11). 140 mM en acetat sòdic i 17 mM en trietanolamina (133,36 g CH₃COONa.3H₂O en 600 mL d'aigua miliQ; 12 g de trietanolamina i 100 mL d'aigua miliQ) ✓ Tampó fase mòbil pH 5,05. Mesurar 200 mL de tampó concentrat de pH 11 i diluir amb aigua miliQ fins a 2 L. Ajustar el pH a 5,05 afegint poc a poc H₃PO₄ concentrat. Enrasar i filtrar. ✓ Acetonitril
3	Procediment
Hidròlisi	<p>Pesar 5 g de sòl (fracció terra fina assecada a l'aire) en un erlenmeyer i afegir 90 ml de HCl 6 M (aquesta addició convé fer-la sota la campana i a poc a poc per controlar l'efervescència deguda a carbonats)</p> <p>Acoblar l'erlenmeyer al refrigerant i escalfar a reflux a 105°C (bullint suaument) durant 6 hores</p> <p>Deixar refredar i filtrar al buit amb cresols filtrants (num 2)</p> <p>Rentar i aforar amb HCl 6 M a 100 mL</p>
Cromatografia	<p>Pipetejar 5 mL d'hidrolitzat en un vial de vidre i addicionar, amb micropipeta, 200 µL de patró intern i agitar</p> <p>Introduir 10 µL de la barreja anterior en un vial d'injecció de 2 mL i portar a sequedat amb corrent de N₂</p> <p>Addicionar 70 µL de tampó borat i 20 µL de dissolució AQC. Agitar amb la punta de la micropipeta de forma que es netegin bé les parets del vial. El volum total és només de 90 µL per tant s'ha de traspasar, amb la mateixa punta de pipeta, a un insert de injecció</p> <p>Finalment l'insert es posa en el vial i es porta a injectar al cromatògraf</p> <p>Introduir en un vial de 2 mL, 40 µL de patró <i>Pierce</i>, 40 µL de patró intern i 920 µL de HCl 0,1 M</p> <p>Agitar i prendre 10 µL que s'introdueixen en un altre vial. Addicionar 70 µL de tampó borat i 20 µL de dissolució AQC. El volum total de 100 µL s'agita amb la punta de la micropipeta i es transvasa a un insert d'injecció</p> <p>Finalment l'insert es posa en el vial i es porta a injectar al cromatògraf. El vial del blanc es prepara igual que el patró, però substituint el volum de patró (40 µL) per HCl 0,1 M</p> <p>Definir la seqüència del conjunt de mostres a analitzar i es programa el cromatògraf de forma que comença pel blanc, el patró (inicial, intermig i final) , i dues injeccions per vial</p>


N-aminoacídic (Mejía, 2005)					
Condicions cromatogràfiques	Columna Nova-Pak C18 (4microm, 3.9 x 150 mm)				
	Temperatura columna 37°C				
	Volum d'injecció 5 µL				
	Flux 1 ml/min				
	Detecció λ ex = 250nm i λ em = 395nm				
	Gradient d'eluent: A: Tampó de pH 5,05 B: Acetonitril C: Aigua miliQ				
	Temps (min)	% A	%B	%C	Corba (*)
	0	100	0	0	---
	0,5	99	1	0	11
	18,0	95	5	0	6
19,0	91	9	0	6	
29,5	83	17	0	6	
33,0	0	60	40	11	
38,0	100	0	0	11	
40,0	100	0	0	11	
(*) La corba és el tipus de canvi de composició (6 és gradient lineal i 11 és canvi ràpid) dels sistemes de bombes de Waters					
4	Càlculs				
<p>Amb el programa del cromatògraf s'identifiquen els diferents pics del cromatograma de les mostres que corresponen als diferents aminoàcids i es quantifiquen les seves àrees. Per a fer els càlculs es treballa amb les mitjanes de les àrees de les tres injeccions de patró i el sistema de quantificació de patró intern. La concentració real de cadascun dels AA de la mostra es dedueix de la fórmula:</p> <p>Conc AA real vial de mostra (mM) =</p> $\frac{\text{Area mostra}/\text{Area p intern mostra}}{\text{Area patró}/\text{Area p intern patró}} * [\text{P intern mostra}]$ <p>sabent que [P intern mostra] = 0,0107mM</p> <p>Aplicar factors de conversió per a expressar el resultat en mg de AA per a cada g de sòl. El resultat es pot expressar com a suma del conjunt d'AA o bé, tenint en compte el contingut en N de cadascun del AA analitzats, com a N- aminoacídic.</p> <p>Si utilitzem un full de càlcul fem el següent:</p> <p>Calcular el factor resposta per a cada aminoàcid fórmula on mg/L vial PM*0,01 ja que la concentració de cadascun dels AA i de la NLeu en el vial és 0,01 mM (i 0,005 mM per a la Cys)</p> <p>Calcular la concentració experimental de cadascun dels aminoàcids en el vial de mostra a partir de les seves àrees i el factor de resposta corresponent</p> <p>Calcular la relació entre la concentració experimental i real per al patró intern tenint en compte que la concentració real de Nor-Leu en el vial de mostra és de 2,471 mg/l. Aplicar aquest relació per a calcular la concentració real de cadascun del AA en el vial de mostra</p>					

N-aminoacídic (Mejía, 2005)	
5	Observacions
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Per cada mostra el resultat és la mitjana de 4 valors ja que el procés d'hidròlisi es fa per duplicat i cada vial s'injecta dues vegades ➤ La precisió és bona; el valor de CV es situa al voltant del 5 % i oscil·len entre 1-10 % ➤ Per a analitzar moltes mostres convé disposar d'un sistema de reflux per 4-8 Erlemeyers i fer la hidròlisi simultàniament. La filtració es pot fer el dia següent a la hidròlisi i els hidrolitzats es guarden en el congelador ➤ El procés de derivatització es pot aturar deixant les mostres en el vial un cop s'han evaporat a sequedat. Els vials ja preparats per a la injecció es poden guardar a la nevera una setmana ➤ Tenir el cromatògraf programat per 24h representa processar 16 mostres amb dues injecció per mostra, tres injeccions del patró i un de blanc amb un consum de 2 L de fase mòbil

Taula 0.1. Resultats de l'anàlisi de N-aminoacídic en el conjunt de mostres

Tractament	N aminoacídic	Arg	Gly	Ala	Asp	Ser	Glu	Thr	Pro	Val	Lys	Ile	Leu	His	Phe	Tyr	Met	
	mg N-AA g ⁻¹	%																
Experiència 1: Lisímetres	ADL	0,612	18,3	12,5	9,6	5,4	7,8	6,4	6,6	5,9	5,5	5,1	3,7	6,1	2,9	3,8	0,2	0,2
	ADH	1,512	19,1	12,4	8,9	4,7	7,9	6,5	6,9	5,1	5,6	4,5	3,3	6,3	3,6	4,3	0,7	0,3
	ATL	1,118	18,7	12,4	9,7	4,7	7,4	6,6	6,4	5,3	5,7	4,9	3,8	6,4	3,3	4,2	0,3	0,2
	ATH	1,654	19,4	12,6	9,0	4,6	7,7	6,4	6,8	4,9	5,7	4,1	3,9	6,5	2,5	4,7	0,4	0,5
	ACL	0,450	19,4	14,7	9,4	6,8	7,2	7,3	5,5	4,4	5,2	4,8	4,5	5,7	0,9	3,6	0,5	0,0
	ACH	0,776	19,0	13,9	9,4	6,9	6,5	7,2	5,1	5,6	5,4	4,7	4,5	5,9	2,0	3,4	0,4	0,1
	COA	0,093	9,8	15,1	10,6	11,1	6,7	8,3	7,0	6,6	5,2	6,2	3,6	5,2	0,3	3,5	0,9	0,0
	SDL	0,403	11,6	12,9	11,1	7,7	8,2	8,5	5,8	5,1	5,6	4,6	5,1	6,9	2,4	4,3	0,2	0,0
	SDH	0,726	12,0	13,5	11,9	6,3	7,6	7,5	5,6	5,3	5,9	5,1	5,0	7,4	2,2	4,5	0,2	0,0
	STL	0,479	11,4	11,5	12,2	7,7	6,7	9,5	5,9	4,6	5,9	5,9	4,8	6,8	3,0	3,7	0,4	0,0
	STH	0,976	11,4	10,9	10,8	7,1	6,3	8,2	5,6	5,7	5,5	4,7	4,2	6,4	2,9	3,7	0,7	0,0
	SCL	0,170	11,9	13,8	11,9	6,7	7,7	7,7	6,3	4,9	5,6	4,5	4,7	7,2	2,0	4,4	0,6	0,0
	SCH	0,334	12,1	13,6	11,3	7,2	7,9	7,8	6,2	4,8	5,4	4,5	4,4	7,0	2,6	4,2	0,9	0,0
COS	0,022	0,0	21,2	16,3	0,0	15,8	0,0	4,5	6,6	7,3	8,4	3,8	7,2	0,0	4,3	4,6	0,0	
Experiència 2: Parcel·les	FD	0,556	15,2	14,8	8,6	10,0	6,8	7,3	5,5	5,9	4,8	6,7	3,1	4,9	2,6	2,6	1,3	0,0
	FT	0,622	15,1	14,9	8,5	10,1	7,0	7,3	5,6	5,7	4,8	6,6	3,0	4,9	2,7	2,6	1,2	0,1
	FC	0,389	12,3	16,2	8,5	9,7	7,9	7,1	6,2	5,3	4,8	6,5	3,1	5,0	2,6	2,9	2,0	0,0
	FO	0,195	9,7	15,1	9,5	10,9	7,2	7,5	6,4	5,8	5,3	7,1	3,5	6,0	1,2	3,6	1,1	0,0
	FrD	0,287	12,3	13,0	9,6	8,8	8,0	8,7	6,7	5,1	5,0	5,9	3,5	6,0	2,2	3,2	2,0	0,0
	FrT	0,206	11,8	13,6	10,6	8,1	8,9	8,7	8,2	5,4	5,4	6,5	3,7	6,2	1,0	3,2	1,7	0,0
	FrC	0,228	13,0	12,6	9,9	8,2	8,4	8,6	6,9	5,3	5,1	6,1	3,6	6,1	1,2	3,2	1,7	0,0
	FrO	0,137	7,8	13,3	10,7	11,1	7,7	10,1	5,3	5,3	5,1	6,0	3,6	6,8	2,9	3,6	0,8	0,0

Carbohidrats totals i Carbohidrats extractables (Brink et al., 1960; Cheshire, 1979; Kinsbursky et al., 1989; Badalucco et al., 1992)	
1	Instrumental i material
	Botelles de vidre amb tap de tefló Botelles extracció Equip de filtració (kitasatos i gresols filtrants) Paper de filtre Whatman 42/Paper de filtre sense cendres Tubs d'assaig i agitador de tubs Bany d'aigua amb gradeta
2	Reactius
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ H₂SO₄ 4 M. A 300 mL d'aigua destil·lada afegir 222 mL de H₂SO₄ concentrat (96 % i densitat 1,84g/mL). Refredar i enrasar a un litre ✓ H₂SO₄ 0,5 M. En un aforat de 2 L afegir aigua destil·lada i 55,5 mL de H₂SO₄ concentrat (96 % i densitat 1,84 g/mL). Refredar i enrasar ✓ NaOH 2 M. Dissoldre 82,47 g de NaOH (97 %) en aigua i enrasar a un litre ✓ NaOH 0,2 M. Dissoldre 8,25 g de NaOH (97 %) en aigua i enrasar a un litre ✓ K₂SO₄ 0,5 M. dissoldre 87,1 g de K₂SO₄ en 1 litre ✓ H₂SO₄ 75 %(v/v). Barrejar 250 mL d'aigua destil·lada i 750 mL de H₂SO₄ concentrat (96 % i densitat 1,84 g/mL; important ha de ser reactiu PA, alta puresa) ✓ Dissolvent H₂SO₄/NaOH de pH 7. Barrejar 600 mL de H₂SO₄ 0,5 M i 300 mL de NaOH 2 M i ajustar el pH a 7 afegint-hi H₂SO₄ 0,5 M o NaOH 0,2 M. Transvasar a un aforat de 1 L i enrasar amb aigua destil·lada ✓ Solució d'antrona 0,1 %. Dissoldre 0,2 g del reactiu antrona (9,10-dihidro-9-oxoantracè; C₁₄H₁₀O) en 180 mL de H₂SO₄ 75 %(v/v) amb un agitador magnètic. Transvasar a un aforat de 200 mL i enrasa amb H₂SO₄ 75 %(v/v). Preparar aquesta solució abans de cada determinació i conservar-la en nevera fins a la seva utilització ✓ Solució mare de glucosa 0,1 %. Dissoldre 1 g de glucosa (amb el dissolvent H₂SO₄/NaOH de pH 7 per la determinació de CHT i en K₂SO₄ 0,5 M per a la determinació de CHE) fins a 1 L ✓ Patrons de glucosa entre 20-120 mg/L. Es preparen sis patrons afegint 0, 1, 2, 3 ,4 i 5 mL de solució mare de glucosa i enrasant a 50 mL amb el dissolvent H₂SO₄/NaOH o bé K₂SO₄ 0,5 M
3	Procediment
CHT: hidròlisi	Pesar en una ampolla de 150 mL, 2,00 g de mostra (o el pes equivalent a 20-80 mg de C) Afegir 7,5 mL de H ₂ SO ₄ 4M i deixar reposar 16 hores Diluir fins a 0,5 M afegint lentament 52,5 mL d'aigua destil·lada Escalfar a 100°C en estufa 5 hores i deixar refredar Filtrar en un kitasato a través de placa filtrant num 2 Transvasar el filtrat a un erlenmeyer de 250 mL rentant el kitasato Neutralitzar fins a pH 7 afegint 27 mL de NaOH 2 M i ajustant amb NaOH 0,2 M o amb H ₂ SO ₄ 0,5 M Passar quantitativament el contingut a un aforat de 100 mL Filtrar amb paper de filtre
CHE: extracció	Pesar 5,00 g de mostra en botelles d'extracció Afegir exactament 25 mL de K ₂ SO ₄ 0,5 M Posar-les en el voltejador a temperatura ambient durant 1 hora Filtrar a través de paper de filtre

Carbohidrats totals i Carbohidrats extractables (Cheshire, 1979; Kinsbursky et al., 1989; Brink et al., 1960; Badalucco et al., 1992)	
CHT i CHE: Quantificació	<p>Afegir 1 mL de hidrolitzat (en el cas de CHT) o bé d'extracte (en el cas de CHE) en un tub d'assaig; pels patrons 1 mL de cada solució patró i pel blanc 1mL de la solució dissolvent H₂SO₄/NaOH de pH 7 Introduir la solució d'antrona 0,1 % i els tubs d'assaig en un bany de gel Afegir 5 mL de solució d'antrona (pipeta automàtica) freda a cadascun dels tubs Agitar amb l'agitador de tubs i refredar ràpidament Submergir els tubs en un bany d'aigua bullint durant 10 minuts (s'ha de comptar el temps a partir de quan l'aigua torna a bullir) Immediatament després de passar els 10 minuts, refredar els tubs en un bany a temperatura ambient. El refredament ha de ser simultani i de cop per tots els tubs Llegir la Absorbància a $\lambda=625$ nm davant el blanc de reactius</p> 
4	Càlculs
Dades	<p>Obtenir la recta de calibració G= concentració mg/L de l'extracte d'acord a la recta de calibració P= g de sòl</p>
CHT	$\frac{G \text{ mg glucosa}}{L \text{ hidrolitzat}} \cdot \frac{0,1L \text{ hidrolitzat}}{P \text{ g sòl}} \cdot \frac{100g \text{ sòl}}{(100 - H)g \text{ sòl sec}} = \text{mg glucosa/g sòl (s.m.s)}$
CHE	$\frac{G \text{ mg glucosa}}{L \text{ extracte}} \cdot \frac{0,025L \text{ extracte}}{P \text{ g sòl}} \cdot \frac{100g \text{ sòl}}{(100 - H)g \text{ sòl sec}} = \text{mg glucosa/g sòl (s.m.s)}$
5	Observacions
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Els extractes i els hidrolitzats, un cop neutralitzats i filtrats, es poden congelar si no es fa immediatament la reacció colorimètrica ➤ El patrons de glucosa es preparen cada vegada que es fa la quantificació ➤ Si la mostra és molt rica en matèria orgànica es pesa menys quantitat ➤ Si cal fer dilucions per la lectura de CHT es dilueix amb el dissolvent i per CHE amb la solució de sulfat potàssic ➤ Es fa per duplicat i la lectura per triplicat ➤ La recta es fa per duplicat ➤ L'equació de la recta de calibració presenta una pendent que pot oscil·lar entre 0,0061-0,0072, l'ordenada en l'origen entre 0,0003-0,0174 i el valor de R² de la linealitat 0,9930-0,9998 ➤ L'assaig de precisió per CHE (4 rèpliques) per un contingut de 0,245 mg glucosa/g la s=0,007 i el CV=3,93 % ➤ Els CV poden oscil·lar entre 1-15 % , però majoritàriament són inferiors al 5 % especialment per CHE ➤ El límit de detecció és de 0,1 mg glucosa g⁻¹ per CHE i de 1 mg glucosa g⁻¹ per CHT ➤ Els resultats s'expressen amb 3 xifres decimals

Activitats enzimàtiques β-glucosidasa i β-galactosidasa (Tabatabai, 1982; Trasar-Cepeda et al., 1985 i 2000; Jiménez i Bonmatí, 2003)	
1	Instrumental i material
	Balança analítica Bany d'aigua amb termòstat i sistema d'agitació Espectrofotòmetre pH-metre Agitador de tubs Erlenmeyers de 50 mL/Botelles rosca [50 mL 1515/02D Pyrex] Pipetes i pipetes automàtiques Embuts 4 cm de diàmetre [Kartell 147] Graella i tubs de fons pla (20 mL) Gel Paper de filtre Whatman 40 (diàmetre 90 mm) (144090)
2	Reactius
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ HCl 0,5 M (corba de neutralització i ajust de la suspensió a pH 6) Mesurar 41,5 mL de HCl concentrat (37 % puresa i densitat 1,19 g.mL⁻¹) i enrasar a un litre amb aigua destil·lada ✓ HCl 0,1 M (preparació del tampó MUB-HCl) Mesurar 8,29 mL de HCl concentrat (37 % puresa i densitat 1,19 g.mL⁻¹) i enrasar a un litre amb aigua destil·lada ✓ Na OH 1 M (preparació del tampó MUB) Es prepara a partir de 41,23 g de NaOH del 98 % i s'enrasa a un litre amb aigua destil·lada ✓ Na OH 0,5 M (preparació de THAM-NaOH) Es mesuren 100 mL de la dissolució de NaOH 1 M i se li afegeixen 100 mL d'aigua destil·lada ✓ SOLUCIÓ TAMPÓ MUB (Modified Universal Buffer) Es pesen: 12,2 g de THAM(tris-(hidroximetil)-aminometà)(C₄H₁₁NO₃), 11,6 g d'àcid maleic, 14 g de àcid cítric i 6,28 g de àcid bòric H₃BO₃, es dissolen en aigua i s'afegeix 488 mL de NaOH 1M. S'enrasa a un litre amb aigua destil·lada. Es guarda a la nevera. ✓ SOLUCIÓ TAMPÓ MUB-HCl (pH \approx 9) Barrejar 200 mL solució tampó MUB amb 100 mL HCl 0,1 M i enrasar a 1 L amb aigua destil·lada ✓ SOLUCIÓ TAMPÓ MUB-HCl (pH 6) Barrejar 200 mL solució tampó MUB amb 500-650 mL HCl 0,1 M i enrasar a 1 L amb aigua destil·lada ✓ SOLUCIÓ THAM-NaOH 0,1 M pH 12 (extractant) Pesar 12,2 g de THAM (tris (hidroximetil) aminometà i dissoldre en aproximadament 800 mL d'aigua destil·lada; ajustar pH amb NaOH 0,5 M fins a pH 12 i enrasar a 1 L amb aigua destil·lada ✓ SOLUCIÓ de CaCl₂ 2 M Pesar 147 g de CaCl₂.2H₂O i dissoldre en 500 mL d'aigua destil·lada ✓ SOLUCIÓ DE SUBSTRAT p-nitrofenil-β-D-Glucopiranosido/p-nitrofenil-β-D-Galactopiranosido 25 mM. Pesar 0,377 g de p-nitrofenil β-D-Glucopiranosido/p-nitrofenil-β-D-Galactopiranosido i dissoldre en 50 mL de tampó (MUB-HCl) del pH adequat. Dissoldre amb agitador perquè costa una mica. ✓ SOLUCIÓ MARE de p-nitrofenol de 1000 mgL⁻¹ Pesar exactament 500 mg p-nitrofenol i dissoldre en aigua, enrasar a 500mL Es guarda a la nevera i es conserva molt de temps. ✓ SOLUCIONS PATRÓ de p-nitrofenol (20, 50, 100 i 200 mg L⁻¹) Patró de 20 mg.L⁻¹: Pipetejar 2 mL de la solució mare i enrasar a 100 mL Patró de 50 mg.L⁻¹: Pipetejar 5 mL de la solució mare i enrasar a 100 mL Patró de 100 mg.L⁻¹: Pipetejar 10 mL de la solució mare i enrasar a 100 mL Patró de 200 mg.L⁻¹: Pipetejar 20 mL de la solució mare i enrasar a 100 mL. ✓ Guardar a nevera.

Activitats enzimàtiques β-glucosidasa i β-galactosidasa (Tabatabai, 1982; Trasar-Cepeda et al., 1985 i 2000; Jiménez i Bonmatí, 2003)	
3	Procediment
Assaig previ	<p>Mesura del pH de la suspensió sòl-tampó:</p> <p>Per a cada tipus de sòl es pesa 1,5 g de sòl en tubs de fons estret, se li afegeix 4 mL del tampó MUB-HCl (pH 6), 2 mL d'aigua destil·lada i 1 mL de substrat</p> <p>S'agita bé, es deixa reposar 30 minuts i es mesura el pH</p> <p>Si la suspensió manté el pH del tampó MUB-HCl (pH 6) es procedeix a la determinació de l'activitat enzimàtica utilitzant aquesta solució tampó (per preparar el substrat i per a la determinació enzimàtica) i prenent com a volum x de HCl 0,5 M igual a 0 mL</p> <p>Si pel contrari, la solució tampó MUB-HCl (pH 6) no aconsegueix portar la suspensió al pH 6 es procedeix segons l'apartat següent per deduir el valor de x mL de HCl 0,5 M i s'utilitza com a solució tampó la MUB-HCl (pH \approx 9) (per preparar el substrat i per a la determinació enzimàtica)</p>
Corba de neutralització	<p>Determinació del volum de HCl a afegir:</p> <p>La corba de neutralització té per objectiu determinar el volum de HCl 0.5 M (x mL) que s'ha d'afegir a la suspensió sòl-tampó-substrat per aconseguir el pH de 6.0 al qual es realitza la reacció enzimàtica (sent el tampó MUB- HCl pH \approx 9). La corba de neutralització es realitza per a cada mostra de sòl.</p> <p>Es pesa 1,5 g de sòl en recipients de fons estret</p> <p>s'afegeixen 4 mL de tampó MUB-HCl (pH \approx 9), 1 mL d'aigua destil·lada, 1 mL de substrat</p> <p>Es barreja bé, es deixa reposar 30 min i es mesura el pH</p> <p>S'afegeixen 0,1 mL de HCl 0,5 M, barrejar, deixar reposar 10 min i mesurar el pH</p> <p>Repetir aquesta operació fins que es abast un pH mínim de 6,0</p> <p>De la representació de pH enfront del HCl gastat es dedueix el valor de HCl 0,5 M necessari com x mL</p>
Activitat enzimàtica: Condicions	<ul style="list-style-type: none"> • Pes de mostra: 1,5 g de sòl (sec, fracció terra fina assecada a l'aire o bé humit, garbellada 2 mm) • pH de la reacció: 6 • Ajust de pH: 4 mL de tampó MUB-HCl(pH6)/4 mL MUB-HCl(pH\approx9)+x mL • HCl 0,5 M • Volum de substrat: 1 mL • Concentració del substrat: 25 mM • Temperatura d'incubació: 37 ° C • Temps d'incubació: 1 hora • Utilització de toluè: no • Aturada de la reacció: gel • Separació del sòl: 1 mL CaCl₂ 2 M • Extracció del pNF: 4 mL de extractant (tampó THAM de pH 12) • Obtenció de l'extracte: filtració • Volum total de l'extracte 12 mL • pH lectura de l'extracte: 8,5-8,7 • Lectura del pNF: 400 nm

Activitats enzimàtiques β-glucosidasa i β-galactosidasa (Tabatabai, 1982; Trasar-Cepeda et al., 1985 i 2000; Jiménez i Bonmatí, 2003)	
Activitat enzimàtica: Mesura	<p>Pesar 1,5 g de sòl en un erlenmeyer/botella de 50 mL (per mostres, controls i patrons)</p> <p>Afegir 4 mL de dissolució tampó MUB-HCl (pH 6)/MUB-HCl (pH\approx9) (per mostres, controls i patrons)</p> <p>Afegir x mL de HCl 0,5 M per aconseguir el pH 6,0 en la suspensió (per mostres, controls i patrons)</p> <p>Afegir aigua destil·lada: (2-x) mL en mostres, (2-x) mL en controls i (1-x) mL en patrons</p> <p>Afegir 1 mL de patró de p-nitrofenol de 20 mgL⁻¹, 50 mgL⁻¹, 100 mgL⁻¹ i 200 mgL⁻¹ en patrons</p> <p>Afegir 1 mL de substrat p-nitrofenil β-D-glucopiranosido 25 mM en mostres</p> <p>Tapar tots els erlenmeyers amb parafilm o botelles amb el tap</p> <p>Afegir un recipient amb la solució de substrat (p-nitrofenil β-D-glucopiranosido 25 mM)</p> <p>Incubar en un bany d'aigua amb agitació a 37°C durant una hora (mostres, controls, patrons i substrat)</p> <p>Treure tots els erlenmeyers/botelles i refredar en bany de gel</p> <p>Afegir 1mL de CaCl₂ 2 M i 4 mL de solució extractant (THAM-NaOH, pH12) en mostres</p> <p>Afegir 1 mL de substrat (p-nitrofenil β-D-glucopiranosido/p-nitrofenil-β-D-Galactopiranosido 25 mM) en controls i patrons</p> <p>Afegir 1 mL de CaCl₂ 2 M i 4 mL de solució extractant (THAM-NaOH, pH12) en controls i patrons</p> <p>Agitar i filtrar sobre tubs de vidre de 20 mL</p> <p>Omplir un tub, que serà el blanc de reactius (per a la cubeta de referència) amb: 4 mL de tampó SEMPRE pH 6 + 2 mL d'aigua + 1 mL de substrat + 1 mL de CaCl₂ + 4mL extractant</p> <p>Mesurar l'Absorbància dels filtrats a 400 nm després d'haver ajustat a zero amb la solució de referència en les dues cubetes. El volum del filtrat permet llegir dues vegades cada tub.</p> <p>Si la lectura cau fora del rang de patrons es fa la dilució adient amb aigua destil·lada</p>
4	Càlculs
Recta de calibració	<p>Amb les lectures d'Absorbància dels patrons i controls es calcula la recta de calibratge</p> <p>L'equació de regressió tindrà 20 punts ja que cada tub s'haurà llegit per duplicat</p> <p>Els valors de les abscisses són: 0 (control), 20, 50, 100 i 200 (4 patrons) μg de p-nitrofenol (pNF) i els valors d'ordenades els dos valors de les lectures de controls i dels quatre patrons.</p> <p>Portant a la recta les lectura de les mostres es troba el valor de μg de p-nitrofenol en l'extracte. Amb aquest valor s'apliquen els factors de conversió següents per calcular l'activitat neta</p>
Dades	<p>p = g de sòl</p> <p>M = μg de p-nitrofenol (pNF) en l'extracte</p> <p>H= humitat del sòl</p>
	$\frac{M \mu g \text{ pNF}}{Pg \text{ sòl hora}} \frac{\mu mol \text{ pNF}}{139 \mu g \text{ pNF}} \frac{100g \text{ sòl}}{(100 - H)g \text{ sòl sec}} = \mu mol \text{ pNF lliberats } g - 1 h - 1$

Activitats enzimàtiques β-glucosidasa i β-galactosidasa (Tabatabai, 1982; Trasar-Cepeda et al., 1985 i 2000; Jiménez i Bonmatí, 2003)	
5	Observacions
Calibració	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les activitats β-glucosidasa i β-galactosidasa només es diferencien en el substrat utilitzat. En el cas de la β-galactosidasa s'ha de valorar la possibilitat de fer un rang lineal de concentracions més baixes. ➤ Cada mostra es fa per quadruplicat. Alhora es preparen 2 controls i quatre patrons per duplicat. Es posen llavors, a incubar 14 erlenmeyers més el de substrat, un total de 15. ➤ El límit de detecció de és de $0,020 \mu\text{mol pNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ i el resultat s'expressa amb 3 xifres decimals <p>La relació lineal Absorbància/concentració de pNF no pot ser l'Absorbància de la dissolucions de pNF en les mateixes condicions finals de lectura que l'assaig enzimàtic (que és el sistema habitual) si no que s'ha de buscar la relació de la concentració de pNF dels patrons i la lectura d'aquests patrons un cop s'han posat en contacte amb el sòl i hagin sofert les condicions i temps d'incubació igual a les mostres (encara que sense donar-se la reacció enzimàtica). Només d'aquesta forma estem mesurant l'Absorbància del pNF lliure o sigui l'afegit menys el retengut pel sòl. S'ha d'obtenir doncs, una recta de calibració amb la mostra de sòl. Això suposa fer paral·lelament a la incubació de les mostres i controls la incubació també de patrons en les mateixes condicions.</p> <p>Per aquesta forma de càlcul s'han de tenir presents les següents observacions:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ No es considera el pes dels patrons ni controls (sempre es procura que sigui 1,50XX) ➤ La recta de calibració no passa mai per l'origen, això té conseqüències quan es fan els càlculs d'una mostra que s'ha hagut de diluir. L'Absorbància llegida s'ha de multiplicar i després portar a la recta per deduir la concentració; o sigui no és correcte portar la Absorbància a la recta, deduir la concentració i després multiplicar. Si és vol portar directament l'Absorbància a la recta ha de ser amb el terme independent també dividit (entre 5 si s'ha diluït 5 cops) ➤ El valor del terme independent ens dirà el límit de detecció de l'activitat perquè valors d'Absorbància inferiors al terme independent no es podran portar a la recta
Activitat en fangs	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Per a determinar l'activitat en mostres de fang es parteix de 0,3 g de mostra assecada a l'aire i molturada. ➤ D'acord a l'assaig de pH i la corba de calibració el pH de la suspensió es va ajustar amb 0,2 mL HCl 1 M. ➤ La rectes de calibració presenten una pendent més baixa que la de sòls (0,0056-0,0068) i l'ordenada en l'origen superior (0,350-0,980). ➤ Si l'activitat és molt alta cal fer una dilució (1/2 en el cas fang compostat).
Activ. Galactosidasa	<p>Finalment abordem els punts a tenir en compte en el cas de voler fer una única recta de calibració per a la mesura de les dues activitats β-glucosidasa i β-galactosidasa</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Conceptualment és possible sempre que es llegeixi amb compensació de substrat ➤ A la pràctica cal decidir que és millor: Fer una sola recta amb patrons duplicats que serveixi per a les dues activitats o bé només una lectura per patró i cada activitat la seva recta ➤ Vigilar perquè la β-galactosidasa segurament necessita un rang de patrons inferior a la β-glucosidasa

Activitats enzimàtiques β -glucosidasa i β -galactosidasa (Tabatabai, 1982; Trasar-Cepeda et al., 1985 i 2000; Jiménez i Bonmatí, 2003)		
Exemple del procediment esquematitzat per a un conjunt de mostres (mostres barrejades sòl-fang, sòl argilós, experiència en lisímetres)		
Controls	Patrons	Mostres
1,5 g de sòl		
4 mL de tampó pH 9		
0,8 mL HC 0,5 M		
1,2 mL aigua	0,2 mL aigua	1,2 mL aigua
	1 mL p-nitrofenol 20 ppm 50 ppm 100 ppm 200 ppm	
		1 mL substrat
Incubar 1 hora 37°C		
Refredar bany de gel		
1 mL substrat	1 mL substrat	
1 mL de CaCl ₂		
4 mL de solució extractant		
Agitar i filtrar		
Mesurar l'Absorbància a 400 nm		
Solució de la cubeta de Referencia: 4 mL tampó pH 6 +2 mL aigua+1 mL substrat en pH 9 +1 mL CaCl ₂ + 4 mL extractant		

Exemple d'esquema de treball